



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



**BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL FILAMENTOZNIH
SOJEVA CIJANOBAKTERIJA SA PODRUČJA
VOJVODINE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: Prof. dr Jelica Simeunović

Kandidat: Dajana Kovač

Novi Sad, 2017.

Srdačno se zahvaljujem:

Svojoj mentorki prof. dr Jelici Simeunović, na ukazanom poverenju i prilici da budem deo istraživačkog tima na Katedri za mikrobiologiju, na uloženom trudu, prenosu znanja i iskustva, kao i ogromnoj pomoći, strpljenju i podršci tokom pisanja;

prof. dr Zorici Svirčev i prof. dr Siniši Markovu na uloženom trudu i velikoj ekspeditivnosti prilikom ocene ove disertacije;

prof. dr Draganu Radnoviću, šefu Katedre za mikrobiologiju, na pruženoj prilici i prijatnoj saradnji;

dr Anamariji Mandić, na angažovanju na projektu u okviru koga su proistekli rezultati ove disertacije;

Kolegama sa Prirodno – matematičkog fakulteta dr Mileni Rašeti, Filipu Šibulu, prof. dr Sonji Kaišarević, dr Bojani Stanić, Neveni Kitanović, prof. dr Ivani Teodorović, Varji Knežević, Šandoru Šipošu, Jeleni Hrubik i Branki Glišić, kao i Ivanu Milovanoviću (FINS) i Bošku Blagojeviću (PFNS) na stručnoj pomoći kojom su doprineli izradi ove disertacije;

Dragim kolegama sa Katedre za mikrobiologiju, doktorantima i laborantkinji Sandi S. na izuzetno prijatnoj radnoj atmosferi, podršci i pomoći, kao i profesorima na Katedri za mikrobiologiju;

Varji, Goranu i mojoj porodici na ljubavi i podršci.

Mom Bošku neizmerno hvala na svemu.

SADRŽAJ:

1. UVOD	3
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. CIJANOBAKTERIJE	5
2.2. PRODUKCIJA BIOMASE CIJANOBAKTERIJA	8
2.2.1. Uticaj svetlosti na rast cijanobakterija	10
2.2.2. Uticaj izvora ugljenika na rast cijanobakterija	11
2.2.3. Uticaj izvora azota na rast cijanobakterija	12
2.3. BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL CIJANOBAKTERIJA.....	14
2.4. CIJANOBAKTERIJE KAO IZVOR PIGMENATA	15
2.4.1. Cijanobakterije kao izvor karotenoida	15
2.4.2. Cijanobakterije kao izvor fikobiliproteinskih pigmenata.....	16
2.5. CIJANOBAKTERIJE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH METABOLITA	20
2.5.1. Cijanobakterije kao izvor masnih kiselina	21
2.5.2. Cijanobakterije kao izvor fenolnih jedinjenja	24
2.5.3. Cijanobakterije kao izvor antioksidanata	26
2.5.4. Cijanobakterije kao potencijalni izvor antibakterijskih agenasa	30
2.5.5. Cijanobakterije kao potencijalni izvor antikancerogenih agenasa.....	33
2.6. CIJANOBAKTERIJE U ISHRANI LJUDI I TRADICIONALNOJ MEDICINI.....	36
2.7. CIJANOBAKTERIJE U ISHRANI ŽIVOTINJA.....	39
2.8. TOKSINI CIJANOBAKTERIJA I DETEKCIJA TOKSIČNIH SOJEVA	41
2.9. VIŠEKRITERIJUMSKA ANALIZA KAO METOD ZA PROCENU CIJANOBAKTERIJSKIH SOJEVA SA NAJVEĆIM BIOTEHNOLOŠKIM POTENCIJALOM	44
2.9.1. Analitički hijerarhijski proces (AHP).....	44
2.9.2. Aditivni metod (SAW – simple additive weighting).....	46
3. CILJEVI	48
4. MATERIJAL I METODE	50
4.1. ISPITIVANI SOJEVI CIJANOBAKTERIJA I USLOVI KULTIVACIJE.....	50
4.2. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE BIOMASE I STOPE RASTA: UTICAJ SVETLOSTI, IZVORA UGLJENIKA I AZOTA.....	52
4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA FIKOBILIPROTEINA: UTICAJ SVETLOSTI, IZVORA UGLJENIKA I AZOTA.....	53
4.4. PRIPREMA CIJANOBAKTERIJSKIH EKSTRAKATA ZA ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI.....	53

4.5. ODREĐIVANJE SASTAVA MASNIH KISELINA METODOM GASNE HROMATOGRAFIJE (GC-FID).....	54
4.6. HPLC-MS/MS SKRINING ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA.....	55
4.7. ODREĐIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI CIJANOBAKTERIJSKIH SOJEVA	56
4.7.1. Određivanje antioksidantnog potencijala cijanobakterija	56
4.7.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti cijanobakterija.....	58
4.7.3. Određivanje antikancerogene aktivnosti <i>in vitro</i> u eseju sa humanom ćelijskom linijom HepG2	59
4.7.4. Detekcija toksičnosti cijanobakterija.....	60
4.7.4.1. Detekcija toksičnih sojeva primenom bioeseja.....	60
4.7.4.2. Detekcija toksičnih sojeva primenom enzimskih eseja.....	63
4.9. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	65
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
5.1. PRODUKCIJA BIOMASE ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA	66
5.2. PRODUKCIJA FIKOBILIPROTEINA ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA	71
5.3. SADRŽAJ MASNIH KISELINA ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA	75
5.4. HPLC-MS/MS ANALIZA ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA.....	80
5.5. ANTIOKSIDANTNI POTENCIJAL ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA	84
5.6. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA.....	88
5.7. ANTIKANCEROGENA AKTIVNOST – ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG EFEKTA SOJEVA CIJANOBAKTERIJA.....	92
5.8. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI SOJEVA CIJANOBAKTERIJA	97
5.9. REZULTATI ODREĐIVANJA SOJEVA SA NAJVEĆIM BIOTEHNOLOŠKIM POTENCIJALOM	104
6. ZAKLJUČAK.....	108
7. LITERATURA	111
8. PRILOG.....	123

1. UVOD

Uprkos velikom tehnološkom napretku, savremena civilizacija se ipak susreće sa brojnim problemima uključujući nedostatak hrane i porast učestalosti različitih oboljenja poput infektivnih, kardiovaskularnih, kancera i dijabetesa, za koje savremena medicina još uvek nema rešenja.

Do danas je iz prirodnih resursa izolovan impresivan broj biološki aktivnih agenasa, često se bazirajući na njihovoj upotrebi u tradicionalnoj medicini. U mnogim zemljama Dalekog istoka, Srednje i Južne Amerike i Afrike cijanobakterije se vekovima tradicionalno koriste u ishrani ili medicinske svrhe, dok su danas na tržištu zastupljene kao suplement u ishrani. Ovi mikroorganizmi su identifikovani kao jedna od najperspektivnijih grupa organizama za izolaciju novih i biološki aktivnih prirodnih produkata. Raznovrstan spektar sekundarnih metabolita cijanobakterija je uglavnom rezultat jedinstvenih enzimskih mehanizama koji sem kod cijanobakterija u živom svetu nisu uopšte, ili su retko opisani. Ipak, raznovrsnost sekundarnih metabolita uključuje takođe i raznovrsnost toksičnih jedinjenja. Iako se inkorporacijom biomase cijanobakterija u tradicionalnu hranu mogu dizajnirati novi i atraktivni proizvodi, upravo zbog toksičnih supstanci koje mogu biti prisutne postoje nedoumice vezane za primenu ovog resursa u prehrambenoj industriji. Zbog toga je važno posmatrati ih prvenstveno kao izvor određenih metabolita, a ne celokupne biomase. Iako su cijanobakterije mikroorganizmi kod kojih je omogućena kombinacija osobina tipičnih za više biljke sa biotehnoškim svojstvima mikrobnih ćelija, kao i manipulacija uslova kultivacije u cilju brže produkcije željenih metabolita, veću komercijalnu upotrebu takođe ograničava i generalno nizak prinos biomase.

S obzirom na diverzitet i genetičku jedinstvenost svakog soja, cijanobakterije predstavljaju izvanredan resurs za sektor prehrambene, farmaceutske i medicinske industrije. Svaki izolovan soj predstavlja potencijalni izvor vrednih metabolita, koji bi se mogli odlikovati izuzetnom nutritivnom vrednošću i/ili biološkom aktivnošću. Zbog toga je od velikog značaja ispitivanje produkcije različitih biološki aktivnih i nutritivnih jedinjenja različitih sojeva cijanobakterija, kao i faktora kojima se može povećati produkcija biomase sojeva sa biotehnoškim potencijalom. Tome bi trebalo da posluže istraživanja koja su predmet ove teze, sprovedena za potrebe projekata:

„Funkcionalni proizvodi na bazi žita namenjeni osobama sa metaboličkim poremećajima“, nacionalni projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, br. TR 31029, rukovodilac dr Anamarija Mandić;

„Identification and characterization of cyanobacterial toxins based on their interaction with basic cellular detoxification systems in zebrafish (Danio rerio) and zooplankton Daphnia magna“, međunarodni istraživački SCOPES projekat finansiran od strane Švajcarske

nacionalne fondacije za nauku (SNSF), br. IZ73Z0_152274/1, rukovodilac dr Karl Fent, koordinatori dr Jelica Simeunović i dr Tvrtko Smital.

U Novom Sadu, jul 2017.

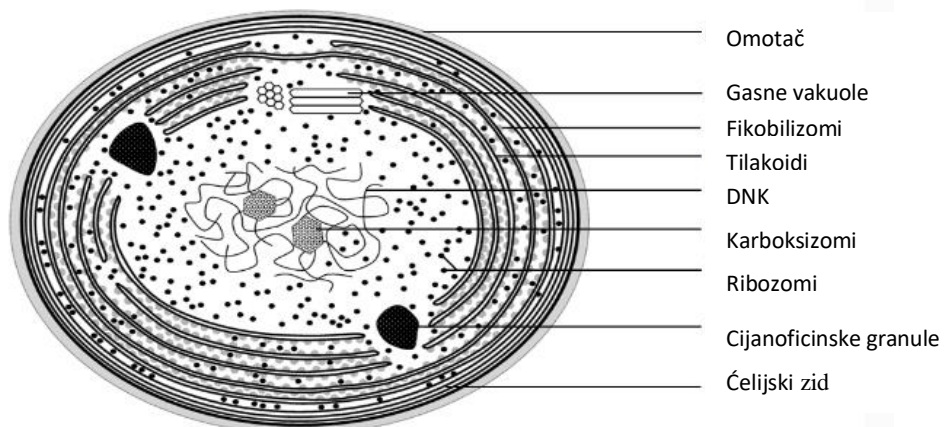
Dajana Kovač

2. PREGLED LITERATURE

2.1. CIJANOBAKTERIJE

Cijanobakterije, odnosno modrozelenne alge (*Cyanobacteria*, *Cyanophyta*), su grupa prokariotskih organizama čija se starost procenjuje na oko 2,45–2,22 milijardi godina (Schirrmeister i sar., 2011). Smatra se da je sposobnost oksigene fotosinteze nastala upravo kod cijanobakterija koje su direktni preci današnjih fotosintetičkih vrsta (Olson, 2006). Cijanobakterije su prvobitno smatrane algama zbog niza karakteristika kao što su morfologija talusa, pigmentacija i svojstvo obavljanja oksigene fotosinteze. Ipak, u odnosu na alge zadržale su niz primitivnih svojstava uključujući prokariotski tip ćelijske organizacije, nepostojanje pokretnih stadijuma u ciklusu razvića i vegetativan način razmnožavanja (Blaženčić, 2007).

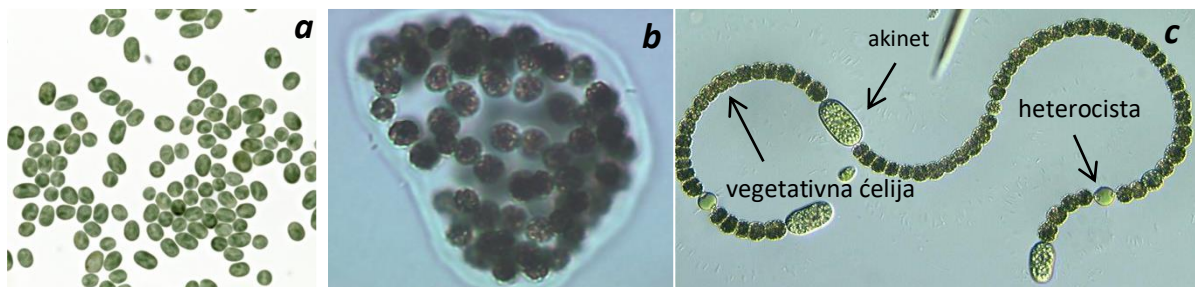
S obzirom na prokariotski tip ćelijske organizacije, cijanobakterije ne poseduju jedro, kao ni ćelijske organele, izuzev ribozoma koji su prokariotskog tipa (70S). Protoplasm je izdiferenciran na periferni deo u kojem se nalaze pigmenti (hromatoplazma) i centralni deo (nukleoplazma) u kojem se nalazi DNK. Vegetativne ćelije su obavijene višeslojnim ćelijskim zidom u čiji sastav ulazi murein – peptidoglikan, specifičan za ćelijski zid bakterija. Proces fotosinteze se odvija na tilakoidima, pojedinačnim lamelarnim strukturama koje su analogi hloroplastima algi i biljaka. U membranama tilakoida nalaze se hlorofil *a* i pigmenti iz grupe karotenoida koji su lipofilni, dok se proteinski pigmenti iz grupe fikobiliproteina koji su vodorastvorljivi nalaze na površini tilakoida u vidu granula (fikobilizomi) (Slika 1). Značaj pomoćnih fotosintetičkih pigmenata se ogleda u tome što su sposobni da apsorbiraju svetlost talasnih dužina koje ne apsorbiruje hlorofil *a*, što fotosintezu čini efikasnijom (Blaženčić, 2007). U citoplazmi se nalaze još i ribozomi, granule cijanoficina koje predstavljaju polimer arginina i asparagina (rezervne supstance), karboksizomi - poliedarna tela u kojima je smešten



Slika 1. Šema građe cijanobakterijske ćelije
(<http://reasonandscience>)

enzim RuBisCo (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza, koji kod svih organizama sa oksigenom fotosintezom pretvara neorganski u redukovani organski ugljenik) i gasne vakuole pomoću kojih lako lebde u vodenoj masi (Barsanti i Gualtieri, 2006).

U odnosu na morfološku organizaciju talusa cijanobakterije mogu biti jednoćelijske, kolonijalne i trihalne (Slika 2). Kod trihalnih vrsta ćelije su raspoređene u jednom nizu čineći trihom. Trihom koji poseduje omotač (sluznu saru) predstavlja tzv. filament. Kod nekih filamentoznih vrsta pored vegetativnih ćelija javljaju se specijalizovane ćelije heterociste i akineti (Slika 2). Smatra se da su heterociste ćelije u kojima se odvija proces azotofiksacije uz prisustvo elementarnog azota i uz učešće enzima nitrogenaze (Komarek i Anagnostidis, 1989). Akineti (trajne spore) su ćelije bogate rezervnim hranljivim materijama, sa 20-30 puta većim sadržajem DNK, sposobne da duži period prežive u nepovoljnim uslovima (Blaženčić, 2007). Za razliku od heterocisti koje nisu vijabilne kada se odvoje od trihoma, akineti u pogodnim uslovima mogu da klijaju u novu jedinku.



Slika 2. Tipovi talusa kod cijanobakterija. (a) - *Cyanothece sp.* sa jednoćelijskim talusom, (b) - *Microcystis wesenbergii* sa kolonijalnim talusom, (c) - *Anabaena sp.* sa trihalnim talusom (<http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices>; <http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails>, www.studyblue.com/note)

Metabolizam cijanobakterija je veoma specifičan i karakteriše se širokim spektrom različitih biohemijskih reakcija. S obzirom na to, cijanobakterije predstavljaju bogat izvor prirodnih produkata koji uključuju primarne i sekundarne metabolite. Ove mikroorganizme karakteriše metabolizam u kojem nastaju raznovrsni sekundarni metaboliti, organski molekuli niske molekulske mase koji nisu bitni za normalan rast, razvoj ili reprodukciju, ali se često odlikuju specifičnim biološkim aktivnostima (Mandal i Rath, 2015). Važne klase sekundarnih metabolita su poliketidi i neribozomalni peptidi, ali i alkaloidi, terpenoidi, molekuli nastali u ciklusu šikiminske kiseline i aminoglikozidi. Mnogi sekundarni metaboliti cijanobakterija se sintetizuju u putevima neribozomalnih peptid sintetaza (NRPS) i poliketid sintaza (PKS) (Hoffmann i sar., 2003), i mnogi od njih imaju strukturu peptida ili makrolida, ili njihovu kombinaciju (Welker i Von Döhren, 2006). Klasa peptida nastaje iz dve vrste biosintetičkih puteva: enzimima NRPS ili ribozomalnom sintezom i naknadnom post-translacijskom

modifikacijom i obradom. NRPS mogu da stupe u reakciju sa oko 300 proteinogenih i neproteinogenih supstrata i mogu sadržati dodatne domene koje uvode modifikacije ili epimerizuju aminokiselinske supstrate (Grünewald i Marahiel, 2006). Nasuprot tome, iako je ribozomalna biosinteza peptida ograničena na 20 proteinogenih aminokiselina, ova grupa peptida ipak pokazuje veliku raznolikost i značajan biosintetički i bioaktivni potencijal, tako da se cijanobakterije smatraju jednim od najbogatijih izvora ribozomalno sintetisanih prirodnih produkata (Mandal i Rath, 2015). Ipak, većina cijanobakterijskih peptida se sintetiše neribozomalno, naročito familija patelamida i mikroviridina, koji ne nastaju ni u putu NRPS. Štaviše, glavna karakteristika biohemijskih puteva cijanobakterija je hibridni karakter, tj. česta kombinacija NRPS i PKS modula (Mandal i Rath, 2015).

Kao primarni producenti u slatkim, slanim i brakičnim vodama, cijanobakterije su prva karika u lancima ishrane vodenih ekosistema, a prisutne su i u zemljištu, pirinčanim poljima i ekstremnim staništima poput pustinja, mineralnih voda, termalnih izvora, hiperslanih voda i polarnih regiona. Takođe se mogu naći u simbiozi sa drugim organizmima kao što su marinska silikatna alga roda *Rhizosolenia*, vodena paprat roda *Azolla* i koren biljke roda *Cycas* (Rai, 1990).

Kao što je već spomenuto, kod cijanobakterija nije zastupljeno polno razmnožavanje, dok su tipovi vegetativnog razmnožavanja različiti. Jednoćelijski i kolonijalni predstavnici se mogu razmnožavati prostom ćelijskom deobom, nanocitama, planokokama i sporama, dok se filamentozne cijanobakterije uglavnom razmnožavaju hormogonijama - kratkim pokretnim delovima filamenata koji nastaju razdeljivanjem končastog talusa i koji mogu da izrastu u novu jedinku (Blaženčić, 2007).

Do sada je poznato nekoliko sistema klasifikacije cijanobakterije. Ranija klasifikacija bila je zasnovana uglavnom na morfološkim kriterijumima i načinu razmnožavanja. Prema novijem sistemu klasifikacije, koji se zasniva na molekularnim filogenetskim analizama, cijanobakterije se dele u 8 redova: *Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Spirulinales*, *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Chroococciopsidales* i *Nostocales* (Komárek i sar., 2014).

2.2. PRODUKCIJA BIOMASE CIJANOBAKTERIJA

Cijanobakterije se, poput ostalih mikroalgi, gaje u tečnom medijumu jednostavnog nutritivnog sastava, jer kao fotoautotrofni mikroorganizmi za rast zahtevaju prisustvo svetlosti, vode i mineralnih materija. Za scale-up proizvodnju koriste se fotobioreaktori (Slika 3) koji se definišu isključivo kao reaktori kod kojih ne postoji direktna razmena gasova i kontaminanata između kulture i atmosfere. Osnovna funkcija fotobioreaktora je da obezbede kontrolisane uslove za optimalan rast, pri kojima se postiže konstantna maksimalna produkcija biomase ili specifičnog jedinjenja koje se dobija direktno u procesu ili se naknadno izdvaja iz biomase. Postoji nekoliko različitih tipova komercijalnih fotobioreaktora: akseni, vertikalni cevasti, izuvijani (serpentinski), fotobioreaktori sa spojenim cevima, spiralni i pločasti. Potpuno bezbednu biomasu obezbeđuju isključivo akseni fotobioreaktori u kojima se masovna proizvodnja biomase odvija bez prisustva drugih mikroorganizama i kontaminanata. Iako fotobioreaktori ne mogu komercijalno konkurisati velikim otvorenim sistemima za proizvodnju biomase, mogu proizvoditi zdravstveno bezbednu biomasu ili vrlo specijalizovanu biomasu koja se u biotehnologiji, naročito u medicini i farmaciji, koristi kao izvor veoma retkih i bitnih supstanci (Svirčev, 2005).



Slika 3. Fotobioreaktori

(<http://biodesignchallenge.org>; <https://www.pinterest.com/pin>)

Za masovno umnožavanje biomase cijanobakterija koriste se i otvoreni sistemi (Slika 4) koji uključuju bazene, kanale i plitke cirkulacione sisteme. Bazen predstavlja najjednostavniji sistem u kojem ne postoji nikakvo mešanje, kanali se odlikuju cirkulacijom podloge dužinom, dok se plitki cirkulacioni sistem razlikuje od kanala uglavnom po dubini i vertikalnom mešanju kulture (Svirčev, 2005).



Slika 4. Sistemi za kultivaciju spiruline
(www.aurospirul.html; <https://avvenice.com>)

Uprkos velikom biotehnoškom potencijalu ovih mikroorganizama, širu komercijalnu upotrebu ograničavaju toksini koji se mogu naći u biomasi cijanobakterija, skupa tehnologija i generalno nizak prinos biomase. Biomasa je glavni proizvod kultivacionog sistema mikroalgi, i produktivnost intracelularnih bioaktivnih jedinjenja direktno zavisi od produktivnosti biomase (Safafar i sar., 2016). Nizak prinos takođe otežava i poskupljuje proces izdvajanja biomase (Cheirsilp i Torpee, 2012), koji iznosi 20-30% ukupnih troškova proizvodnje (cit. u Markou i Georgakakis, 2011). S obzirom na velike troškove ovog procesa, filamentozne cijanobakterije bi zahvaljujući končastim talusima mogle biti perspektivnije u odnosu na jednoćelijske u pogledu izdvajanja biomase.

Prema Ördog-u (2001), veoma produktivnim sojevima se mogu smatrati oni kod kojih je finalna biomasa kulture oko 2 mg/mL, dok dobre producente biomase predstavljaju sojevi sa produkcijom od 1-2 mg/mL. Za scale-up proizvodnju biomase najvažniji su izbor soja sa visokom stopom rasta i visokim sadržajem željenog jedinjenja. Međutim, produkcija metabolita se može značajno povećati tako što se na primer mogu prvo obezbediti uslovi kojima se optimizuje rast i nakupljanje biomase, a zatim oni koji favorizuju sintezu određenih metabolita (Chen i Zhang, 1997; Kepekçi i Saygideger, 2012). U Tabeli 1 navedeni su podaci o produkciji biomase kod nekih vrsta cijanobakterija.

Na metabolizam cijanobakterija, odnosno na produkciju biomase i na sintezu primarnih i sekundarnih metabolita utiče veliki broj faktora poput pH vrednosti, saliniteta, svetlosnih uslova, temperature, izvora određenih mineralnih materija, organskih nutrijenata i dr., jer sastav medijuma ima značajnu ulogu u produkciji metabolita (Svirčev i sar., 2008). Kao najvažniji faktori rasta najčešće se navode intenzitet i kvalitet svetlosti, temperatura i sadržaj i dostupnost organogenih elemenata.

Tabela 1. Pregled podataka u literaturi o produkciji biomase nekih vrsta cijanobakterija

Vrsta cijanobakterije	Produkcija biomase (mg/mL)	Referenca
<i>Spirulina platensis</i>	10,2	Chen i Zhang, 1997
<i>Spirulina platensis</i>	1,7	Chen i sar., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	2,9	Andrade i Costa, 2007
<i>Spirulina platensis</i>	2,6	Ravelonandro i sar., 2008
<i>Spirulina platensis</i>	4,3	Rodrigues i sar., 2010
<i>Spirulina platensis</i>	6,0	Shalaby i sar., 2010
<i>Spirulina platensis</i>	6,9	Ajayan i sar., 2012
<i>Spirulina platensis</i>	1,2	Chainapong i sar., 2012
<i>Spirulina platensis</i> M2	0,8	Kepekçi i Saygideger, 2012
<i>Spirulina platensis</i>	1,5	Çelekli i sar., 2016
<i>Arthronema africanum</i>	2,9	Chaneva i sar., 2007
<i>Aphanothece microscopica Nägeli</i>	5,1	Jacob-Lopes i sar., 2009
<i>Nostoc flagelliforme</i>	1,7	Yu i sar., 2009
<i>Anabaena</i> PCC 7120	3,1	Yu i sar., 2011

2.2.1. Uticaj svetlosti na rast cijanobakterija

Svetlost je jedan od najvažnijih faktora za rast cijanobakterija u prirodnom staništu. U gustim kulturama u fotobioreaktoru, svetlost predstavlja glavni ograničavajući faktor u biotehnologiji mikroalgi (Kirk, 1994). Štaviše, u okviru roda *Nostoc* je utvrđeno da rast velikim delom zavisi od uslova osvetljenja jer debeo omotač na površini filameta apsorbuje do 90% upadne svetlosti (Ma i sar., 2015).

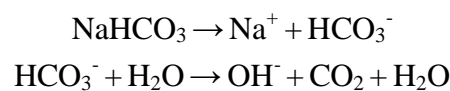
Produktivnost biomase zavisi od količine primljene i uskladištene svetlosne energije, što je u direktnoj vezi sa kapacitetom fiksacije ugljenika (Jacob-Lopes i sar., 2009). Kada se mikroalge izlože osvetljenju, svetlosne reakcije se automatski aktiviraju, a deaktiviraju ako se kvalitet i kvantitet svetlosti smanje ispod praga za stimulaciju fotopigmenta, ili pri odgovarajućoj koncentraciji organskih supstrata (Markou i Georgakakis, 2011). Međutim, svetlosni zahtevi cijanobakterija se razlikuju i u nekoliko studija je pokazano da se podešavanjem određenih svetlosnih uslova može značajno povećati produkcija biomase i željenih metabolita. Tako je upotrebom određenog intenziteta svetlosti povećana produkcija biomase kod vrsta *S. platensis* (Ravelonandro i sar., 2008; Ajayan i sar., 2012) i *Arthronema africanum* (Chaneva i sar., 2007), a određenim fotorežimom kod vrste *Aphanothece microscopica* (Jacob-Lopes i sar., 2009). Kod soja *Cyanothece* ATCC 51142 je u uslovima kontinualnog osvetljenja otkrivena jaka sposobnost sinteze nitrogenaze i cirkadijalna ekspresija kod 10% gena (Toepel i sar., 2008). Ravelonandro i sar. (2008) su kod vrste *S.*

platensis najveću produkciju biomase registrovali pri zelenoj svetlosti. Pored uticaja na produkciju biomase, pokazano je da se kod cijanobakterija manipulacijom svetlosnih uslova takođe može uticati na metabolizam i značajno povećanje produkcije različitih jedinjenja – fenola (Kepekçi i Saygideger, 2012), proteina (Ravelonandro i sar., 2008), fikobiliproteina (Chaneva i sar., 2007; Ajayan i sar., 2012; Ma i sar., 2015).

Pri visokom intenzitetu svetlosti, rast ćelija se povećava bržom fotosintetičkom produkcijom ATP i NADPH, tako da mnoge vrste mikroalgi zahtevaju osvetljenost između 8-12 klux (Ajayan i sar., 2012). Ipak, izlaganje višim nivoima fotosintetički aktivnog zračenja može dovesti do inhibicije fotosinteze, naročito tokom dužeg perioda izlaganja. Ovaj proces je poznat kao fotoinhibicija i nastaje kao posledica formiranja reaktivnih oblika kiseonika koji mogu oksidovati proteine membrane, lipide i pigmente, što dovodi do nestabilnosti membrane, oštećenja fotosintetičkih pigmenata i utiče na rast i sposobnost preživljavanja samih ćelija (Bhandari i Sharma, 2006).

2.2.2. Uticaj izvora ugljenika na rast cijanobakterija

Cijanobakterije mogu biti ekonomski isplativije u odnosu na druge mikroorganizme jer ne zahtevaju prisustvo organskog supstrata (Kaushik i Chauhan, 2008; Silva-Stenico i sar., 2011). Ovi mikroorganizmi mogu da rastu na disosovanom (HCO_3^- , CO_3^{2-}) i nedisosovanom tipu (CO_2 , H_2CO_3) neorganskog izvora ugljenika, pri čemu se metabolička efikasnost i sastav biomase u zavisnosti od korišćenja CO_2 ili karbonata/bikarbonata može razlikovati od vrste do vrste (Yeh sar., 2010). Tako je u kulturi vrste *Spirulina platensis* korišćenjem različitih izvora ugljenika - NaHCO_3 , Na_2CO_3 , glukoza, saharoza, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, CaCO_3 i urea, pokazano da je najbolji izvor Na_2CO_3 (Masih i sar., 2011). Yeh i sar. (2010) su zabeležili da se povećanjem koncentracije NaHCO_3 preko 1200 mg/L biomasa smanjuje, što bi moglo biti posledica povećanja pH vrednosti usled akumulacije OH^- , jer se usvajanjem CO_2 od strane ćelija uzrokuje stalno oslobađanje HCO_3^- :



Cijanobakterije su primarno fotosintetski organizmi, međutim poznato je da mnoge vrste odlikuje miksotrofni tip ishrane, što znači da mogu koristiti i organsku materiju kao izvor ugljenika. Za scale-up proizvodnju, mikroalge se obično gaje u fotoautotrofnim kulturama u kojima se oko 25% biomase proizvedene tokom dnevne svetlosti izgubi respiracijom u toku noći (Chisti, 2007). Sa druge strane, u miksotrofnim uslovima kultivacije ćelije koriste CO_2 i organski izvor ugljenika, i istovremeno se odvijaju procesi fotosinteze i aerobne respiracije. Ovaj tip rasta je dvostruko ograničen proces u kojem organski supstrat i

intenzitet svetlosti predstavljaju dva najvažnija faktora (Richmond, 1988) - kako kultura može da nastavi rast tokom noći koristeći organske materije, svetlost prestaje da bude apsolutno limitirajući faktor rasta (Andrade i Costa, 2007; Kong i sar., 2013). Pored povećanja biomase, pokazano je da se miksotrofnom kultivacijom mogu smanjiti troškovi osvetljenja (Yu i sar., 2009), prevazići problem ograničenja svetlosti pri velikoj gustini ćelija (Bhatnagar i sar., 2011) i izbeći fotoinhibicija (Chojnacka i Noworyta, 2004). Miksotrofna kultivacija bi prema Yu i sar. (2011) mogla biti naročito pogodna za proizvodnju visokovrednih bioaktivnih jedinjenja i farmaceutika.

Prethodne studije ukazuju na potencijal cijanobakterija da koriste različite organske supstrate u cilju povećanja produkcije biomase. Pokazano je da je na biomasu spiruline stimulatивно delovala glukoza (2 g/L) (Chen i Zhang, 1997), melasa (0,75 g/L) (Andrade i Costa, 2007), acetat (4 g/L) (Chen i sar., 2006). Međutim, korišćenje organskih izvora ugljenika poput glukoze za kultivaciju u povećanim razmerama je uglavnom ekonomski neisplativo, tako da bi u tom smislu od naročitog interesa bili nusproizvodi poput sirovog glicerola (Bhatnagar i sar., 2011).

2.2.3. Uticaj izvora azota na rast cijanobakterija

S obzirom da je ključni konstituent mnogih ćelijskih komponenti - aminokiselina, pirola, piridina, pirimidina, purina, i drugih važnih konstituenata ćelije, azot je najvažniji nutrijent za rast mikroalgi, pa samim tim i cijanobakterija. Većina vrsta je sposobna da koristi različite oblike neorganskog azota (amonijak, nitrat, nitrit, itd.), među kojima je usvajanje amonijuma i njegovo iskorišćavanje od strane ćelija energetski najefikasnije (Safar i sar., 2016).

U tom pogledu, naročito se izdvajaju azotofiksirajuće cijanobakterije, koje odlikuje sposobnost prevođenja atmosferskog azota (N_2) u amonijak, koji se biosintetskim putevima dalje prevodi u nukleinske kiseline i proteine. Zbog sposobnosti fiksacije atmosferskog azota, mogu se redukovati troškovi proizvodnje, jer ne postoji potreba za kombinovanim azotom u medijumu (Prasanna i sar., 2004; Khajepour i sar., 2015), ali se može i ograničiti kontaminacija drugim organizmima. Iako je azotofiksacija energetski zahtevan proces u kojem se troše fotosintetički generisani reduktanti, azotofiksirajući uslovi kultivacije mogu biti pogodni za proizvodnju određenih metabolita. U ćelijama mikroalgi postoji veza između metabolizma ugljenika i metabolizma azota, jer koriste organski ugljenik i obezbeđuju energiju direktno iz fotosintetičkog transporta elektrona i fiksacije CO_2 , kao i iz metaboličkog puta organskog ugljenika (cit. u Safar i sar., 2016). Pokazano je da nizak nivo azota u odgajivačkoj podlozi može dovesti do akumulacije lipida i smanjenja sadržaja proteina (Becker, 1994). Kada su u pitanju cijanobakterije, pokazano je da upravo u azotofiksirajućim

uslovima neki sojevi produkuju veće količine fikobiliproteina (Simeunović i sar., 2013), kao i bioaktivnih jedinjenja (Svirčev i sar., 2008).

Za kultivaciju vrste *S. platensis* konvencionalni izvor azota je nitrat. Kako je sam NH_4Cl u većim koncentracijama toksičan, pokazano je da se u kombinaciji sa KNO_3 koji osigurava prinos dobija visokokvalitetna biomasa, a troškovi proizvodnje redukuju do 30% (Rodrigues i sar., 2010). Pošto je za redukciju nitrata do amonijaka potrebna energija, korišćenjem uree umesto KNO_3 se može postići veća biomasa (Danesi i sar., 2002; Ajayan i sar., 2012), jer se urea u baznoj podlozi spontano hidrolizuje do lako usvojivog amonijaka (NH_3), a takođe se redukuju i troškovi proizvodnje (Danesi i sar., 2002).

2.3. BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL CIJANOBakterija

Snažan biotehnološki potencijal mikroalgi, uključujući cijanobakterije, proističe iz niza činjenica (www.igb.fraunhofer.de):

- Stopa rasta je 5-10 puta veća u odnosu na stopu rasta viših biljaka;
- Za rast su esencijalni sunčeva svetlost, CO₂ i neorganski nutrijenti poput azota i fosfora;
- Kao izvor ugljenika za rast može se koristiti CO₂ nastao iz procesa sagorevanja (za 1 kg suve biomase potrebno je oko 1,85 kg CO₂);
- Mogu se kultivisati u morskim i brakičnim vodama, na području sa neplodnim zemljištem, i nisu u konkurenciji za resurse sa konvencionalnom poljoprivredom;
- Biomasa se može sakupljati tokom svih sezona;
- Biomasa je homogena i ne sadrži lignocelulozu;
- U biomasi nisu prisutni rezidui pesticida;
- Na biohemijski sastav biomase se može uticati manipulacijom uslova kultivacije, što rezultira akumulacijom željenog jedinjenja;
- Rastu u vodenom medijumu, ali zahtevaju manje vode od poljoprivrednih useva.

Sposobnost fotosinteze omogućava cijanobakterijama kombinaciju osobina tipičnih za više biljke sa biotehnološkim svojstvima mikrobnih ćelija (Custódio i sar., 2012), što uz efikasniju konverziju sunčeve energije i mogućnost manipulacije uslova kultivacije može obezbediti bržu produkciju željenih metabolita. Mikroalge generalno predstavljaju organizme koji su korisni za bioremedijaciju i uz pomoć sunčeve energije konvertuju CO₂ do potencijalnih biogoriva, hrane za ljude, hrane za životinje i visokovrednih bioaktivnih metabolita (Chisti, 2007). Na pirinčanim poljima koriste se populacije azotofiksirajućih cijanobakterija u cilju obogaćivanja zemljišta azotnim jedinjenjima. Mikroalge mogu obezbediti nekoliko različitih vrsta obnovljivih biogoriva, uključujući metan, biodizel i vodonik i ideja njihovog korišćenja kao izvora goriva se sve više shvata ozbiljno zbog rastuće cene nafte i, što je još važnije, problema globalnog zagrevanja koji je povezan sa sagorevanjem fosilnih goriva (Chisti, 2007). Ovi mikroorganizmi mogu pomoći u rešavanju problema životne sredine kao što su efekat staklene bašte i tretman otpadnih voda (cit. u Kepekçi i Saygideger, 2012; Çelekli i sar., 2016). Sa druge strane, produkuju čitav spektar nutritivnih i bioaktivnih jedinjenja, zbog čega predstavljaju izvanredan resurs za prehrambenu industriju, naročito s obzirom na ogroman diverzitet i slabu proučenost (Pulz i Gross, 2004; Plaza i sar., 2009). Međutim, kako mnoge vrste produkuju toksične metabolite, njihov najveći potencijal leži u produkciji različitih bioaktivnih jedinjenja (biofarmaceutska industrija), ishrani životinja i proizvodnji obnovljivih goriva.

2.4. CIJANOBAKTERIJE KAO IZVOR PIGMENATA

U različitim granama industrije u upotrebi su prirodne i sintetičke boje. Iako se sintetičke boje dobijaju iz neobnovljivih izvora, zbog većeg prinosa koji se dobija modernim sintetičkim procesima, ove boje se više koriste (Mohammed i Mohd, 2011). Međutim, zahtevi za prirodnim bojama u proizvodima prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije, kao i plastici za dečije igračke su u stalnom porastu zbog toksičnosti sintetičkih boja (Stadnichuk i Tropin, 2017). Kako prirodni pigmenti poseduju antioksidativna svojstva, njihovom upotrebom je takođe moguće poboljšati otpornost proizvoda na oksidaciju, što je posebno korisno u visokomasnim proizvodima kao što su emulzije (Gouveia i sar., 2008). Cijanobakterije predstavljaju naročit izvor prirodnih pigmenata, jer su pored hlorofila *a* i karotenoida prisutni i specifični fikobiliproteinski pigmenti.

2.4.1. Cijanobakterije kao izvor karotenoida

Karotenoidi su velika grupa žutih do narandžasto-crvenih terpenoidnih pigmenata koji su pronađeni kod fotosintetičkih organizama, kao i nekih bakterija i gljiva (Gouveia i sar., 2008). Ovi pigmenti pri jakom zračenju štite hlorofil *a* od fotooksidacije, dok u uslovima slabe osvetljenosti služe kao pomoćni pigmenti, odnosno sakupljaju svetlost i prenose je na molekule hlorofila *a*. Karotenoidi se dele na ksantofile koji sadrže kiseonik i karotene koji su čisti ugljovodonici (Safafar i sar., 2015).

Karotenoidi se koriste kao prirodne boje za hranu, aditivi u hrani za životinje, vitaminski dodaci i proizvodi takozvane zdrave hrane (Gouveia i sar., 2008). Među ovim pigmentima najveći komercijalan značaj imaju β -karoten, astaksantin, kantaksantin i lutein (Del Campo i sar., 2007). β -karoten se koristi kao prirodna boja, provitamin vitamina A, antioksidant, dodatak šumećih multivitaminskih preparata i proizvoda takozvane zdrave hrane (Gouveia i sar., 2008). Deficit vitamina A predstavlja ogroman zdravstveni problem i ima čitav niz negativnih efekata na zdravlje.

Karotenoidi koji se mogu dobiti iz mikroalgi predstavljaju dobru alternativu prirodnim bojama biljnog porekla, pri čemu manipulacijom uslova kultivacije sadržaj karotenoida kod nekih mikroalgi može dostići vrednost do 140 mg/g suve biomase (Spolaore i sar., 2006). Glavni karotenoidi cijanobakterija su β -karoten, hidroksilni derivati β -karotena zeaksantin i nostoksantin, keto derivati β -karoten ehinenon i kantaksantin, i karotenoid glikozidi miksoli 2'-metilpentozi i osciloli 2,2'-di-metilpentozi. Prema Takaichi i Mochimaru (2009), cijanobakterije se mogu klasifikovati u dve grupe na osnovu sastava karotenoida; jedna grupa sadrži ketokarotenoide, kao i glikozide miksola i/ili osciloli diglikozide, koji su jedinstveni karotenoidi cijanobakterija i ne nalaze se kod drugih fototrofnih organizama, dok druga grupa ne sadrži ketokarotenoide, kao ni glikozide miksola i diglikozide oscilola.

2.4.2. Cijanobakterije kao izvor fikobiliproteinskih pigmenata

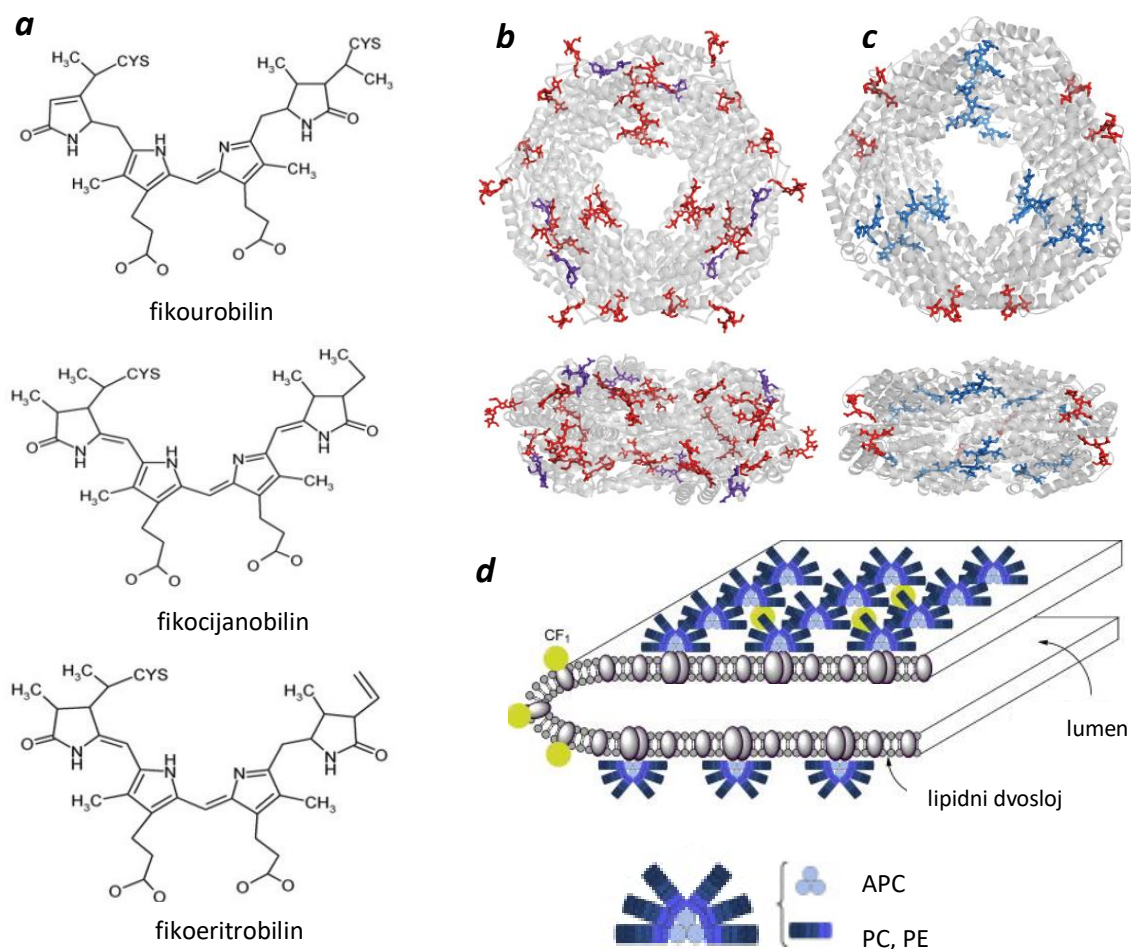
Fikobiliproteini su vodorastvorljivi proteini, pronađeni u ćelijama cijanobakterija u kojima imaju funkciju antena pigmenata. Upravo njihovo prisustvo određuje naziv i boju razdela cijanobakterija (grč. *κυανός* (kyanós) = plavo) i crvenih algi, dok su pronađeni i kod razdela *Glaucophyta* i *Cryptophyta* (Stadnichuk i Tropin, 2017).

Molekul fikobiliproteina se sastoji iz α - i β - polipeptidne subjedinice za koje su hromofore vezane tioestarskom vezom preko aminokiselina Cys α -84 i Cys β -84. Po hemijskoj strukturi, hromofore su linearni tetrapiroli, slične žučnim pigmentima, zbog čega su nazvane fikobilini. Kod cijanobakterija postoji četiri vrste fikobilina: fikocijanobilin, fikoeritrobin, fikourobilin i fikoviobilin (Slika 5a). U zavisnosti od broja hromofora u $(\alpha\beta)_1$ -monomeru, fikobiliproteini se mogu podeliti u tri klase koje se međusobno razlikuju i po boji:

- Alofikocijanini (APC, plavkasto zeleni) - nose dve hromofore;
- Fikocijanini (PC, plavi) i fikoeritrocijanini (PEC, narandžasti) - nose tri hromofore;
- Fikoeritrini (PE, crveni) - nose pet ili šest hromofora.

Ovi pigmenti imaju veoma jak kapacitet za samoagregaciju; tri $(\alpha\beta)_1$ -monomera obrazuju trimer u vidu pljosnatog diska, koji se spaja sa drugim trimerom u heksamer (Slika 5b i 5c). U ćelijama cijanobakterija fikobiliproteini se nalaze u obliku proteinskih kompleksa – fikobilizoma, koji su pričvršćeni sa spoljašnje strane membrane tilakoida u vidu granula (Slika 5d). Fikobilizomi većine cijanobakterija su poludiskoidnog oblika i sastavljeni iz cilindara - 3 u jezgri i 6 dužih raspoređenih u polukrug (bočni cilindri) (Slika 5d). Dužina bočnih cilindara varira od 1 do 7 diskova heksamera, u zavisnosti od vrste cijanobakterije i uslova rasta. Kako jezgro sadrži samo APC, varijacije u sastavu pigmenata unutar vrste cijanobakterije nastaju zbog bočnih cilindara koji mogu biti formirani samo iz C-PC, ili se PE kači za C-PC/C-PE/CU-PE. Kod nekih vrsta postoje varijacije, a poznata je i četvoropigmentna varijanta fikobilizoma (Stadnichuk i Tropin, 2017).

Fikobiliproteinima se pripisuju različita zdravstvena svojstva, uključujući snažno antioksidativno, antiinflamatorno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno, imunomodulatorno, antikancerogeno, hipoholesterolemično (Gantar i Svirčev, 2008; Plaza i sar., 2009) i antibakterijsko dejstvo (Sarada i sar., 2011; Najdenski i sar., 2013). Neka medicinska svojstva



Slika 5. (a) – hemijska struktura fikobilina, (b) – trimer i heksamer fikoeritrina, (c) - trimer i heksamer fikocijanina, (d) – fikobilizomi

(modifikovano Figueroa i sar., 2012; Dumay i sar., 2014)

roda *Spirulina* se pripisuju upravo plavom pigmentu C-fikocijaninu (C-PC). Jedan od prvih izveštaja o njegovom korisnom efektu citira japanski patent # 58-65216, koji ukazuje na to da C-PC iz roda *Spirulina* značajno povećava stopu preživljavanja miševa kojima su injektirane tumorske ćelije jetre. Kasnije je ustanovljeno da je mehanizam koji inhibira rast tumorskih ćelija stimulacija imunog sistema (Gantar i sar., 2012) što ukazuje na imunomodulatornu aktivnost ovog pigmenta.

Područje moderne aplikacije fikobiliproteina je veoma široko, jer su ovi pigmenti važni kao prirodni koloranti, antioksidanti i fluorescentni markeri. Fikocijanin je jedna od najperspektivnijih komercijalnih supstanci spiruline, koja se proizvodi u Japanu kao prirodni kolorant hrane *Linablue*[®]. U Japanu i Kini se koristi u prehrambenim proizvodima kao što su žvakaće gume, bombone, mlečni proizvodi, žele i bezalkoholna pića (Gouveia i sar., 2008). Ovaj pigment ima dvostruku funkciju u hrani i biološki aktivnim suplementima – kao kolorant i imunostimulator i smatra se boljim u odnosu na druge prirodne plave boje (gardenija, indigo), jer proizvodima daje svetliju plavu boju. Takvi proizvodi su

najpopularniji u zemljama tropske i suptropske zone: Burmi, Indoneziji, Hong Kongu, Koreji, Maleziji, zemljama Persijskog zaliva i Japanu, odakle se u manjim količinama izvoze u SAD, Evropu i druge zemlje (Stadnichuk i Tropin, 2017).

Zahvaljujući svojstvu fluorescencije, fikobiliproteini su pogodni za fluorescentne analize visoke rezolucije, tako da su našli primenu u histohemiji, protočnoj citometriji, razdvajanju ćelija zasnovanom na fluorescenciji, fluorescentnoj imunodijagnostici i detekciji makromolekula. Fluorescencija C-fikocijanina, koja se posmatra direktno u ćelijama, se može koristiti za praćenje rasta cijanobakterija u prirodnim sredinama, detekciju indeksa čistoće vode i analizu jezera na visokim nadmorskim visinama. Fikoeritrin, crveni pigment iz grupe fikobiliproteina, koristi se zajedno sa fluoresceinom za obeležavanje antitela, koje se smatra obećavajućim u dijagnostici onkoloških bolesti i sindroma stečene imunodeficijencije (SIDA). Fikoeritrin se koristi kao fluorescentni agens u proteomičkim i genomičkim analizama u dizajnu DNK mikroereja (Stadnichuk i Tropin, 2017).

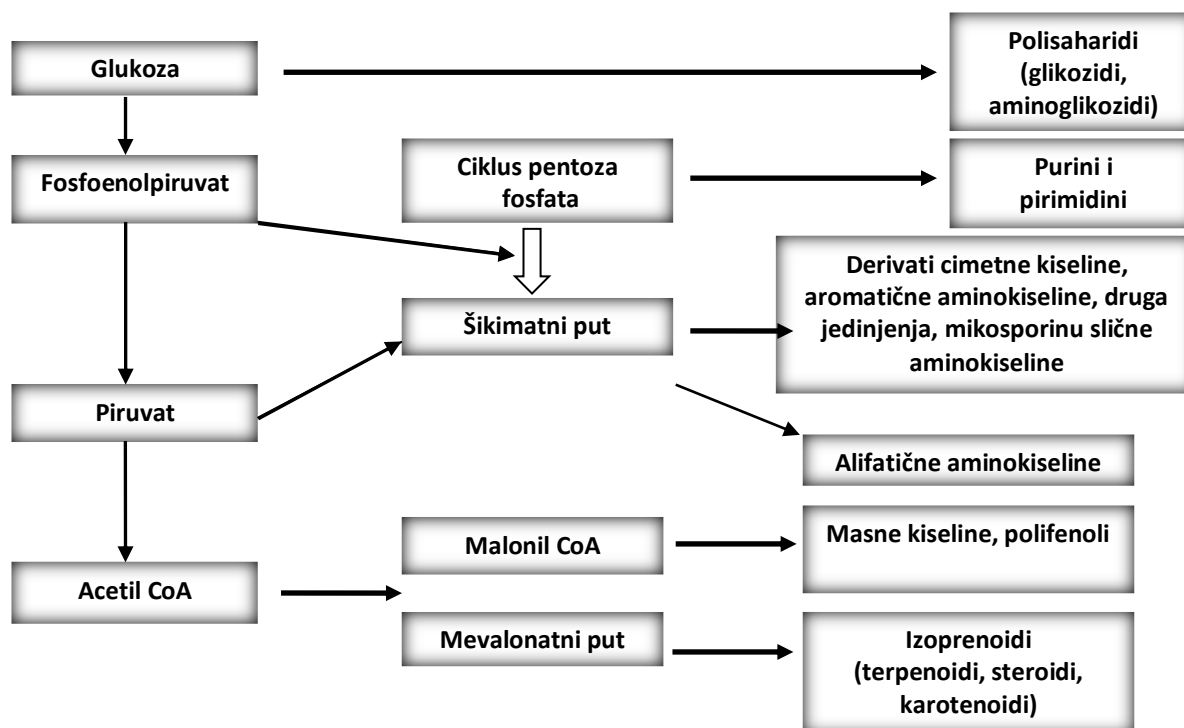
Interesantna pojava koja se javlja kod cijanobakterija je promena pigmentacije u zavisnosti od talasnih dužina kojima su izložene (kvaliteta svetlosti), poznata kao *komplementarna hromatska adaptacija*, a rezultat je izmene u sastavu fikobilizoma (Grossman i sar., 2001). Pokazano je da je kod cijanobakterija koje na beloj svetlosti sadrže PE i PC, pod crvenim svetlom supresovana sinteza PE, a pod zelenim svetlom sinteza PC (Ravelonandro i sar., 2008). Ovaj fenomen je značajan za biotehnologiju cijanobakterija u pogledu mogućnosti povećanja produkcije određenog fikobiliproteina. Tako je kod dve azotofiksirajuće cijanobakterije sa visokim sadržajem PE, sadržaj ovog pigmenta povećan upotrebom zelenog svetla, dok je crveno svetlo indukovalo povećan sadržaj PC, uz znatno smanjen nivo PE (Rodríguez i sar., 1991).

Kod cijanobakterija fikobiliproteini su različito distribuirani; glavni fikobiliproteini su C-PC i APC, dok je PE pronađen kod samo oko 30% vrsta. Ovi pigmenti mogu predstavljati do 60% ukupnog sadržaja proteina ili 20% suve mase ćelije (Stadnichuk i Tropin, 2017). Sa sadržajem PC od 10-20%, vrsta *S. platensis* je glavni komercijalni izvor ovog pigmenta i najbolja prirodna plava boja za hranu (Chaneva i sar., 2007). Iako su PC i APC kvantitativno dominantni pigmenti u okviru roda *Spirulina*, kod soja *Spirulina subsalsa* 3F registrovana je visoka koncentracija PE, koji je činio oko 20% ukupnih ćelijskih proteina i bio preko 10 puta veći u odnosu na sadržaj hlorofila *a*, zbog čega je ova spirulina imala crvenu pigmentaciju (Tomaselli i sar., 1995). Fikoeritrin je registrovan kao glavni pigment i kod nekoliko sojeva roda *Nostoc*, čineći do 10% suve mase (Moreno i sar., 1995), dok je kod jednog soja roda *Anabaena* iznosio 8,3% suve mase (Rodriguez i sar., 1989). Kod azotofiksirajućih cijanobakterija, fikobiliproteini obično čine oko 50% ukupnih ćelijskih proteina (Moreno i sar., 1995). Nedavna istraživanja ukazuju da je soj *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5, sa sadržajem fikobiliproteina do 696 mg/g suve mase, obećavajuć kandidat za proizvodnju ovih pigmenta na komercijalnom nivou. Ovako visoka produkcija je dobijena kombinacijom pH vrednosti medijuma, dodatkom nitrita i saharoze kao izvora azota i ugljenih hidrata, i

osvetljavanjem kulture plavim svetlom (Khattar i sar., 2015). Simeunović i sar. (2013) su pokazali da sadržaj fikobiliproteina kod cijanobakterija zavisi naročito od izvora azota u odgajivačkoj podlozi, pri čemu je kod testiranih sojeva rodova *Nostoc* i *Anabaena* dostupnost azota uticala na sastav fikobiliproteinskih pigmenata, ali ne i na njihov ukupan sadržaj. Takva istraživanja ukazuju na mogućnost regulacije produkcije ovih pigmenata manipulacijom nutritivnih uslova tokom kultivacije cijanobakterija.

2.5. CIJANOBAKTERIJE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH METABOLITA

Do danas je iz prirodnih resursa izolovan impresivan broj biološki aktivnih agenasa, često se bazirajući na njihovoj upotrebi u tradicionalnoj medicini. U različitim delovima sveta cijanobakterije se vekovima tradicionalno koriste u ishrani ili medicinske svrhe. Potencijal ovih mikroorganizama je izvanredan, jer produkuju različita jedinjenja uključujući pigmente, vitamine, antioksidante, fenolna jedinjenja, polinezasićene masne kiseline (Slika 6), kao i čitav spektar sekundarnih metabolita kojima se pripisuju različite biološke aktivnosti poput antikancerogene, antibakterijske, antivirusne, antifungalne i imunostimulatorne (Svirčev, 2005; Jones i sar., 2009; Nunnery i sar., 2010; Simeunović, 2010; Singh, 2011; Najdenski i sar., 2013).



Slika 6. Glavni putevi biosinteze nekih primarnih i sekundarnih metabolita (modifikovano Mostafa, 2012)

Medicinski kvaliteti cijanobakterija su prvi put prepoznati 1500 god. pre nove ere, kada su vrste roda *Nostoc* korišćene za lečenje gihta, fistula i nekoliko oblika kancera, dok su opsežnija naučna ispitivanja započeli Moore i Gerwick 1990-ih godina (Singh, 2011). U naporima koji se ulažu za otkriće novih lekova, cijanobakterije predstavljaju jedan od vodećih izvora (Jones i sar., 2009). Samo nekoliko grupa organizama, kao što su miksobakterije i streptomicete se odlikuju sličnim potencijalom (Nunnery i sar., 2010). Kako bi preživele u izuzetno kompetitivnom okruženju, često izložene ogromnim fluktuacijama hemijskih i

fizičkih faktora, cijanobakterije su razvile defanzivne i adaptivne strategije koje uključuju sintezu najraznovrsnijih jedinjenja poreklom iz različitih metaboličkih puteva (Najdenski i sar., 2013). Istraživanja puteva biosinteze ovih jedinjenja, upotpunjena sekvencioniranjem genoma, otkrivaju jedinstvene enzimске mehanizme koji u živom svetu nisu uopšte ili su retko opisani. Cijanobakterije produkuju raznovrstan spektar metabolita koji su uglavnom rezultat integracije enzima neribozomalnih peptid sintetaza (NRPSs, uključeni u povezivanje aminokiselina) i poliketid sintaza (PKSs, uključeni u povezivanje acetatnih jedinica) (Jones i sar., 2009). Ovi multifunkcionalni enzimi se odlikuju modularnom strukturom i sadrže visoko konzervirane regione, uključene specifično u aktivaciju i kondenzaciju aminokiselina (Silva-Stenico i sar., 2011). Nastala jedinjenja bogata azotom su dalje često podložna neobičnim modifikacijama poput halogenovanja, metilacija i oksidacija (Jones i sar., 2009). Štaviše, genetskom manipulacijom NRPS gena se mogu uvesti dodatne strukturne modifikacije, što omogućava proizvodnju potpuno novih prirodnih proizvoda (Silva-Stenico i sar., 2011). U studiji u kojoj je testirano 50 brazilskih izolata cijanobakterija je otkrivena široka rasprostranjenost NRPS i PKS gena - kod 92% i 80% testiranih sojeva, respektivno, kao i njihovo prisustvo/odsustvo kod sojeva istog roda, ili čak iste vrste. Smatra se da bi se sekvenciranjem ovih genskih fragmenata koji kodiraju domene za adenilaciju i keto-sintazu mogla predvideti sposobnost produkcije sekundarnih metabolita (Silva-Stenico i sar., 2011).

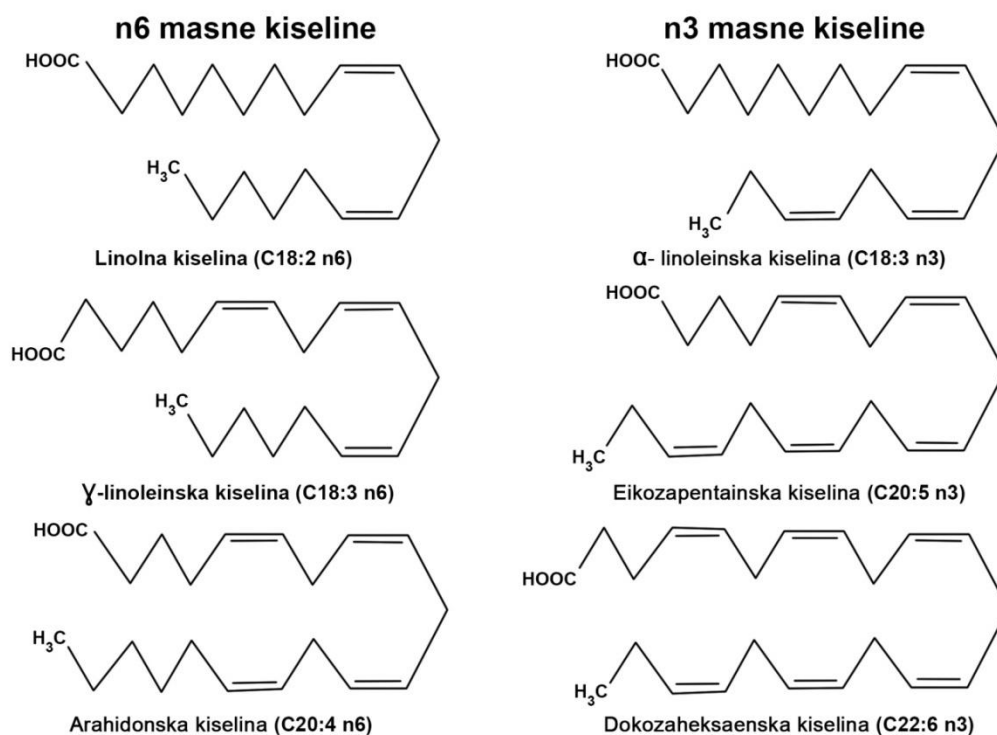
Većina izolovanih bioaktivnih jedinjenja cijanobakterija spada u grupu poliketida, amida, alkaloida i peptida (Silva-Stenico i sar., 2011), ali uključuju i masne kiseline, bromofenole, polisaharide i alkohole (Svirčev i sar., 2008). Postoji indikacija da bi terestrične cijanobakterije mogle posedovati veću biološku aktivnost u odnosu na akvatične, što bi se moglo pripisati adaptacionim mehanizmima potrebnim za opstanak u uslovima ponavljano isušivanja (Svirčev i sar., 2008).

2.5.1. Cijanobakterije kao izvor masnih kiselina

Masne kiseline su jedinjenja veoma važna za ishranu, koja se na osnovu prisustva dvostruke veze mogu klasifikovati na zasićene, mononezasićene i polinezasićene. Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke veze, niti druge funkcionalne grupe duž osnovnog ugljeničnog lanca, dok nezasićene poseduju jednu ili više dvostrukih veza (mono- i polinezasićene), a na ugljenikovim atomima koji obrazuju dvostruku vezu se pored vodonika vezuju i različite funkcionalne grupe.

Polinezasićene masne kiseline imaju ključnu ulogu u ćelijskom metabolizmu (Cardozo i sar., 2007). Polinezasićene masne kiseline sa prvom dvostrukom vezom na trećem (n3) ili šestom (n6) atomu ugljenika (Slika 7) se nazivaju esencijalnim i moraju se unositi hranom jer se ne mogu samostalno proizvesti u ljudskom organizmu (Ambrozova i sar., 2014). Iz grupe n3 esencijalna masna kiselina je α -linoleinska kiselina (C18:3 n3), dok je iz grupe n6

esencijalna linolna kiselina (C18:2 n6) (Gubić, 2016). Ove dve masne kiseline nastaju postepenom desaturacijom oleinske kiseline u endoplazmatičnom retikulumu i kloroplastima biljaka. Ljudski organizam ne može da sintetiše α -linoleinsku kiselinu zbog nedostatka $\Delta 12$ i $\Delta 15$ desaturaza potrebnih za njenu sintezu iz stearinske kiseline (C18:0) ili iz n3 i n6 polinezasićenih masnih kiselina (Ambrozova i sar., 2014). Konverzijom α -linoleinske kiseline nastaje prvo eikozapentaenska kiselina (C20:5 n3), a potom dokozaheksaenska kiselina (C22:6 n3), dok iz linolne kiseline nastaje arahidonska kiselina (C20:4 n6) (Gubić, 2016). Glavne zasićene masne kiseline kod algi su one sa 12, 14, 16 i 18 C-atoma, dok nezasićene imaju od 16 do 22 C-atoma i sadrže od 1 do 6 dvostrukih veza cis-konfiguracije (Behrens i Kyle, 1996). Kod cijanobakterija dominiraju masne kiseline sa 16 i 18 C-atoma (Patil i sar., 2007; Guedes i sar., 2011; Thingujam i sar., 2015), pri čemu su najzastupljenije palmitinska i palmitoleinska (Behrens i Kyle, 1996), dok su vrste roda *Spirulina* prepoznate kao bogat izvor γ -linolenske kiseline (Ambrozova i sar., 2014).



Slika 7. Hemijska struktura n3 i n6 masnih kiselina

Masne kiseline, a naročito esencijalne, su veoma važan deo ishrane. Savremena ishrana je poznata po povećanom unosu zasićenih i n6 masnih kiselina, što rezultuje disbalansom između n3 i n6 masnih kiselina (Ambrozova i sar., 2014). Poslednjih decenija n3 polinezasićene masne kiseline spadaju u biomolekule koji se najčešće inkorporiraju u različite prehrambene i proizvode sa dodatom vrednošću i koriste u vidu dodataka ishrani

(Milovanović, 2016). Kako ove masne kiseline imaju ključnu ulogu u mnogim biohemijским putevima, njihov unos rezultuje višestrukim zdravstvenim benefitima, naročito kardioprotektivnim efektima (koji proizilaze iz njihovog antiaterogenog, antitrombotičnog, antiinflamatornog, antiaritmijskog i hipolipidemijskog efekta), ali i zdravstvenim koristima zasnovanim na kompleksnom uticaju na koncentracije lipoproteina, fluidnost bioloških membrana, funkciju membranskih enzima i receptora, modulaciju produkcije eikozanoida, regulaciju krvnog pritiska i metabolizam minerala (Ambrozova i sar., 2014). Dokozaheksaenska kiselina je takođe esencijalan nutrijent za mozak fetusa u razvoju i optimalnu funkciju mrežnjače odojčadi (McCann i Ames, 2005). Arahidonska kiselina koja se nalazi u membranama nervnih ćelija je od suštinskog značaja u toku neonatalnog razvoja bebe (Gubić, 2016). Pored eikozapentaenske, γ -linolenska kiselina (C18:3 n6) je naročito efikasna u smanjuju rizika od srčanih oboljenja i ateroskleroze (Kerby i Stewart, 1987). Ova masna kiselina je veoma važan prekursor u sintezi prostaglandina i pomaže u lečenju različitih bolesti uključujući artritis, srčane bolesti, gojaznost, alkoholizam, depresiju, šizofreniju, Parkinsonovu bolest, multiplu sklerozu (Kerby i Stewart, 1987).

Glavni izvor esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina je riblje ulje (Ambrozova i sar., 2014). Međutim, za korišćenje ovog izvora su vezani mnogi problemi: 1) živa i nivoi polihlorovanih bifenila (PCB) su često neprihvatljivi za pojedine potrošače, naročito decu i trudnice (nervni sistem fetusa u razvoju je veoma osetljiv i na niske nivoe ovih kontaminanata); 2) neprijatan miris; 3) nisu pogodne za vegetarijance; 4) problem održivog korišćenja riba kao izvora (mnoge vrste su izlovljene skoro do istrebljenja) (Spolaore i sar., 2006; Cannon, 2009). Sa druge strane, ribe ne mogu da sintetišu esencijalne polinezasićene masne kiseline zbog nedostatka ključnih enzima, tako da je visok nivo ovih masnih kiselina u ribljem ulju direktna posledica njihove ishrane morskim mikroorganizmima i algama, koje su primarni producenti polinezasićenih masnih kiselina u vodenim ekosistemima (Ambrozova i sar., 2014). Kako mikroalge mogu dostići mnogo veću produktivnost i sadržaj ovih jedinjenja u poređenju sa drugim izvorima, polinezasićene masne kiseline mikroalgalnog porekla imaju vrlo obećavajuće tržište za biotehnoške proizvode za ishranu ljudi i životinja. Štaviše, pošto su ćelije mikroalgi bogate antioksidantnim karotenoidima i vitaminima, a lipidi bioinkapsulirani ćelijskim zidom, mikroalge bi mogle biti superiornije od tradicionalnih polinezasićenih masnih kiselina u pogledu stabilnosti lipida (Patil i sar., 2007).

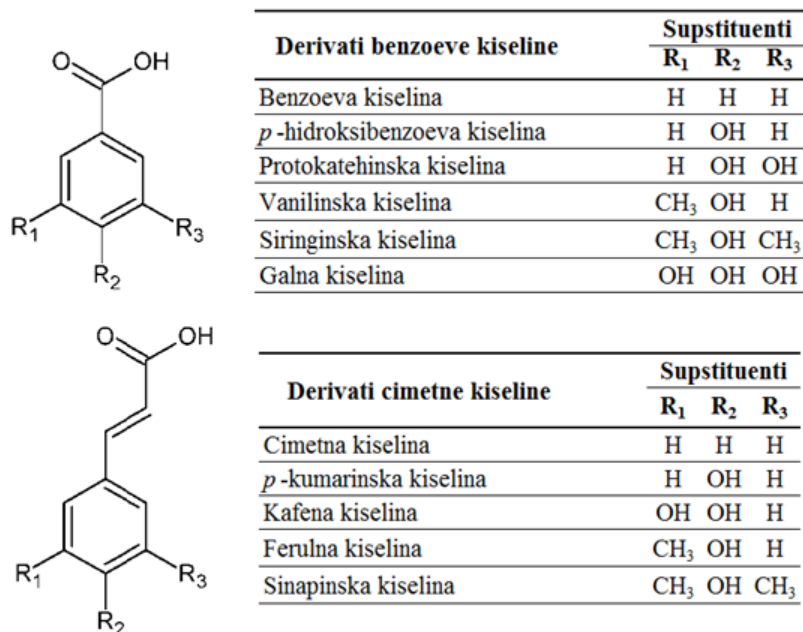
Masne kiseline mikroalgalnog porekla su danas dostupne u obliku dijetetskih suplemenata i inkorporirane u različite prehrambene proizvode. Na tržištu su dostupni preparati mikroalgi poput spiruline i hlorele u vidu kapsula ili kapleta, kao i u hrani i piću sa terapijskim dejstvom u lečenju hiperholesterolemije, hiperlipidemije i ateroskleroze (Eussen i sar., 2010). Mikroalgalna ulja bi mogla biti naročito dobro rešenje za decu, trudnice, vegetarijance i pacijente sa alergijama na ribu. Tako je mikroalgarno ulje *Life'sDHA*TM bogato dokozaheksaenskom kiselinom i ulazi u sastav formula mleka za mlađu odojčad, dok preparati poput *DHAid*TM i *V-Pure* predstavljaju vegetarijanski izvor dokozaheksaenske i

eikozapentaenske kiseline (cit. u Kovač i sar., 2013). Iako bi transgene alge mogle biti alternativni održivi izvor masnih kiselina za ishranu ljudi, ovu mogućnost trenutno ograničava odbojnost potrošača prema genetski modificovanoj hrani. Jedna alternativa bi bila da se transgene alge koriste kao izvor hrane u akvakulturi, čime bi se izbegla direktna ingestija GMO (Mostafa i sar., 2012). Pokazano je da je na primer ishrana koka nosilja mikroalgama u cilju proizvodnje "OMEGA" jaja profitabilna (Pulz i Gross, 2004).

2.5.2. Cijanobakterije kao izvor fenolnih jedinjenja

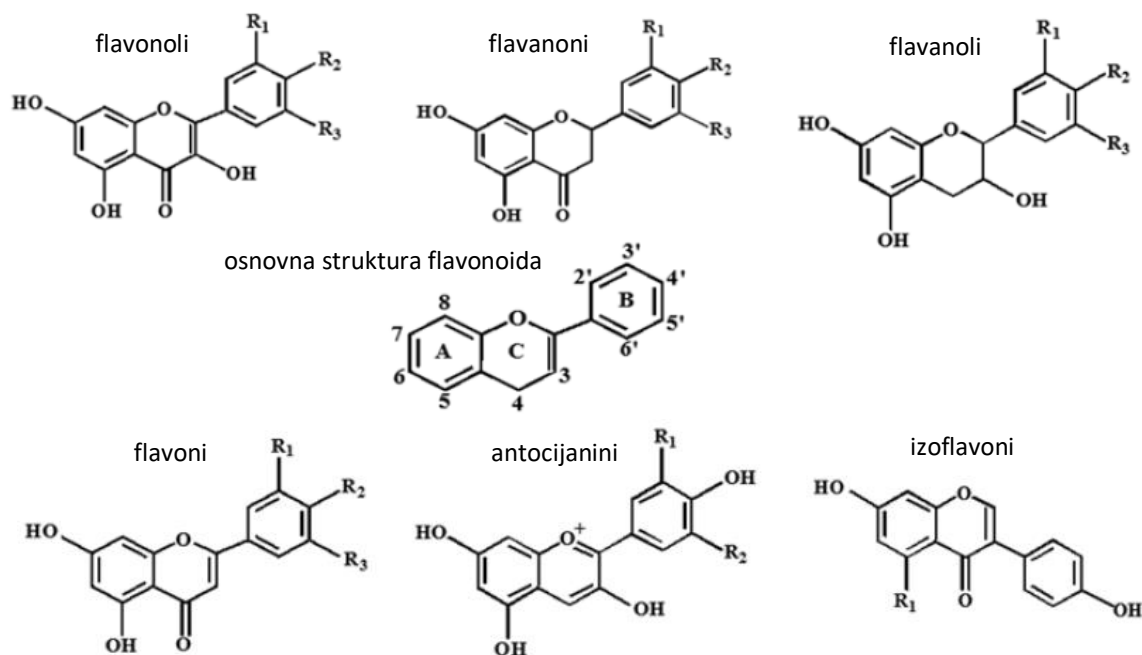
Fenolna jedinjenja su supstance koje poseduju aromatični prsten za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa. Sinteza prirodnih aromatičnih jedinjenja se odvija kroz dva biosintetička puta - ciklusa šikiminske kiseline u kojem se iz šikiminske kiseline formiraju aromatične aminokiseline (fenilalanin, tirozin, triptofan) i acetatno-malonatnog ciklusa. Početni koraci biosinteze fenola takođe uključuju i fenilpropanoidni put u kojem se fenilalanin prevodi do trans-cinamata pod uticajem fenilalanin-amonijak lijaze (PAL), čime se protok ugljenika usmerava ka granama fenilpropanoidnog metabolizma (Veličković, 2013). Hemijski, polifenoli se mogu podeliti u nekoliko klasa, uključujući fenolne kiseline (hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline) (Slika 8), flavonoide (flavonoli, flavanoni, flavanoli, flavoni, antocijanini, izoflavoni) (Slika 9), izoflavonoide (izoflavoni, kumestani), stilbene, lignane i polimere fenola (proantocijanidini-kondenzovani tanini i hidrolizujući tanini) (Manach, 2004).

Poznato je da je antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja vezana za stepen i obrazac hidroksilacije i stepen konjugacije, tako da su polifenoli efikasniji antioksidanti od monofenola, dok bi reaktivnost mogla biti veća kod jedinjenja sa hidroksi grupom u *meta* i *para* položaju, kao i za derivate cimetne kiseline (Onofrejevaa i sar., 2010). Smatra se da fenolna jedinjenja, uključujući flavonoide, fenolne kiseline i tanine najviše doprinose antioksidativnim svojstvima viših biljaka, pri čemu poseduju i različite biološke aktivnosti (Li i sar., 2007). Fenolne kiseline su povezane i sa mnogim aspektima kvaliteta hrane, uključujući boju, ukus i nutritivna svojstva (Veličković J. 2013). Poslednjih godina veliko interesovanje su izazvali flavonoidi zbog niza korisnih zdravstvenih svojstava, uključujući antiviralno, antialergijsko, antiagregaciono, antiinflamatorno, antitumorsko i antioksidativno dejstvo (Tanwar i Modgil, 2012). Ova jedinjenja pokazuju nekoliko antioksidativnih mehanizama - mogu da inhibiraju lipidnu oksidaciju heliranjem metala, inhibicijom lipoksigenaze i direktnim hvatanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta poput $\cdot\text{OH}$, HOCl , singletnog kiseonika i lipid-peroksil radikala (Pietta, 2000). Neka istraživanja povezuju unos flavonoida sa zaštitnim efektom kod kardiovaskularnih bolesti i različitih kancera (Manach, 2004; Tanwar i Modgil, 2012).



Slika 8. Hemijska struktura fenolnih kiselina

Vrlo mali broj fenolnih jedinjenja pronađenih u biljkama, i većina onih iz gljiva, ima poreklo koje ne uključuje fenilalanin/tirozin (Babaoglu Aydas i sar., 2013). Kada su u pitanju alge, samo kod nekih vrsta određenih razdela pronađena su netipična fenolna jedinjenja: kolpol (*Phaeophyta*), kumarini, derivati vanilinske kiseline (*Chlorophyta*), pigment marenin (*Bacillariophyta*), tihokarpoli (*Rhodophyta*). Mikosporinu slične aminokiseline (MAA) su pronađene kod nekoliko razdela mikroalgi (uglavnom *Cyanophyta* i *Rhodophyta*), kao i bromofenoli (*Rhodophyta*, *Phaeophyta*, *Chlorophyta*), dok je lignin, za koji se ranije smatralo da je ograničen samo na vaskularne kopnene biljke, otkriven kod marinske vrste *Calliarthron cheilosporioides* (*Rhodophyta*) (Freile-Pelegrin i Robledo, 2013). U nedavnom istraživanju je utvrđeno da su određeni prehrambeni proizvodi algi, prvenstveno vrsta *Eisenia bicyclis* (*Phaeophyta*), imali veći antioksidativni kapacitet vodorastvorljivih jedinjenja i sadržaj fenolnih jedinjenja u poređenju sa lekovitim biljem, voćem bogatim vitaminom C i povrćem (Machu i sar., 2015). Kod nekih marinskih vrsta mrkih algi su otkrivene anti-HIV, antikancerogena, baktericidna, antialergijska i druge zdravstveno korisne biološke aktivnosti koje se povezuju sa prisustvom florotanina (Thomas i Kim, 2011), fenolnih jedinjenja koja su prisutna samo kod predstavnika ovog razdela, tako da je nekoliko kompanija počelo sa proizvodnjom standardizovanih fenolnih (florotaninskih) ekstrakata iz mrkih algi. Ovi suplementi su namenjeni prvenstveno za prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Freile-Pelegrin i Robledo, 2013).



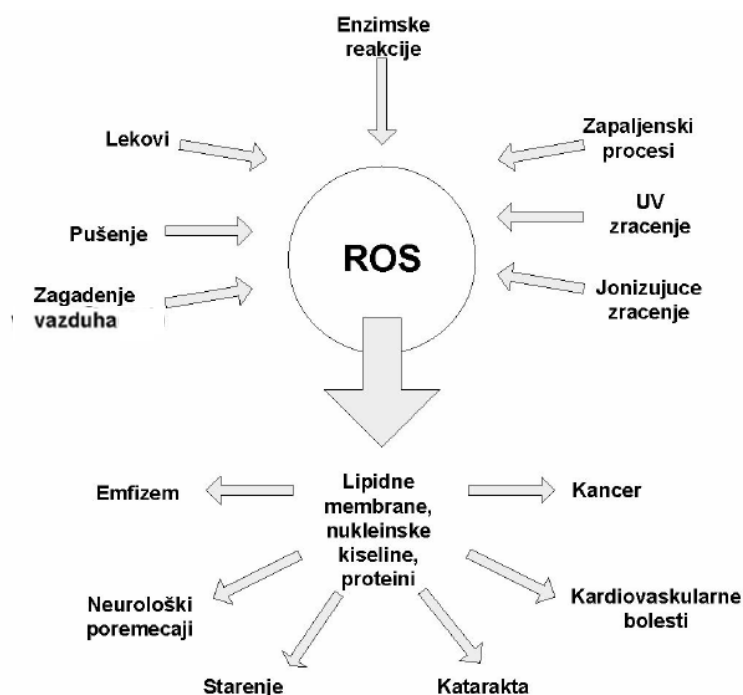
Slika 9. Hemijska struktura flavonoida

Kada su u pitanju mikroalge generalno, a naročito cijanobakterije, izuzetno je malo literarnih podataka koji se odnose na produkciju fenolnih jedinjenja. Smatra se da cijanobakterijska PAL deli sličnu supstratnu selektivnost i kinetičku aktivnost prema L-fenilalaninu i L-tirozinu (Babaoglu Aydas i sar., 2013). Kod cijanobakterija fenolne kiseline su detektovane u nekoliko istraživanja (Miranda i sar., 1998; Abd El-Baky i sar., 2009; Babaoglu Aydas i sar., 2013; Babić i sar., 2016; Ijaz i Hasnain, 2016), metabolički kapacitet za produkciju flavonoida je prisutan u svim glavnim evolutivnim linijama (Goiris i sar., 2012), a u nekoliko istraživanja su detektovani i tanini (Shalaby i Shanab, 2013; Sharathchandra i Rajashekhar, 2013). Štaviše, pokazano je da sadržaj fenola u biomasi cijanobakterija može biti značajno povećan manipulacijom uslova kultivacije, kao što su koncentracija natrijum nitrata, temperatura (Colla i sar., 2007) i dodavanje L-fenilalanina u odgajivačku podlogu (Babaoglu Aydas i sar., 2013). U biomasi vrste *S. platensis* je upotrebom odgovarajućeg svetlosnog tretmana sadržaj fenolnih jedinjenja povećan osam puta, čime je povećan antioksidativni potencijal biomase kao dijetetskog suplementa (Kepekçi i Saygideger, 2012).

2.5.3. Cijanobakterije kao izvor antioksidanata

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli koji u svojoj strukturi imaju jedan ili više nesparenih elektrona, i koji u reakciji sa makromolekulima poput lipida, proteina, ugljenih

hidrata i nukleinskih kiselina mogu dovesti do njihovog oštećenja, kao i lančane reakcije koja rezultira stvaranjem sve većeg broja slobodnih radikala, čime se remete normalni ćelijski mehanizmi. Slobodni radikali nastaju u normalnim endogenim metaboličkim procesima, patofiziološkim stanjima i putem izlaganja spoljašnjim fizičko-hemijskim uslovima (polutanti, dim, ksenobiotici, zračenje, itd.) (Slika 10) (Veličković, 2013; Agyei i sar., 2015). U najvažnije slobodne radikale bioloških sistema spadaju reaktivni oblici kiseonika (ROS, *reactive oxygen species*), koji uključuju slobodne radikale i određene neradikalne vrste koje su oksidativna sredstva i/ili se lako prevode u radikale (Tabela 2), i reaktivni oblici oksida azota (NO^\bullet i ONOO^-).



Slika 10. Uzroci nastajanja ROS-a i njihovo dejstvo (Veličković, 2013)

Prema najšire prihvaćenoj definiciji, antioksidanti su supstance koje u koncentracijama znatno nižim od koncentracije supstrata koji može da se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju njegovu oksidaciju (Halliwell, 1990). Antioksidanti mogu da budu sintetisani u ljudskom organizmu ili uneti putem ishrane. Prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu, klasifikuju se na: 1) preventivne - sprečavaju nastanak slobodnih radikala; 2) „skevendžer“ - poseduju sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala; i 3) „reparacione“ - obnavljaju ili uklanjaju oštećene vitalne biomolekule nastale u uslovima oksidativnog stresa (Shi i sar., 2001). S obzirom na raznovrsnu strukturu ovih jedinjenja, mehanizmi kojima ostvaruju aktivnost u sistemu antioksidantne zaštite su različiti.

Tabela 2. Najvažniji reaktivni oblici kiseonika

Slobodni radikali	Neradikalski oblici
superoksid anjon radikal O_2^{\bullet}	singlet kiseonik 1O_2
hidroperoksil radikal HOO^{\bullet}	organski peroksidi ROOH
hidroksil radikal HO^{\bullet}	vodonik peroksid H_2O_2
alkil i alkoksil radikali R^{\bullet} , RO^{\bullet}	
peroksil radikal ROO^{\bullet}	

Slobodni radikali imaju ključne uloge u redoks ćelijskoj signalizaciji i homeostazi, i u normalnim uslovima njihova produkcija je u stalnoj ravnoteži sa antioksidantnim odbrambenim sistemom. Narušavanje ovog ravnotežnog stanja u organizmu naziva se oksidativni stres (Sies, 1985) i povezuje se sa skoro 200 bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, kancer, aterosklerozu, hipertenziju, ishemiju, šećernu bolest (diabetes mellitus), hiperoksaluriju, neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova i Parkinsonova bolest), reumatoidni artritis i starenje (Rop i sar., 2012).

Upotreba hrane bogate antioksidantima bi mogla biti najrelevantniji faktor u prevenciji bolesti vezanih za oksidativni stres (Vaz i sar., 2010). Nekoliko epidemioloških istraživanja ukazuje da je česta konzumacija prirodnih antioksidanata povezana sa smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti i kancera. Tako je u Japanu i mediteranskoj Južnoj Evropi zabeležena niža stopa smrtnosti od koronarne bolesti srca i niži nivo ukupnog holesterola u poređenju sa Severnom Evropom i SAD, što se može povezati sa ishranom bogatom voćem i povrćem koje sadrži velike količine vitamina, flavonola i polifenola (Freile-Pelegrin i Robledo, 2013).

Pored opisanih bioloških oštećenja, lipidna peroksidacija koja je inicirana delovanjem ROS predstavlja i osnovni uzrok kvarenja kozmetičkih proizvoda i jedan od osnovnih uzroka kvarenja hrane. Pored promene organoleptičkih i hranljivih karakteristika, produkti nastali u ovom procesu utiču na zdravstvenu bezbednost, boju, ukus i konzistenciju hrane (Veličković, 2013). Zbog toga se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji koriste mnogi sintetički komercijalni antioksidanti, uključujući butilovani hidroksitoluen (BHT), butilovani hidroksianizol (BHA), 2-*terc*-butilhidroksihinon (TBHQ), etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA) i galati kao što su propil galat (PG), dodecil galat i oktil galat (Freile-Pelegrin i Robledo, 2013; Agyei i sar., 2015). Poslednjih godina, potražnja za prirodnim antioksidantima je u naglom porastu zbog povezivanja većine sintetičkih antioksidanata sa visokom toksičnošću i kancerogenim ili mutagenim efektima (Agyei i sar., 2015).

Većina, ako ne i svi komercijalno dostupni prirodni antioksidanti se dobijaju iz kopnenih biljaka (ruzmarin, čaj, grožđe, kora bora, kakao i dr.) (Goiris i sar., 2012). Rastuće

tržište novih antioksidanata opravdava sveobuhvatne pretrage ekonomičnijih, manje konvencionalnih izvora, u koje se svakako svrstavaju mikroalge i cijanobakterije. Biljke generalno, a mikroalge naročito, su dobri izvori prirodnih antioksidanata. Kako se kiseonik lako aktivira UV zračenjem ili toplotom sunčeve svetlosti u toksične ROS, biljke i mikroalge su razvile zaštitni mehanizam koji se sastoji u sintezi antioksidantnih jedinjenja. U kulturama mikroalgi i cijanobakterija sa velikom gustinom ćelija u zatvorenom fotobioreaktoru, koncentracije kiseonika mogu biti veoma visoke, što dovodi do povećane akumulacije visoko efikasnih antioksidativnih skevendžer kompleksa, tako da se na primer kod vrste *S. platensis* antioksidativni potencijal tokom oksidativnog stresa može povećati 2,3 puta (Pulz i Gross, 2004). Istraživanja koja su sprovedena proteklih godina jasno ukazuju na izuzetan antioksidativni potencijal cijanobakterija (Hajimahmoodi i sar., 2009; Li i sar., 2011; Babaoglu Aydas i sar., 2013; Babić i sar., 2016). Tako su primenom DPPH metode metanolni ekstrakti vrste *Plectonema boryanum* i *Scytonema* sp. ispoljili veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na pozitivnu kontrolu askorbinsku kiselinu (Suhail i sar., 2011), dok je za ekstrakte testiranih sojeva roda *Synechocystis* pri 150 ppm antioksidativna aktivnost bila uporediva sa sintetičkim antioksidantima BHA, BHT i α -tokoferolom (Babaoglu Aydas i sar., 2013). Cijanobakterije reaguju na oksidativni stres putem stimulacije antioksidantnog sistema odbrane koji se sastoji iz enzimskih i neenzimskih mehanizama. Ključni enzimi su superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza i askorbat peroksidaza, dok neenzimski mehanizmi uključuju jedinjenja poput askorbinske kiseline, redukovano glutationa, tokoferola, karotenoida i fikocijanina (Guedes i sar., 2013). Dijetetski antioksidanti obuhvataju tri glavne grupe: vitamine (C i E), karotenoide i fenole, među kojima su fenoli pokazali najveću *in vitro* antioksidativnu aktivnost (Freile-Pelegrin i Robledo, 2013).

Polifenolna jedinjenja deluju na više načina: predajom H - atoma, direktnim „hvatanjem“ slobodnih radikala, heliranjem prooksidativnih jona metala, aktiviranjem antioksidativnih enzima i inhibicijom prooksidativnih enzima (Veličković, 2013). Zbog svojih korisnih antioksidativnih svojstava, fenoli su klasifikovani u kategoriju „potencijalnih funkcionalnih sastojaka“ (Kaur i Das, 2011). Sintetički antioksidanti koji se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji - BHA, BHT, TBHQ i PG su po strukturnim karakteristikama takođe fenolna jedinjenja i njihova antioksidativna aktivnost je u tesnoj vezi sa strukturom (Veličković, 2013).

Pojedini pigmenti cijanobakterija takođe mogu ispoljiti antioksidativnu aktivnost. Karotenoidi imaju važnu ulogu u uklanjanju ROS-a nastalih tokom fotosinteze, naročito singlet kiseonika. Ova jedinjenja mogu neutralisati radikale prenosom H-atoma ili prihvatanjem elektrona od radikala (Veličković, 2013).

U biomasi spiruline je pokazana antioksidativna aktivnost fikobiliproteinskih pigmentata fikocijanina (C-PC) i alofikocijanina (APC) (Estrada i sar., 2001). Većina podataka koji se odnose na C-PC, koji ispoljava antioksidativnu i niz drugih bioloških aktivnosti, pretpostavlja njegovu aktivnost u prevenciji mnogih patoloških stanja uzrokovanih

oksidativnim stresom (Stadnichuk i Tropin, 2017). Pokazano je da C-PC hvata alkoksil, hidroksil i peroksil radikal, reaguje sa peroksinitritom (ONOO⁻) i hipohlornom kiselinom (HOCl) (cit. u Gantar i sar., 2003). Štaviše, Pokazano je da postoje razlike u agregaciji C-PC subjedinica koji je izolovan iz različitih vrsta cijanobakterija (*Spirulina* sp. i *Lyngbya* sp.), i konstatovano da bi to moglo uticati na biohemijske osobine C-PC poreklom iz različitih organizama (Gantar i sar., 2012). Tako su Gantar i sar. (2012) iz vrste *Limnothrix* sp. izolovali C-PC sa najmanjom prijavljenom molekulskom masom, koji je ispoljio antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale sličnu kao prirodni antioksidant rutin.

Za antioksidativnu aktivnost ovih organizama mogu biti odgovorne i polinezasićene masne kiseline, među kojima se naročito ističe oleinska kiselina (Rodriguez-Garcia i Guil-Guerrero, 2008; Plaza i sar., 2009). Fitohemikalije poput steroida, redukujućih šećera, kardijačnih glikozida, saponina, antrahinona i terpenoida, koje su takođe detektovane u cijanobakterijskim ekstraktima, bi mogle ispoljiti veliku dodatnu antioksidativnu aktivnost (Shalaby i Shanab, 2013; Sharathchandra i Rajashekhar, 2013). Pojedinačni antioksidanti u jednom sistemu mogu da deluju preko više mehanizama ili različitim pojedinačnim mehanizmima, u zavisnosti od reakcionog sistema; zbog karakteristika antioksidanata i razlika u mehanizmima reakcije, pri određivanju antioksidativne aktivnosti preporučuje se kombinacija različitih testova (Čiž i sar., 2010).

2.5.4. Cijanobakterije kao potencijalni izvor antibakterijskih agenasa

Kao rezultat brzog porasta infekcija izazvanih bakterijama rezistentnim na konvencionalne antibiotike, trenutno dostupni lekovi su efikasni kod samo jedne trećine infektivnih bolesti (Singh, 2011). Multi rezistentne bakterije koje izazivaju nozokomijalne infekcije, kao što su vankomicin-rezistentne enterokoke (VRE), meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) i AmpC beta-laktamaza produkujuće *Enterobacteriaceae* postaju sve veći problem u kliničkoj praksi (Reinert i sar., 2007). Produkcija beta-laktamaza koja se javlja kod nekih bakterija, kao što su *Klebsiella* spp. i *Escherichia coli*, ima za posledicu rezistenciju na cefalosporine treće generacije. Sa druge strane, kod vrste *Acinetobacter* spp. se javlja rastuća rezistencija na karbapeneme i kolistin, dok su *Pseudomonas* spp. rezistentni na aminoglikozide, karbapeneme i cefalosporine (Novaković, 2015). Kao rezultat rastuće antibiotske rezistencije mikroorganizama, bolesti koje su se ranije lako lečile postaju ozbiljan problem, koji iziskuje intenzivnu potragu za novim i efikasnijim antibakterijskim agensima. U prehrambenoj industriji takođe raste potreba za upotrebom prirodnih konzervanasa koji bi mogli zameniti sintetske aditive.

Većina novih hemijskih entiteta prirodnog porekla koji su uvedeni na tržište kao lekovi tokom perioda od 1981-2002 god. se koristi za lečenje kancera i infektivnih bolesti (Singh, 2011). Poslednjih decenija glavni fokus farmaceutskih istraživanja prirodnih resursa

je bio usmeren na mikroorganizme (bakterije i gljive), i datira od perioda otkrića penicilina iz plesni vrste *Penicillium notatum* u prvoj polovini dvadesetog veka (Singh, 2011). Dosadašnja istraživanja pokazuju da cijanobakterije predstavljaju izvanredan resurs antibakterijskih agenasa. U istraživanju koje su sproveli Bhateja i sar. (2006) ekstrakt *Anabaena* sp. je ispoljio antibakterijsku aktivnost na vankomicin-rezistentan *S. aureus* pri izuzetno niskim koncentracijama, dok su Raveh i Carmeli (2007) iz *Fischerella* sp. izolovali jedinjenje koje je ispoljilo veću aktivnost na bakterijske vrste *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus albus* u poređenju sa antibiotikom streptomycinom. Međutim, uprkos velikom potencijalu ovih organizama, do danas je iz njih strukturno okarakterisano svega nekoliko antibakterijskih jedinjenja, uključujući terpenoide, masne kiseline, fikobiliproteinske pigmente, fenole, egzopolisaharide.

Iz vrste *Nostoc commune* su izolovana dva diterpenoida, pri čemu je efekat ekstracelularnog diterpenoida na neke bakterije bio sličan efektima antibiotika tetraciklina i hloramfenikola (Jaki i sar., 1999), dok je diterpenoid intracelularnog porekla na *Staphylococcus epidermidis* pokazao aktivnost sličnu hloramfenikolu (Jaki i sar., 2000). Iz vrste *Microcoleus lacustris* su takođe izolovana dva diterpenoida koja su ispoljila aktivnost na nekoliko testiranih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella typhi* i *Vibrio cholerae*) (Gutiérrez i sar., 2008).

U istraživanjima Najdenskog i sar. (2013), ekstrahovane masne kiseline svih testiranih cijanobakterija su pokazale antibakterijsku aktivnost. Kumar i sar. (2011) su na osnovu hemijske analize ekstrakata vrste *Spirulina platensis* ispoljenu antibakterijsku aktivnost takođe povezali sa masnim kiselinama. Antimikrobno dejstvo vrsta koje pripadaju rodu *Spirulina* se naročito povezuje sa prisustvom γ -linolenske kiseline i eikozana (Kumar i sar., 2011), dok su palmitinska, linolna, oleinska i α -linoleinska kiselina takođe opisane kao antimikrobni agensi cijanobakterija i mikroalgi (Plaza i sar., 2009).

Kao potentni antibakterijski agensi identifikovani su i pigment C-fikocijanin izolovan iz vrsta *S. platensis* (Sarada i sar., 2011), *Synechocystis* sp. i *Arthrospira fusiformis*, ali i pigment fikoeritrin izolovan iz crvene mikroalge *Porphyridium aeruginosum* (Najdenski i sar., 2013). Štaviše, u istoj studiji je pokazano da su egzopolisaharidi cijanobakterija još jedna obećavajuća grupa antibakterijskih agenasa, pri čemu su egzopolisaharidi iz *Gloeocapsa* sp. delovali na sve testirane patogene i pokazali najveći antimikrobni potencijal (Najdenski i sar., 2013). Kod nekoliko pripadnika roda *Nostoc* za antibakterijsku aktivnost su bila odgovorna fenolna jedinjenja (El-Sheekh i sar., 2006).

Cijanobakterije proizvode i prirodne ciklofane. Umerenu antibakterijsku aktivnost su pokazali ciklofani izolovani iz sojeva roda *Nostoc* (Bui i sar., 2007), kao i antrahinon i derivat indana iz soja *N. commune* EAWAG 122b (Jaki i sar., 2000). Studija iz 2016. godine (Dussault i sar., 2016) pokazuje da u antibakterijske agense cijanobakterija spadaju i malingamidi, antilatoksin B i laksaficini. Siderofore su takođe potencijalna jedinjenja za kontrolu patogena, i pronađena su kod različitih rodova cijanobakterija (Silva-Stenico i sar.,

Tabela 3. Pregled podataka u literaturi o antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata cijanobakterija

Vrsta bakterije		Vrsta cijanobakterije ekstrakt	Referenca
Gram negativne bakterije	Gram pozitivne bakterije		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		<i>Synechocystis</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp.	Najdenski i sar., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Synechocystis</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Spirulina platensis</i> , <i>Gloeotheca</i> sp., <i>Nostoc carneum</i> , <i>Nostoc muscorum</i> , <i>Nostoc punctiforme</i>	Ozdemir i sar., 2004; Kaushik i Chauhan, 2008; Guedes i sar., 2011; Najdenski i sar., 2013
<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Synechocystis</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Spirulina platensis</i>	Ozdemir i sar., 2004; Kumar i sar., 2011; Najdenski i sar., 2013
<i>Salmonella typhi</i>		<i>Nostoc muscorum</i> , <i>Spirulina platensis</i>	El-Sheekh, 2006; Kaushik i Chauhan, 2008
<i>Escherichia coli</i>		<i>Nostoc muscorum</i> , <i>Nostoc carneum</i> , <i>Nostoc punctiforme</i> , <i>Synechocystis</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Spirulina platensis</i> , <i>Gloeotheca</i> sp.,	Ozdemir i sar., 2004; El-Sheekh, 2006; Kaushik i Chauhan, 2008; Guedes i sar., 2011; Najdenski i sar., 2013
<i>Proteus vulgaris</i>		<i>Spirulina platensis</i>	Ozdemir i sar., 2004
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Nostoc muscorum</i> , <i>Nostoc entophyllum</i> , <i>Anabaena</i> sp., <i>Scytonema ocellatum</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Synechocystis</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Spirulina platensis</i> , <i>Gloeotheca</i> sp.	Ozdemir i sar., 2004; El-Sheekh, 2006; Kaushik i Chauhan, 2008; Guedes i sar., 2011; Kumar i sar., 2011; Najdenski i sar., 2013
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Spirulina platensis</i>	Ozdemir i sar., 2004
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Nostoc entophyllum</i> , <i>Anabaena</i> sp. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Gloeocapsa</i> sp.	Najdenski i sar., 2013
	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Spirulina platensis</i>	Ozdemir i sar., 2004
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Nostoc muscorum</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Fischerella</i> sp., <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Phormidium</i> sp., <i>S. platensis</i>	Ozdemir i sar., 2004; El-Sheekh, 2006; Silva-Stenico i sar., 2011
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Nostoc muscorum</i> , <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Synechocystis</i> sp., <i>Anabaena</i> sp.	El-Sheekh, 2006; Najdenski i sar., 2013

2011). Kod vrste *S. platensis* antibakterijsku aktivnost su pokazale isparljive komponente, od kojih su glavne bile heptadekan (39,70%) i tetradekan (34,61%) (Ozdemir i sar., 2004).

Smatra se da je manja efikasnost konvencionalnih antibiotika na Gram negativne u poređenju sa Gram pozitivnim bakterijama povezana sa razlikama u strukturi ćelijskog zida. Naime, u sastav ćelijskog zida Gram negativnih bakterija pored ćelijske membrane ulazi i spoljašnja membrana izgrađena iz lipopolisaharida, što otežava penetraciju aktivnih jedinjenja (Ördög i sar., 2004). Dosadašnja istraživanja ukazuju da cijanobakterije produkuju antibakterijske agense koji deluju na širok spektar bakterija, uključujući i Gram pozitivne i Gram negativne. Pregled dostupnih podataka u literaturi dat je u Tabeli 3.

2.5.5. Cijanobakterije kao potencijalni izvor antikancerogenih agenasa

Kancer spada u vodeće uzroke smrtnosti širom sveta. Brz porast incidence novih tipova kancera, kao i rezistentnost ćelija kancera prema trenutno dostupnim lekovima kao što su vinka alkaloidi i taksani, iziskuju intenzivnu potragu za novim i efikasnijim antikancerogenim agensima. Istraživanja koja su sprovedena poslednjih decenija pokazuju izvanredan potencijal cijanobakterija u produkciji antikancerogenih jedinjenja različitih hemijskih struktura i mehanizama delovanja. Do sada je iz cijanobakterija izolovano i strukturno okarakterisano nekoliko važnijih klasa ovih jedinjenja. Mnoga od njih ukazuju na ogroman kapacitet cijanobakterija da integrišu NRPS i PKS biosintetičke puteve, i za neke se smatra da imaju izuzetan potencijal u razvoju antikancerogenih agenasa.

Kriptoficini su potentni antikancerogeni agensi pronađeni kod cijanobakterija. Kriptoficin 1, prvobitno izolovan iz soja *Nostoc* GSV224, je visoko potentni supresor dinamike mikrotubula koji blokira ćelije u G2/M fazi. Ovo jedinjenje ima IC_{50} od 5 pg/mL na KB ćelije humanog nazofaringealnog karcinoma i 3 pg/mL na LoVo ćelije humanog kolorektalnog karcinoma, što je 100-1000 puta snažniji efekat od trenutno dostupnih antitumorskih lekova poput taksola ili vinblastina. Takođe pokazuje aktivnost prema adriamicin - rezistentnoj M 17 ćelijskoj liniji karcinoma dojke i DMS 273 ćelijskoj liniji karcinoma pluća. Postoji nekoliko analoga kriptoficina koji su prirodno izolovani ili hemijski sintetizovani. Dva analoga, kriptoficini 249 i 309, kod kojih je poboljšana stabilnost i rastvorljivost u vodi smatraju se kliničkim kandidatima druge generacije (Singh, 2011).

Apratoksini su familija cikličnih lipopeptidnih metabolita cijanobakterija sa izuzetnim citotoksičnim efektom na ćelije kancera (Luesch i sar., 2001). Ova jedinjenja sadrže dva poliketidna regiona koje razdvaja nekoliko aminokiselinskih ostataka, i tercijarnu butil grupu na jednom kraju molekula. Do sada je okarakterisano nekoliko apratoksina koji pokazuju zanimljive strukturne modifikacije, uključujući odsustvo N- ili C-metil grupe na različitim položajima, dodatni PKS modul ili zamenu terminalnog prolinskog ostatka sa N-metil alaninom. Najsnažniji apratoksini, A i F, ispoljavaju izuzetno niske IC_{50} na različite ćelijske

linije humanih karcinoma, koje su u slučaju apratoksina A u opsegu od 0,36 do 0,52 nM u *in vitro* testovima (Luesch i sar., 2001). Ova jedinjenja mogu imati različite efekte na ćelije kancera, uključujući targetiranje hit šok proteina 90 (Heat Shock Protein, *HSP 90*) (Shen i sar., 2009).

Kod vrste *Lyngbya majuscula* otkriven je somocistinamid A, koji ispoljava *in vitro* antiproliferativnu aktivnost u pikomolarnim koncentracijama (Wrasidlo i sar., 2008). Po strukturi je lipopeptid sa dve karakteristične N-metil enamid grupe. Smatra se da somocistinamid A deluje aktivacijom smrt-indukujućeg signalnog kompleksa u ćelijskim membranama, nakon čega se aktiviraju kaspaze 8 i 3, čime se indukuje spoljašnji put programirane ćelijske smrti (Nunnery i sar., 2010).

Dolastatin 10, izolovan iz *Symploca* sp., je pentapeptid sa četiri jedinstvene aminokiseline - dolavalin, dolaizoleucin, dolaprolin i dolafenin. Predstavlja snažan antiproliferativni agens sa ED_{50} od $4,6 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$, koji se vezuje za tubulin i utiče na sastavljanje mikrotubula u ćelijama. Ipak, klinička ispitivanja su prekinuta zbog razvoja periferne neuropatije kod 40% pacijenata i nedostatka značajne aktivnosti kod pacijenata sa hormonskim refraktornim metastatskim adenokarcinomom (Vaishampayan i sar., 2000). Analog dolastatina 10, TZT-1027 (auristatin PE ili soblidotin), se takođe pokazao efikasan na testiranim ćelijskim linijama. Dolastatin 15 je linearan peptid koji se direktno vezuje za mesto vinka alkaloida na tubulinu i blokira prelazak ćelijskog ciklusa u M fazu, i kod različitih ćelijskih linija kancera ima ED_{50} od $2,4 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$. Ipak, klinička ispitivanja sa ovim jedinjenjem nisu preduzeta zbog strukturne složenosti, niskog sintetičkog prinosa i loše rastvorljivost u vodi (Singh, 2011).

Bisebromoamid, otkriven kod *Lyngbya* sp., se odlikuje specifičnom strukturom jer šest od osam subjedinica poseduju neobične strukturne karakteristike, uključujući pivalinsku kiselinu, bromovan tirozin, metilovan prolin, α -metil tiazolinski prsten, D leucin i 2-(1-okso-propil) pirolidinski ostatak. Ovo jedinjenje ima prosečnu IC_{50} od 40 nM na 39 ćelijskih linija kancera. Smatra se da je moguć mehanizam delovanja inhibicija fosforilacije ekstraćelijskim signalom regulisane kinaze (extracellular signal - regulated protein kinase, *ERK*) na koju deluje u submikromolarnim koncentracijama (Nunnery i sar., 2010).

Koibamid A, jedinjenje otkriveno kod marinskih cijanobakterija panamskog ostrva Koiba poseduje strukturu peptida i sastoji se od velikog makrocikličnog prstena i linearnog dela koji se na amino-kraju lanca završava N, N-dimetil valinom, a karakteriše ga visok nivo N- i O-metilacije. Koibamid A pokazuje *in vitro* antiproliferativnu aktivnost na ćelije kancera u nanomolarnim koncentracijama (Medina i sar., 2008).

Largazol, izolovan iz cijanobakterije *Symploca* sp., je tioestar koji nastaje integracijom PKS i NRPS. Ovo jedinjenje deluje na nekoliko ćelijskih linija, uključujući MDA-MB-231, NMuMG i U2OS, u nanomolarnim koncentracijama. Smatra se da targetira histon deacetilaze (HDAC) (Taori i sar., 2008).

Antikancerogena aktivnost je takođe registrovana i kod fikobiliproteinskog pigmenta C-fikocijanina (C-PC), tačnije njegove β -subjedinice. Rekombinantna β -subjedinica ovog pigmenta, testirana na četiri ćelijske linije ispoljila je visok stepen inhibicije proliferacije i indukciju apoptoze. Pokazano je da rekombinantni protein interaguje sa membranski-vezanim β -tubulinom i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazom (GAPDH), pri čemu se nivo GAPDH u jedru značajno smanjuje. Ova svojstva ukazuju da C-PC/ β može biti obećavajuća u prevenciji kancera ili kao terapijski agens (Wang i sar., 2007).

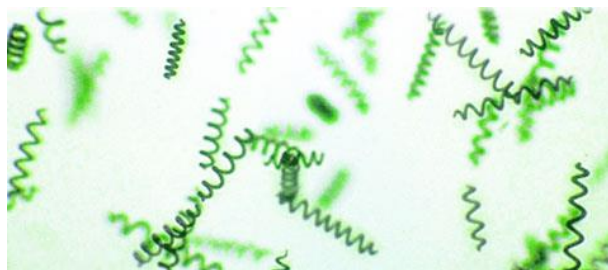
2.6. CIJANOBAKTERIJE U ISHRANI LJUDI I TRADICIONALNOJ MEDICINI

Visoko kalorična hrana u kombinaciji sa modernim životnim stilom dovodi do zdravstvenih problema kao što su gojaznost, srčana oboljenja, dijabetes, itd. Potreba za prehrambenim proizvodima koji mogu da poboljšaju zdravlje obogaćivanjem ishrane supstancama poput vitamina, minerala, polinezasićenih masnih kiselina i antioksidanata, dovela je do razvoja brzorastućeg tržišta funkcionalne hrane (Kaur i Das, 2011). Funkcionalni sastojci se stoga definišu kao standardizovani preparati, frakcije ili ekstrakti koji sadrže bioaktivna jedinjenja promenljive čistoće, koje proizvođači koriste kao sastojke funkcionalne hrane (Diplock i sar., 1999). S obzirom na generalnu odbojnost potrošača prema sintetičkim supstancama, od naročitog interesa su supstance prirodnog porekla.

Iako se u literaturi navode brojne vrste mikroalgi kao izvor bioaktivnih jedinjenja pogodnih za upotrebu kao sastojaka funkcionalne hrane (Plaza i sar., 2008; Freile-Pelegri i Robledo, 2013), konzumacija biomase mikroalgi je ograničena na svega mali broj taksona od kojih su komercijalno najznačajniji rodovi *Chlorella* (*Chlorophyta*) i *Spirulina*. Cijanobakterije se vekovima koriste u ishrani ljudi ili u medicinske svrhe u azijskim, afričkim i zemljama Južne Amerike (Yang, 2011). Pored roda *Spirulina*, cijanobakterije roda *Nostoc* i *Anabaena* se takođe koriste u određenim delovima sveta, dok se u nekim zemljama koriste i rodovi *Chroococcus*, *Phormidium*, *Phyllocladon* (Svirčev, 2005; Gantar i Svirčev, 2008).

Rod *Spirulina* (Slika 11) je dugo vremena imao nestabilan položaj u filogenetskom stablu. Prema novijoj klasifikaciji koja se zasniva najviše na molekularnim filogenetskim analizama, smešten je u novi red *Spirulinales* koji karakterišu tipični, pravilno uvijeni trihomi bez omotača, i ima karakterističnu citologiju i ekologiju. Kako se komercijalno važna vrsta *Spirulina platensis* veoma razlikuje prema svim filogenetskim i citološkim kriterijumima, ona ne pripada ovom redu i klasifikovana je u rod *Arthrospira* (*Oscillatoriales*, *Microcoleaceae*) (Komárek i sar., 2014). Ipak, ova vrsta se u literaturi i dalje često navodi kao *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*.

Sa ekonomskog aspekta, dve najznačajnije vrste roda *Spirulina* su *S. platensis* i *S. maxima*, koje imaju dugu istoriju upotrebe u ishrani u Africi i Južnoj Americi. Domoroci oko jezera Čad u Africi vekovima sakupljaju spirulinu iz prirodnih staništa (Slika 12) i koriste kao svakodnevnu namirnicu *tekuitlatl*, dok je plemena oko alkalnih jezera u Meksiku koriste za spravljenje kolača *dihé* (Svirčev, 2005). Vrsta *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* se kultiviše širom sveta i koristi kao dijetetski suplement. Biomasa spiruline je komercijalan izvor različitih bioaktivnih metabolita, uključujući γ -linolensku kiselinu, D vitamin, β -karoten i pigment fikocijanin. Sa sadržajem proteina do 72% suve biomase (Çelekli i sar., 2016), vrsta *S. platensis* predstavlja najbogatiji izvor proteina u odnosu na sve fotosintetičke organizme.



Slika 11. *Spirulina* sp.
(<http://earthrise.com/spirulina>)



Slika 12. Sakupljanje spiruline iz jezera
(www.spirulinasource.com/spirulina)

Takođe ima najveći sadržaj vitamina B₁₂ u poređenju sa bilo kojim izvorom biljne ili životinjske hrane, a u poređenju sa zelenim algama, spanaćem i jetrom, najbogatiji je izvor provitamina A, vitamina E, tiamina, biotina i inozitola (cit. u Gantar i Svirčev, 2008).

Eksperimenti *in vivo* i *in vitro* ukazuju da je *Spirulina* efikasna u lečenju alergija, anemije, kancera, hepatotoksičnosti, virusnih i kardiovaskularnih bolesti, hiperglikemije, hiperlipidemije, imunodeficijencije, inflamatornog procesa, utiče na smanjenje nivoa holesterola u krvi i nefrotoksičnosti izazvanom farmaceuticima i toksičnim metalima, i pruža zaštitu od štetnih efekata zračenja (cit. u Colla i sar., 2007; cit. u Kepekçi i Saygideger, 2012). Neke od navedenih aktivnosti se pripisuju masnim kiselinama, karotenoidima, α -tokoferolu, C-fikocijaninu i fenolnim jedinjenjima (Kepekçi i Saygideger, 2012). Zaštita od kancera i starenja se pripisuje komponentama koje imaju antioksidativnu aktivnost, uključujući β -karoten. Schwartz i Shklar (1987) su pokazali da je na regresiju kancera kod hrčka ekstrakt spiruline delovao efikasnije u poređenju sa samim β -karotenom i zaključili da je moguć sinergistički efekt komponenata ekstrakta, jer je dokazano da i druge komponente pored β -karotena imaju odlučujuće delovanje u inhibiciji oksidacije (Miranda i sar., 1998). γ -linolenska kiselina koja je u biomasi vrsta roda *Spirulina* prisutna u visokom procentu se u ljudskom organizmu lako konvertuje u arahidonsku kiselinu, a zatim u prostaglandin E2, koji utiče na smanjenje krvnog pritiska, dok visok sadržaj linolne kiseline stimuliše sintezu prostaglandina E1, hormona koji utiče na nivo holesterola u krvi (Thajuddin i Subramanian, 2005). Postoje istraživanja koja ukazuju i na prebiotički efekat spiruline povećanjem stope rasta laktobacila 10 puta u odnosu na kontrolu (Pulz i Gross, 2004). Kako je ekstrakcija supstanci u čistom obliku skup proces, direktna konzumacija spiruline kao nutraceutika je održiva alternativa (Colla i sar., 2007), a naročito je interesantna mogućnost inkorporacije celokupne biomase u hranu (Danesi i sar., 2002). Tako se na tržištu širom sveta mogu naći različiti prehrambeni proizvodi koji sadrže biomasu spiruline. Biomasa spiruline ima veliki potencijal i kao matriks za proizvodnju farmaceutika koji sadrže selen i jod (Chen i sar., 2006; cit. u Rodrigues i sar., 2010).

Vrsta *S. platensis* je pogodna za proizvodnju biomase zbog visoke stope rasta, lake kontrole procesa obrade i izdvajanja biomase, sposobnosti da raste na alkalnom i hiperslanom

medijumu, redukovanim rizicima od razvoja kontaminacije i otpornosti na nepovoljne ili suboptimalne uslove (Rodrigues i sar., 2010). Interes za kultivaciju ove cijanobakterije je sve veći i proizvodnja biomase namenjene za ljudsku ishranu na svetskom nivou iznosi preko 1000 t godišnje (Kepekçi i Saygideger, 2012). Većina istraživanja *S. platensis* fokusirana su na proizvodnju antioksidanata, uključujući C-fikocijanin, karotenoide i polinezasićene masne kiseline, i kultivaciju u cilju povećanja prinosa biomase pod optimizovanim uslovima (cit. u Kepekçi i Saygideger, 2012).

Osim spiruline, i druge cijanobakterije se koriste u ishrani. Kao pripadnici familije *Nostocaceae*, rodovi *Nostoc* i *Anabaena* su heterocistne cijanobakterije sa negranatim izopolarnim ili heteropolarnim filamentima koji obrazuju akinete, često u serijama (Komárek i sar., 2014). Vrste roda *Nostoc* su široko rasprostranjene u vodi i izvan nje. Kod nekih vrsta, kolonije se mogu videti samo mikroskopom, dok kod drugih dostižu masu od nekoliko kg i obavijene su gustim galernim omotačem (Blaženčić, 2008). Neke vrste su deo tradicionalne ishrane s obzirom da formiraju želatinozne globule (Slika 13 i 14) koje se lako sakupljaju iz jezera. Potražnja na tržištu za vrstama *N. flagelliforme* i *N. commune* var. *sphaeroides* Kützina koje se koriste u ishrani znatno premašuje zalihe, dajući ovim cijanobakterijama veliku ekonomsku vrednost (Yu, 2009; Ma i sar., 2015).

Nostoc flagelliforme je terestrična vrsta koja se u Kini koristi kao hrana preko 2000 godina. Istraživanja su pokazala da topli vodeni ekstrakti ove vrste imaju antitumorsku aktivnost, dok izolovan kiseli polisaharid nostoflan poseduje izvanredan antiviralni efekat na različite viruse sa omotačem, uključujući HSV-1, Humani citomegalovirus i virus influence A (Yu i sar., 2009). Vrsta *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützina ima dugu istoriju upotrebe u Kini i Peruu gde se koristi u ishrani i tradicionalnoj medicini - kod groznice, inflamacije, različitih bolova, teških porođaja, noćnog slepila, hroničnog umora i za poboljšanje varenja (Yang, 2011; Williams, 2012; Ma i sar., 2015). Istraživanje u kojem je pokazano da ekstrakt lipida ove vrste može da inhibira biosintezu holesterola i lipogenezu *in vitro*, kao i istraživanje na miševima u čiju je hranu inkorporirana ova cijanobakterija ukazuju na ateroprotektivni potencijal i da može biti kandidat za alternativno lečenje hiperholesterolemije (Yang, 2011). Ekstrakti ove cijanobakterije takođe pokazuju značajne "skevindžer" efekte na superoksid i hidroksil slobodne radikale, kao i antioksidativna svojstva (Ma i sar., 2015). U istraživanju koje su sprovedli Li i sar. (2007) izuzetan antioksidativni potencijal i visok sadržaj fenola među testiranim cijanobakterijama je otkriven kod soja *Nostoc ellipsosporum* CCAP, ukazujući na potencijalan bogat izvor prirodnih antioksidanata. Vrsta *Nostoc punctiforme* (jezerska šljiva) formira krupne loptaste kolonije od kojih lokalno stanovništvo u Kini, Mongoliji i Andima pravi hranu, dok se vrsta *N. verrucosum* konzumira kao specijalitet na Tajlandu (Svirčev, 2005).



Slika 13. Kolonije *Nostoc pruniforme*
(<http://cfb.unh.edu/phycokey>)



Slika 14. Narandžaste kolonije *N. pruniforme* sa dominacijom karotenoida, koje se prodaju kao hrana
(<http://cfb.unh.edu/phycokey>)

2.7. CIJANOBAKTERIJE U ISHRANI ŽIVOTINJA

Alge se generalno ne smatraju esencijalnim izvorom hrane za životinje zbog velike količine potrebne biomase, ali čak i kada se koriste u malim količinama, pripisuju im se svojstva kao što su imunostimulativna aktivnost, pozitivan efekat na funkcije creva, metabolizam lipida, povećanje otpornosti na stres i sl. (Shields i Lupatsch, 2012). Nutritivnim procenama je pokazano da je biomasa algi pogodna kao vredan dodatak hrani za životinje ili zamena za konvencionalne izvore proteina (sojina sačma, obrok od ribe i dr.). Ciljna grupa je živina jer uključivanje biomase mikroalgi u porcije živine ima najveću perspektivu za komercijalnu upotrebu (Becker, 2007) i sa inkorporacijom od 5-10% mogu se koristiti kao delimična zamena za konvencionalne proteine (Spolaore i sar., 2006). Kod koka nosilja mikroalge mogu poslužiti kao gotovo jedini izvor proteina, i u nekoliko zemalja su zvanično odobrene kao hrana za piliće (Gouveia i sar., 2008). Od cijanobakterija, spirulina se koristi kao dodatak hrani u industriji živine (Hasan i Chakrabarti, 2009), ali i kod drugih vrsta životinja: psi, mačke, akvarijumske ribice, ukrasne ptice, konji, krave i priplodni bikovi (Mostafa, 2012). S obzirom na veliki potencijal za ovo tržište, nekoliko kompanija (Aurora Algae, MBD, Cellana) je preusmerilo svoj fokus sa proizvodnje biodizela iz mikroalgi na proizvodnju visokovrednih proizvoda poput n3 masnih kiselina i biomase bogate proteinima kao hrane za životinje (AdarmeVega i sar., 2012).

Mikroalge i cijanobakterije su izvor hrane i dijetetskih suplemenata u komercijalnom uzgoju vodenih organizama, što nije iznenađujuće s obzirom na činjenicu da su kao primarni producenti u vodenim ekosistemima prva karika u lancu ishrane ovih organizama. Vrste roda *Spirulina* se često inkorporiraju u hranu za ukrasne ribe, kod kojih su obojenost i zdrav izgled glavni tržišni kriterijumi (Shields i Lupatsch, 2012). *Spirulina* se koristi kao aditiv u japanskoj industriji uzgoja ribe, sa inkorporacijom od 0,5-2,5%, pri čemu su utvrđeni benefiti poput povećane stope rasta, povećanog kvaliteta krljušti i boje, veće stope preživljavanja, smanjenih zahteva za lekovima i smanjenja otpada u efluentima (Hasan i Chakrabarti, 2009). U studiji u

kojoj je mlađ riba različitih vrsta hranjena sa 10% suve biomase spiruline, kod svih vrsta je zabeležena povećana specifična stopa rasta (Ayyappan i sar., 1991). Kod mlađi indijskog šarana je sa povećanjem procenta *S. platensis* u hrani rasla i stopa rasta, dok su jesetre hranjene obrocima zasnovanim na spirulini čak nadmašile one koje su dobijale hranu na bazi ribe. Sa druge strane, kod mlađi tilapije, dodatak spiruline u hranu je usporio rast (cit. u Shields i Lupatsch, 2012). Na osnovu nutritivnih i toksikoloških procena, pokazano je da bi npr. i cijanobakterijski soj *Phormidium valderianum* BDU 30501 mogao da posluži kao kompletan izvor hrane u akvakulturi (Thajuddin i Subramanian, 2005).

2.8. TOKSINI CIJANOBAKTERIJA I DETEKCIJA TOKSIČNIH SOJEVA

Toksini cijanobakterija (cijanotoksini) predstavljaju jedan od glavnih problema koji ograničavaju biotehnošku primenu biomase cijanobakterija. Cijanotoksini su biohemijski i funkcionalno raznovrsna grupa fiziološki aktivnih jedinjenja, koja je prema načinu delovanja, odnosno prema tipu toksičnosti koji izaziva kod ljudi i životinja, podeljena u 4 klase (cit. u Simeunović, 2009):

- Hepatotoksini - mikrocistini, nodularini i cilindrospermopsin;
- Neurotoksini - anatoksini i saksitoksini;
- Dermatotoksini - aplaziatoksini i lingbiatoksini;
- Lipopolisaharidni endotoksini (LPS) - iritirajući toksini.

Dejstvo hepatotoksina se zasniva na inhibiciji enzima serin-treonin protein fosfataza, zbog čega u ćelijama dolazi do poremećaja u balansu između procesa fosforilacije i defosforilacije, što rezultira hiperfosforilacijom proteina. Zbog poremećenog balansa fosfatnih grupa na proteinima citoskeleta, ovi toksini izazivaju kolaps citoskeleta, hepatociti se deformišu i razvlače, kao i ćelije kapilara, što dovodi do oslobađanja krvi koja se nakuplja u jetri i dolazi do smrti usled krvarenja. Mikrocistini su takođe označeni i kao promoteri karcinoma (cit. u Simeunović, 2009).

Kada su u pitanju neurotoksini, anatoksina-a kod ptica i sisara deluje tako što se na isti način kao neurotransmiter acetilholin ireverzibilno vezuje za nikotinski acetilholinski receptor, što vodi do prekomerne stimulacije mišićnih ćelija (Wiegand i Pflugmacher, 2005). Smatra se da je anatoksin-a (S), koji ireverzibilno inhibiše enzim acetilholinesterazu, 10 puta potentniji u odnosu na anatoksin-a (cit. u Simeunović, 2010).

Dermatotoksini aplaziotoksin i debromoaplaziotoksin su takođe označeni kao inicijatori tumora i aktivatori enzima proteinkinaza, dok i lipopolisaharidni endotoksini mogu delovati kao promoteri tumora (cit. u Simeunović, 2010). Sa druge strane, BMAA (β -N-metilamino-L-alanin), neurotoksična, neproteinska aminokiselina koju proizvode različite vrste cijanobakterija (Banack i sar., 2007; Lawton i Edwards, 2008) se povezuje sa neurodegenerativnim bolestima (amiotrofična lateralna skleroza/kompleks Parkinsonove bolesti, ALS/PDC).

Procenjeno je da među 150 poznatih rodova cijanobakterija, toksine proizvode 40 rodova (Apeldoorn i sar., 2007). Međutim, u okviru jedne vrste cijanobakterija, neki sojevi mogu proizvoditi različite tipove toksina, dok ostali mogu biti netoksični (Rapala i Lahti, 2002). S obzirom da je produkcija toksina strogo specifično svojstvo soja koje je genetički određeno, potencijalno toksičnim se smatraju svi sojevi koji poseduju gene za kodiranje sinteze određenih toksina. Produkcija cijanotoksina, kao produkata sekundarnog metabolizma, zavisi i od starosti kulture, sastava podloge, prisustva vezanog azota, a pre svega od prisustva

stresogenih faktora koji mogu da se manifestuju kao nagla promena pH vrednosti, temperature, svetlosti, itd. (cit. u Simeunović, 2009).

Na osnovu hemijske strukture, cijanotoksini se mogu podeliti na tri grupe (Codd i sar., 2005):

- Ciklični peptidi (mikrocistini i nodularin);
- Alkaloidi (anatoksini, saksitoksini, cilindrospermopsin, aplaziatoksin i lingbiatoksin);
- Lipopolisaharidi (lipopolisaharidni endotoksini).

Za analizu cijanotoksina koriste se analitičke, bioanalitičke i molekularne metode i bioeseji (Koreiviene i Belous, 2012). Moderne metode, kao hemijski specifične, ne određuju ukupnu toksičnu potentnost analiziranog uzorka. Naime, strukturna raznolikost cijanotoksina je velika zbog prisustva strukturnih analoga, kojih je u slučaju mikrocistina identifikovano preko 150 (Miles i sar., 2014). Osim toga, cijanobakterije proizvode i druge toksične metabolite - neurotoksični jamajkamid (Jones i sar., 2009), hoiamide i antilatoksin (Nunnery i sar., 2010), BMAA (Banack i sar., 2007; Lawton i Edwards, 2008), isparljiva jedinjenja i masne kiseline (cit. u Blaha i sar., 2009). Kako su moderne metode za analizu cijanotoksina hemijski specifične, za detekciju ukupne toksičnosti sojeva su predloženi bioeseji (Maršalek i Blaha, 2004), koji su takođe važni za procenu nivoa toksičnosti nepoznatih cijanotoksina (Koreiviene i Belous, 2012). Naime, ukoliko se bioesej koristi u kombinaciji sa nekom drugom metodom u kojoj se ne registruju poznati cijanotoksini, a na test organizmu se detektuje toksičnost, može se konstatovati prisustvo nepoznatih toksina (Torokne i sar., 2007; Frazao i sar., 2010).

Za detekciju cijanotoksina prvenstveno su korišćeni bioeseji sa miševima, ali zbog etičkih i drugih ograničenja postojala je potreba da se pronađu alternative. Za skrining toksičnosti cijanobakterija obično se koriste bioeseji sa račićima vrste *Artemia salina* ili *Daphnia* spp. (Hisem, 2011). Kako ne postoji bioesej kojim se sa sigurnošću mogu detektovati svi cijanotoksini (Agrawal i sar., 2012), preporučuje se kombinacija nekoliko bioeseja. Za procenu zdravstvenog rizika takođe se predlaže i korišćenje *in vitro* sisarskih ćelija (Hisem, 2011). Iako bi upotreba ćelijskih linija sisara mogla zameniti bioeseje na životinjama, potrebno je mnogo istraživanja pre nego što se usvoji univerzalna ćelijska linija za sve poznate cijanotoksine (Agrawal i sar., 2012).

Za detekciju toksičnih sojeva cijanobakterija se takođe koriste i biohemijski eseji koji se zasnivaju na inhibiciji enzima. S obzirom da mikrocistini i nodularini inhibišu protein fosfataze (PP1 i PP2A) (Simeunović, 2009), esej inhibicije protein fosfataze je pokazan kao osetljiv skrining metod za ove cijanotoksine (Agrawal i sar., 2012), i obično se primenjuje pre detaljnije identifikacije posebnim analitičkim tehnikama (Simeunović, 2009). Bioeseji za neurotoksine se zasnivaju na inhibiciji enzima acetilholinesteraze (AChE). U pitanju je

osetljiva metoda koja trenutno predstavlja jedinu alternativu za bioesej na miševima za detekciju anatoksina. Međutim, esej nije selektivan, jer može da detektuje i druge toksične supstance kao što su organofosforni pesticidi (Agrawal i sar., 2012).

Cijanotoksini mogu imati i potencijalnu farmaceutsku primenu (Simeunović, 2009; Priyadarshani i Rath, 2012). S obzirom na specifičnost delovanja mikrocistina na PP1 i PP2A, ovi toksini se mogu primeniti npr. i kao probe u istraživanjima i identifikaciji ćelijskih procesa u kojima su glavni akteri protein fosfataze (Simeunović, 2009). Sa druge strane, toksini koji deluju kao inhibitori enzima AChE bi se mogli primeniti u lečenju Alchajmerove bolesti, tako da je potraga za ovim jedinjenjima fokusirana na skrining različitih prirodnih izvora, uključujući cijanobakterije (Zelík i sar., 2009).

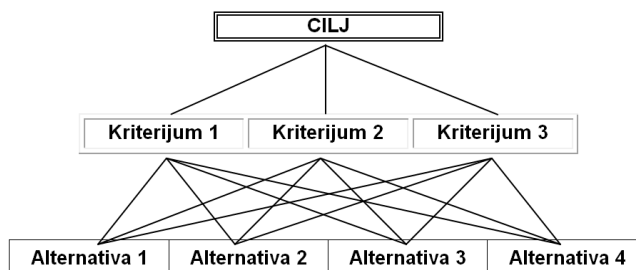
2.9. VIŠEKRITERIJUMSKA ANALIZA KAO METOD ZA PROCENU CIJANOBAKTERIJSKIH SOJEVA SA NAJVEĆIM BIOTEHNOLOŠKIM POTENCIJALOM

Višekriterijumska analiza omogućava donošenje odluke u konfliktnim uslovima, kada postoji više alternativa i kriterijuma, od kojih neke treba maksimizirati, a neke minimizirati. Među najčešće korišćene metode višekriterijumske analize spadaju Analitički hijerarhijski proces (AHP) (Saaty, 1980) i Aditivni metod (SAW - Simple Additive Weighting) (Hwang i Yoon, 1981). AHP se koristi za određivanje težina kriterijuma od interesa za problem odlučivanja – u ovom slučaju produkcije određenih metabolita i biomase, dok se SAW koristi za finalno rangiranje alternativa - u ovom slučaju cijanobakterijskih sojeva sa najvećim biotehnološkim potencijalom. Određivanje težina kriterijuma je složen posao, jer se odluke zbog nemogućnosti kvantifikacije često donose na osnovu kvalitativnih podataka ili, još češće, u kombinaciji sa postojećim kvantitativnim podacima. Interdisciplinarnost se podrazumeva, jer samo jedna struka ne može pružiti sve neophodne inpute za sveobuhvatnu analizu. AHP se pokazao kao pouzdana i naučno dokazana podrška u individualnom i grupnom donošenju odluka u poslovima upravljanja prirodnim resursima, alokaciji resursa, rangiranjima i dr. Prema merodavnim izvorima u naučnim časopisima i na osnovu drugih saznanja, AHP se u svetu koristi znatno više od drugih metodologija iste namene. S obzirom da je AHP zasnovan na individualnom (subjektivnom) mišljenju donosioca odluke, o problemu odlučivanja uvek je bolje odluku donositi u grupnom kontekstu, jer se na taj način smanjuje opasnost od pogrešne procene, problemu se pristupa iz različitih perspektiva koje su zasnovane na različitim znanjima i iskustvima donosilaca odluka, i na kraju, donesena odluka ima veći legitimitet da bude sprovedena u delo (Blagojević, 2015). Iako standardni AHP podrazumeva formiranje hijerarhije problema odlučivanja i vrednovanje elemenata po nivoima hijerarhije, čest je slučaj da postoji samo jedan nivo odlučivanja i tada se odluka (vektor težina kriterijuma) dobija na osnovu jedne matrice poređenja. Pri donošenju grupne odluke u cilju odabira sojeva sa najvećim biotehnološkim potencijalom, mogu se direktno porediti kriterijumi u odnosu na cilj i na taj način definisati njihove težine. Nakon toga, pomoću metoda SAW se bira najbolja alternativa. U tom slučaju, ulazni podaci za ovaj metod predstavljaju težine kriterijuma dobijene metodom AHP i performanse alternativa (sojeva) dobijene laboratorijskim analizama.

2.9.1. Analitički hijerarhijski proces (AHP)

Metod AHP je "analitički" i "hijerarhijski" jer donosilac odluke razlaže složen problem odlučivanja na više elemenata odlučivanja između kojih uspostavlja hijerarhiju. Hijerarhija problema odlučivanja ima nekoliko nivoa, pri čemu se na vrhu hijerarhije nalazi

cilj, sledeći nivo sadrži kriterijume, dok se na dnu nalaze alternative (Slika 15). Ovakva hijerarhijska postavka se odnosi na standardan problem odlučivanja, ali su česti slučajevi kada hijerarhija ima dva nivoa i tada se ispod cilja nalaze jedino kriterijumi ili alternative (Blagojević, 2015).



Slika 15. Hijerarhija problema odlučivanja

Posle formiranja hijerarhije donosilac odluka poredi u parovima elemente na datom nivou hijerarhije u odnosu na sve elemente na višem nivou, kako bi se odredio njihov međusobni značaj. U standardnom AHP elementi se porede davanjem lingvističkih (semantičkih) ocena međusobnog značaja u odnosu na element na višem nivou hijerarhije pomoću osnovne skale iz Tabele 4 (Saaty, 1980).

Tabela 4. Satijeva skala relativnog značaja (Saaty, 1980)

Definicija	Brojčana vrednost
Isti značaj	1
Slaba dominantnost	3
Jaka dominantnost	5
Vrlo jaka dominantnost	7
Apsolutna dominantnost	9
(Međuvrednosti)	(2,4,6,8)

Kada donosilac odluka na datom nivou hijerarhije vrednuje n elemenata odlučivanja u odnosu na nadređeni element prema skali iz Tabele 4, njegove semantičke ocene prema definicijama iz leve kolone se brojčano prikazuju vrednostima iz desne kolone i unose u kvadratnu matricu A . Matrica je pozitivna i recipročna (simetrična u odnosu na glavnu dijagonalu); drugim rečima, elementi iz gornjeg su recipročni elementima iz donjeg trougla, a elementi na glavnoj dijagonali jednaki su 1 ($a_{ij}=1/a_{ji}$, za svako i i j ; $a_{ii}=1$ za svako i).

$$A = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdot & \cdot & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdot & \cdot & a_{2n} \\ \cdot & & & & \cdot \\ \cdot & & & & \cdot \\ a_{n1} & a_{n2} & \cdot & \cdot & a_{nm} \end{bmatrix} \quad (1)$$

Za određivanje težina poređenih kriterijuma na osnovu brojčanih vrednosti iz matrice A korišćen je metod sopstvenih vrednosti, koji je predložen od autora metoda (Saaty, 1980). Grupne težine kriterijuma dobijene su objedinjavanjem individualnih ocena (aggregation of individual judgments - AIJ) (Ramanathan i Ganesh, 1994; Forman i Peniwati, 1998). Kod metoda AIJ, grupna matrica se generiše geometrijskim osrednjavanjem individualnih ocena članova grupe. Nakon određivanja grupne matrice, grupni vektor prioriteta se dobija metodom sopstvenih vrednosti.

2.9.2. Aditivni metod (SAW – simple additive weighting)

SAW je jednostavan višekriterijumski metod koji se direktno primenjuje na matricu odlučivanja R . Svaki red matrice odgovara jednoj alternativni, a svaka kolona jednom kriterijumu, element r_{ij} predstavlja rejting (performansu) alternative A_i u odnosu na kriterijum C_j . Za m kriterijuma (C_1, C_2, \dots, C_m) i n alternativa (A_1, A_2, \dots, A_n), matrica R ima oblik (2), a vrednosti (w_1, w_2, \dots, w_m), upisane iznad matrice, predstavljaju težinske vrednosti kriterijuma, definisane grupnom primenom AHP-a.

$$R = \begin{array}{c} \begin{array}{cccc} C_1 & C_2 & \cdot & \cdot & C_m \\ w_1 & w_2 & \cdot & \cdot & w_m \end{array} \\ \begin{array}{l} A_1 \\ A_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ A_n \end{array} \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & \cdot & \cdot & r_{1m} \\ r_{21} & r_{22} & \cdot & \cdot & r_{2m} \\ \cdot & & & & \cdot \\ \cdot & & & & \cdot \\ r_{n1} & r_{n2} & \cdot & \cdot & r_{nm} \end{bmatrix} \end{array} \quad (2)$$

Zbog jednostavnosti izlaganja, obično se usvaja da su svi kriterijumi maksimizacioni ili minimizacioni. Kao što je poznato, minimizacioni kriterijumi se lako konvertuju u maksimizacione zamenom znaka rejtinga ili uzimanjem njihovih recipročnih vrednosti (Srđević i sar., 2002). Ovde su minimizacioni kriterijumi konvertovani u maksimizacione uzimanjem recipročnih vrednosti rejtinga. Metod SAW se sastoji iz tri koraka: 1) normalizacija rejtinga radi uporedivosti, 2) primena težinskih vrednosti kriterijuma na normalizovane rejtinge i 3) sabiranje otežanih rejtinga za svaku alternativu. Nakon

normalizacije (primenom relacije (3)), za svaku alternativu izračunava se ukupna vrednost-utility u odnosu na sve kriterijume - relacija (4).

$$x_{ij} = r_{ij} \left(\sum_{i=1}^n r_{ij} \right)^{-1} \quad (3)$$

$$S_i = \sum_{j=1}^m w_j x_{ij}, i=1, \dots, n \quad (4)$$

Najbolja alternativa je sa maksimalnom vrednošću S_i (Srđević i sar., 2002).

3. CILJEVI

S obzirom na generalnu odbojnost potrošača prema sintetičkim supstancama, pri čemu se za mnoge takođe vezuju negativni efekti, poslednjih godina su aktuelna istraživanja različitih izvora prirodnih koloranata, antioksidanata, antibakterijskih i antikancerogenih agenasa, kao i drugih jedinjenja sa zdravstveno korisnim efektima. Cijanobakterije (modrozelenne alge) su identifikovane kao jedna od najperspektivnijih grupa organizama za izolaciju novih i biološki aktivnih prirodnih produkata. Ipak, ovi mikroorganizmi su još uvek slabo istraženi, dok veću komercijalnu upotrebu ograničavaju toksini koji se mogu naći u biomasi, skupa tehnologija i generalno nizak prinos biomase. Iz navedenih razloga opšti cilj je utvrđivanje biotehnološkog potencijala deset autohtonih cijanobakterijskih sojeva. Realizacija opšteg cilja biće ostvarena kroz nekoliko specifičnih ciljeva:

- Ispitivanje produkcije biomase i sadržaja fikobiliproteinskih pigmenata autohtonih filamentoznih azotofiksirajućih i neazotofiksirajućih sojeva cijanobakterija primenom različitih uslova kultivacije;
- Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja masnih kiselina kod cijanobakterijskih sojeva primenom GC-FID metode;
- Određivanje i analiza kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja kod etanolnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva primenom HPLC-MS/MS metode;
- Ispitivanje antioksidativnog potencijala etanolnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva primenom dve metode: određivanjem kapaciteta neutralizacije DPPH[•] radikala i redukcione sposobnosti (FRAP test);
- Ispitivanje antibakterijske aktivnosti metanolnih i dimetil sulfoksidnih intracelularnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva prema referentnim sojevima bakterija;
- Ispitivanje antikancerogene aktivnosti dimetil sulfoksidnih intracelularnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva *in vitro* primenom ćelijske linije humanog hepatocelularnog karcinoma, HepG2;
- Ispitivanje akutne toksičnosti metanolnih i/ili dimetil sulfoksidnih intracelularnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva u bioesejima *Artemia salina*, *Daphnia magna* i DarT testu sa embrionima zebrice (*Danio rerio*);

- Utvrđivanje toksičnosti metanolnih intracelularnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva testiranjem inhibicije aktivnosti enzima *in vitro* primenom enzimskih eseja inhibicije protein fosfataze 1 (PP1) i acetilholinesteraze (AChE);
- Skrining analiza citotoksičnosti dimetil sulfoksidnih intracelularnih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva *in vitro* primenom eseja sa ćelijskom linijom RTL-W1 (ćelije jetre kalifornijske pastrmke, *Onchorhynchus mykiss*);
- Određivanje sojeva sa najvećim biotehnoškim potencijalom primenom Analitičkog hijerarhijskog procesa (AHP).

Ostvarenjem opšteg cilja dobiće se uvid u biotehnoški potencijal autohtonih cijanobakterijskih sojeva, prvenstveno kao izvora nutritivno važnih (nutraceutika) i biološki aktivnih jedinjenja (farmaceutika) koji bi mogli naći praktičnu primenu u različitim oblastima ljudske delatnosti.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. ISPITIVANI SOJEVI CIJANOBAKTERIJA I USLOVI KULTIVACIJE

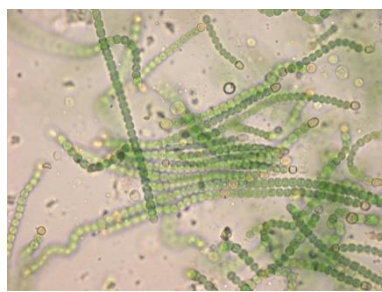
U radu su ispitivani sojevi cijanobakterija koji pripadaju Novosadskoj kolekciji kultura cijanobakterija (NSCCC - Novi Sad Cyanobacterial Culture Collection). Analizirano je ukupno 10 filamentoznih sojeva (Slike 16-25): osam azotofiksirajućih, terestričnih sojeva iz rodova *Nostoc* i *Anabaena*, i dva akvatična soja roda *Spirulina*. Svi sojevi su autohtoni, izolovani iz različitih tipova zemljišta sa područja Vojvodine (Srbija) (Simeunović, 2005), izuzev soja *Spirulina* S1 koji je poreklom iz Instituta za primenjenu mikrobiologiju, Univerzitet u Tokiju (Japan). Detaljni podaci o svim ispitivanim sojevima prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. Testirani sojevi cijanobakterija

Cijanobakterijski soj	Poreklo	Tip talusa
<i>Nostoc</i> 2S7B	solonjec	filamentozni heterocitni
<i>Nostoc</i> 2S9B	solonjec	filamentozni heterocitni
<i>Nostoc</i> 2S3B	solonjec	filamentozni heterocitni
<i>Nostoc</i> 2S1	solonjec	filamentozni heterocitni
<i>Nostoc</i> S8	solonjec	filamentozni heterocitni
<i>Nostoc</i> LC1B	livadska crnica	filamentozni heterocitni
<i>Anabaena</i> Č2	černozem	filamentozni heterocitni
<i>Anabaena</i> Č5	černozem	filamentozni heterocitni
<i>Spirulina</i> S1	Japanska kolekcija kultura	filamentozni neheterocitni
<i>Spirulina</i> S2	obala Dunava	filamentozni neheterocitni



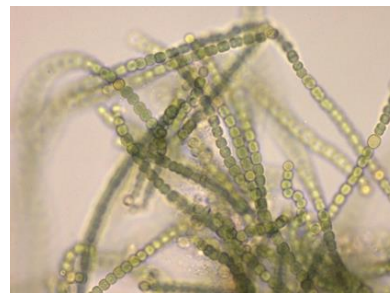
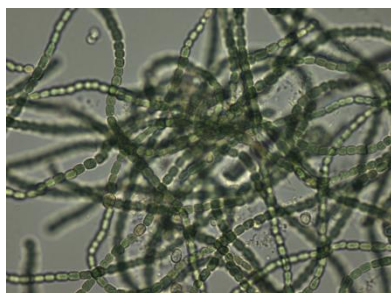
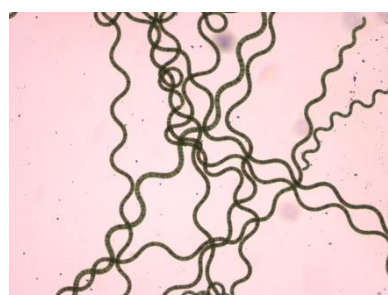
Slika 16. soj *Nostoc* 2S7B



Slika 17. soj *Nostoc* 2S9B



Slika 18. soj *Nostoc* 2S3B

Slika 19. soj *Nostoc* 2S1Slika 20. soj *Nostoc* S8Slika 21. soj *Nostoc* LC1BSlika 22. soj *Anabaena* Č2Slika 23. soj *Anabaena* Č5Slika 24. soj *Spirulina* S1Slika 25. soj *Spirulina* S2

Svi sojevi su gajeni u mirnoj kulturi, na temperaturi od $22-24\pm 1$ °C, pod belim, hladnim, fluorescentnim lampama (Philips, Holandija) i fotoperiodom 12 h osvetljenosti i 12 h mraka. Jačina osvetljenja je merena luksmetrom, i kretala se od 4760 do 5710 lux u različitim tačkama. Sojevi su kultivisani u erlen-majer posudama zapremine 300 mL, sa 300 mL tečne mineralne podloge u koje je prebačen inokulum od 3 ml, pri čemu su azotofiksirajući sojevi kultivisani u podlozi BG-11, sa ili bez dodatog azota u vidu NaNO_3 u koncentraciji od 2 g/L (Rippka i sar., 1979), dok su sojevi roda *Spirulina* kultivisani u podlozi SOT (Ogaw i Terui, 1970). Nakon 21 dana kultivacije biomasa sojeva roda *Spirulina* je sakupljena filtriranjem, a sojeva rodova *Nostoc* i *Anabaena* taloženjem (tokom stacionarne faze rasta), nakon čega je isprana destilovanom vodom i osušena u liofilizatoru (CHRIST ALPHA 2-4 LD plus, Nemačka).

4.2. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE BIOMASE I STOPE RASTA: UTICAJ SVETLOSTI, IZVORA UGLJENIKA I AZOTA

Produkcija biomase je određena u funkciji vremena. Sojevi su kultivisani tokom 42 dana pod opisanim uslovima, pri čemu je na svakih 7 dana određivana koncentracija hlorofila *a* kao pokazatelja produkcije biomase. Kao kontrole korišćene su kulture koje su rasle u fotoautotrofnim uslovima, pod svetlosnim režimom 12 h osvetljenosti i 12 h mraka. Kod svih sojeva je u cilju optimizacije produkcije biomase ispitan rast sa dodatkom glukoze i glicerola u podlogu kao izvora ugljenika (miksotrofan rast), kao i u uslovima kontinualnog osvetljenja, dok je kod azotofiksirajućih sojeva ispitana i produkcija u odsustvu i prisustvu NaNO₃ (2 g/L) kao izvora azota (azotofiksirajući i neazotofiksirajući uslovi). Svi tretmani pod fotoautotrofnim uslovima su izvedeni u dva ponavljanja, i rezultati su izraženi kao srednje vrednosti. Efekat glukoze i glicerola na rast testiranih sojeva je određen pri koncentracijama od 1,5 i 3 g/L.

Za određivanje produkcije biomase, svakih 7 dana inkubacije je uzimano po 10 ml uzorka (kulture), i filtrirano kroz filter papir (Filtres Fioroni Ref: 0111A00009, Ahlstrom, Finska) koji je postavljen u epruvetu sa 5 mL metanola. Nakon 24 h ekstrakcije u mraku na 4 °C, ćelijski zidovi su razarani sonikacijom (10 min sa ciklusima od 30 sekundi) (Ultrasons, J.P. Selecta, Španija), i ćelijski ostaci su odvojeni centrifugiranjem (na 16,000 × *g* 10 min) (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Nakon toga sakupljeni su supernatanti iz kojih je očitana koncentracija hlorofila *a*, merenjem optičke gustine na spektrofotometru (NICOLET Evolution 100, Thermo Electron Corporation) na 663 nm, koristeći metanol za slepu probu. Koncentracija hlorofila *a* je izračunata prema Mackinney-u (1941) na osnovu sledeće jednačine, gde je V1 zapremina uzorka, V2 zapremina metanola, 12,64 korekcija apsorbance, i OD663 optička gustina uzorka na 663 nm:

$$\text{Koncentracija hlorofila } a \text{ } (\mu\text{g}) = \frac{\text{OD663} \times 12,64 \times V1}{V2}$$

Na osnovu dobijene vrednosti za koncentraciju hlorofila *a*, produkcija biomasa je izračunata množenjem koncentracije hlorofila *a* svakog uzorka sa faktorom 67 (APHA, 1992).

Specifična stopa rasta (μ , dan⁻¹) je određena iz krive rasta (Yu i sar., 2009) na osnovu sledeće jednačine, gde je x_2 produkcija biomase u vremenu t_2 , a x_1 produkcija biomase u vremenu t_1 :

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA FIKOBILIPROTEINA: UTICAJ SVETLOSTI, IZVORA UGLJENIKA I AZOTA

Sadržaj fikobiliproteina je određivan spektrofotometrijskom metodom (Bennet i Bogorod, 1973). Kao kontrole korišćene su kulture koje su rasle u fotoautotrofnim uslovima, pod svetlosnim režimom 12 h osvetljenosti i 12 h mraka. Sadržaj pigmenata je kod svih sojeva određivan i u prisustvu glukoze i glicerola (1,5 i 3 g/L), pod kontinualnim osvetljenjem, a kod azotofiksirajućih sojeva u azotofiksirajućim i neazotofiksirajućim uslovima.

Za određivanje sadržaja fikobiliproteina sojevi su kultivisani 42 dana. Svakih 7 dana biomasa svakog uzorka je sakupljena filtriranjem 10 mL kulture kroz filter papir (Filtres Fioroni; Ahlstrom, Finska), koji je postavljen u epruvetu sa 5 mL 0,01 M natrijum-fosfatnog pufera (pH 7,0). Posle 24 h ekstrakcije u mraku na 4 °C, ćelijski zidovi su razarani sonikacijom (10 min sa ciklusima od 30 sekundi) i ostaci ćelija su odvojeni centrifugiranjem (na 16,000 × g 10 min). Nakon toga su sakupljeni supernatanti u kojima je merena apsorbancia na 562 nm za fikoeritrin (PE), 571 nm za fikoeritrocijanin (PEC), 615 nm za fikocijanin (PC) i 652 nm za alofikocijanin (APC), koristeći za slepu probu 0,01 M natrijum-fosfatni pufer (pH 7,0). Iz dobijenih vrednosti apsorbanci, koncentracije pigmenata su izračunate na osnovu sledećih jednačina:

$$PE [mg/mL] = (A_{562} - (2,41 \times PC) - (0,849 \times APC))/9,62$$

$$PC [mg/mL] = (A_{615} - 0,474 \times A_{652})/5,34$$

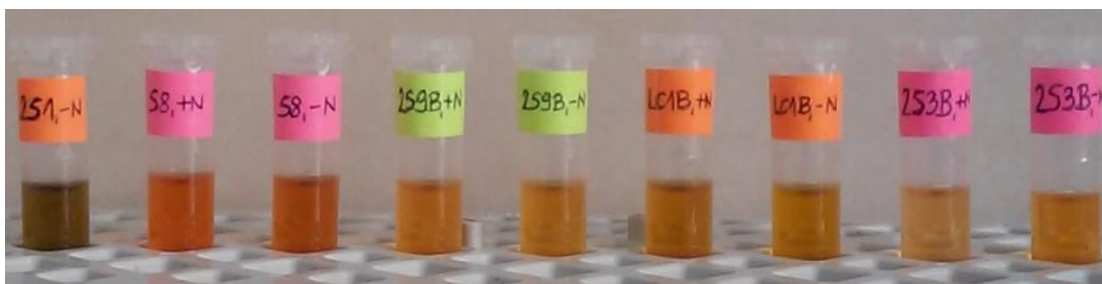
$$APC [mg/mL] = (A_{652} - 0,208 \times A_{615})/5,09$$

4.4. PRIPREMA CIJANOBAKTERIJSKIH EKSTRAKATA ZA ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

U cilju ispitivanja produkcije biološki aktivnih agenasa kod analiziranih sojeva cijanobakterija, pripremljeni su različiti tipovi intracelularnih ekstrakata (Slika 26). Ekstrakti su pripremljeni tako što je liofilizovana biomasa svakog soja odmerena na analitičkoj vagi (OHAUS EX224M, SAD) i suspendovana u odgovarajućem ekstragensu, pri čemu su u zavisnosti od tipa eksperimenta kao ekstragensi korišćeni 75% metanol (MeOH), 70% etanol (EtOH) i dimetil sulfoksid (DMSO). Ekstrakcija je trajala preko noći, nakon čega je vršena sonikacija u ultrazvučnom kupatilu (Ultrasons, J.P. Selecta, Španija) u cilju razbijanja ćelijskih zidova (10 minuta u ciklusima od 30 sekundi), a zatim su odvojeni ostaci ćelija od ekstrakta centrifugiranjem na 6000 obrtaja/minuti tokom 15 minuta (Multi-Spin MSC-6000,

Biosan, EU) na sobnoj temperaturi. Supernatant svakog uzorka je pažljivo prebačen u ependorf kivetu i čuvan u frižideru na 4 °C do upotrebe.

Prilikom pripreme DMSO ekstrakata, biomasa je prvo rastvorena u 1 mL smeše dihlorometana i metanola (1:1) i ostavljena preko noći. Sonikacija i centrifugiranje su izvršeni prema opisanoj proceduri, a sakupljeni supernatanti upareni, nakon čega je u suv ostatak dodato 200 µL DMSO ekstragensa.



Slika 26. Metanolski ekstrakti testiranih sojeva

4.5. ODREĐIVANJE SASTAVA MASNIH KISELINA METODOM GASNE HROMATOGRAFIJE (GC-FID)

U cilju utvrđivanja masnokiselinskog profila ispitivanih sojeva cijanobakterija korišćena je ekstrakcija suve biomase po Folch-u,(1957) nakon čega su dobijeni lipidni ekstrakti podvrgnuti transesterifikaciji (Karlović i Andrić, 1996). U posude za derivatizaciju je odmereno oko 20 mg lipidnog ekstrakta, nakon čega je dodato 0,5 ml 5% NaOH u apsolutnom metanolu i atmosfera u posudi je zamenjena uvođenjem azota tokom 10 sekundi. Nakon toga posude su zatvorene i stavljene na 70 °C u cilju saponifikacije. Nakon 10 minuta, sadržaj posuda je ohlađen na sobnu temperaturu, u posude je dodato 0,5 ml 14% BF₃ u apsolutnom metanolu i posude su zatvorene i zagrevane na 70 °C. Nakon 10 minuta, posude su ohlađene na sobnu temperaturu i u svaku je dodato 0,5 ml zasićenog rastvora NaCl, a zatim 1 ml n-heptana GC čistoće, i sadržaj je blago promućkan. Heptanski sloj je prenet u epruvetu i ispran sa 1 ml zasićenog rastvora NaCl, nakon čega je organski sloj prenet u vijalu za dalju analizu.



Slika 27. Ekstrahovani metil-estri masnih kiselina

Gasno-hromatografska analiza metil-estara masnih kiselina (FAMES) (Slika 27) je izvršena na GC uređaju *Agilent 7890A* sa plameno jonizujućim detektorom (FID, *Flame Ionization Detector*) i kolonom *Supelco SP-2560* (100 m × 0,25 mm; debljina stacionarne faze 0,20 μm). Kao pokretna faza je korišćen helijum (čistoća > 99,9997% (v/v)). Injektovana zapremina uzorka je bila 1 μl (split mod, 1:25), protok = 1,21 mL/min, sa temperaturnim programom kolone: početna temperatura 140 °C, zadržana 7,945 min; zagrevanje do 280 °C brzinom 3,47 °C/min, bez zadržavanja (ukupno vreme trajanja: 48,333 min). Identifikacija pikova metil-estara masnih kiselina je urađena korišćenjem smeše 37 standarda (*Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix*, Sigma-Aldrich). Rezultati su izraženi kao maseni procenat masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± standardna devijacija (SD).

4.6. HPLC-MS/MS SKRINING ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA

U cilju utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima ispitivanih sojeva cijanobakterija korišćena je metoda Orčić i sar. (2014). Ekstragensi mobilne faze pomešani u odnosu 1:1 su korišćeni za razblaživanje ekstrakata do finalne koncentracije od 2 mg/mL. Ekstrakti su analizirani primenom LC-MS/MS tehnike, korišćenjem *Agilent Technologies 1200 Series* tečnog hromatografa visoke performanse kuplovanog sa 6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), kontrolisanog od strane *Agilent Technologies MassHunter* ver. B.03.01 softvera. Za razdvajanje je korišćena *Zorbax Eclipse XDB-C18* (50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm) kolona pri temperaturi od 50 °C. Injektovana zapremina je bila 5 μL, a protok je iznosio 1 mL/min. HPLC analiza je izvedena korišćenjem mobilne faze koja se sastojala od 0.05% mravlje kiseline (A) i metanola (B) u gradijent modu (0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, sa post-vremenom od 3 min). Za detekciju fenolnih jedinjenja su korišćeni ESI parametri: pritisak gasa nebulajzera (N₂) 276 kPa, gas za sušenje (N₂) protoka 9 L/min i temperature 350 °C, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Podaci su dobijeni u dinamičkom MRM (*multiple reactions monitoring*) modu, koristeći optimizovane parametre korišćene metode. Identifikacija pikova je urađena korišćenjem odabranih standarda (galna kiselina, katehin, protokatehinska kiselina, hlorogenska kiselina, epigalokatehin galat, epikatehin, 2,5 dihidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, eskuletin, kafena kiselina, vanilinska kiselina, siringska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, umbeliferon, skopoletin, ferulna kiselina, viteksin, sinapinska kiselina, luteolin-7-*O*-glukozid, hiperozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, rutin, apiin, *o*-kumarinska kiselina, miricetin, kvercitrin, kemferol-3-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukozid, sekoizolaricirezinol, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, bajkalin, daidzein, matairezinol, kvercetin, naringenin, cimetna kiselina, luteolin, genistein,

kemferol, apigenin, izoramnetin, krizoeriol, bajkalein, amentoflavon) (Sigma–Aldrich Chem, Fluka Chemie GmbH, Chromadex).

4.7. ODREĐIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI CIJANOBAKTERIJSKIH SOJEVA

U cilju detekcije biološke aktivnosti testiranih sojeva cijanobakterija korišćene su metode za određivanje antioksidantnog potencijala, antibakterijske aktivnosti, antikancerogene aktivnosti i toksičnosti, primenom odgovarajućih ekstrakata cijanobakterijskih sojeva.

4.7.1. Određivanje antioksidantnog potencijala cijanobakterija

U cilju određivanja antioksidantnog potencijala ispitivanih cijanobakterijskih sojeva primenjene su dve metode - DPPH metod kojim se određuje kapacitet neutralizacije DPPH[•] radikala i FRAP metod kojim se određuje redukciona sposobnost.

Određivanje neutralizacije DPPH[•] radikala

"Skevindžer" aktivnost cijanobakterijskih etanolnih ekstrakata na DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikale je analizirana primenom spektrofotometrijske metode (Espin i sar., 2000), prilagođenoj za mikrotitar ploče. Metoda se zasniva na praćenju promene boje rastvora iz ljubičaste u žutu, kao posledica prevođenja DPPH[•] radikala u redukovani neutralni DPPH-H oblik, pod uticajem komponenata iz rastvora koje deluju kao donori vodonika.

Cijanobakterijski ekstrakti testirani su u opsegu koncentracija od 0,5 do 400/10000 µg/mL. Pripremljeni rastvori prikazani su u Tabeli 6. Apsorbanca je merena na 540 nm na spektrofotometru (Multiscan GO, Thermo Scientific) nakon inkubacije u mraku na 25 °C u trajanju od 30 min.

Tabela 6. Pripremljeni rastvori za određivanje neutralizacije DPPH[•] radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola
10 µL ekstrakta	10 µL ekstrakta	10 µL ekstragensa
180 µL MeOH	240 µL MeOH	180 µL MeOH
60 µL 90 µM DPPH [•]		60 µL 90 µM DPPH [•]

Za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta, kao i za kontrolu, apsorbance (A) je izračunata iz razlike apsorbance radne probe (A_{rp}) i apsorbance korekcije (A_{kor}):

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

Kapacitet „hvatanja“ slobodnih DPPH^{*} radikala (RSC, *radical scavenging capacity*) je izračunat na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbance kontrole:

$$RSC (\%) = 100 - A * 100 / A_{kon}$$

Antioksidativna aktivnost testiranih ekstrakata je izražena kao IC_{50} - koncentracija ekstrakta koja neutrališe 50% DPPH^{*} radikala. IC_{50} vrednosti su izračunate nelinearnom regresijom korišćenjem softverskog paketa Origin, verzija 8. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD). Kao pozitivna kontrola korišćen je sintetički antioksidant 3,5-di-tert-butil-4-hidroksitoluen (BHT).

Određivanje redukcionog potencijala (FRAP test)

Redukcioni potencijal etanolnih ekstrakata cijanobakterija određen je po metodi Benzie-a i Strain-a (1996), prilagođenoj za mikrotitar ploče. FRAP reagens sadržao je 10 mmol/L TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u 40 mmol/L HCl, 0,02 mol/L FeCl₃ i acetatni pufer (pH 3.6) u odnosu 1:1:10. FRAP reagens je sveže pripremljen i zagrevan do 37 °C. Od svakog testiranog ekstrakta u mikrotitar ploču je stavljeno po 10 μ L, tako da je finalna koncentracija bila 388,35 μ g/mL. Pripremljeni rastvori prikazani su u Tabeli 7. Apsorbance je merena na 595 nm na spektrofotometru (Multiscan GO, Thermo Scientific) nakon inkubacije od 6 min na sobnoj temperaturi. Standardna kriva je konstruisana korišćenjem rastvora askorbinske kiseline u rasponu koncentracije od 0-38,91 μ g/mL. Kao pozitivna kontrola korišćen je sintetički antioksidant butilovani hidroksitoluen (BHT).

Tabela 7. Pripremljeni rastvori za određivanje redukcionog potencijala

Radna proba	Korekcija	Slepa proba
10 μ L ekstrakta	10 μ L ekstrakta	10 μ L ekstragensa
22,5 μ L dH ₂ O	247,5 μ L dH ₂ O	22,5 μ L dH ₂ O
225 μ L FRAP reagensa		225 μ L FRAP reagensa

Za svaki testirani ekstrakt apsorbance (A) je izračunata iz razlike apsorbance radne probe (A_{rp}) i apsorbance korekcije (A_{kor}):

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

Redukcioni potencijal uzoraka je izražen u mg ekvivalenata askorbinske kiseline (AAE)/g suve mase. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD).

4.7.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti cijanobakterija

U cilju utvrđivanja antibakterijske aktivnost cijanobakterija korišćeno je osam referentnih sojeva različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih vrsta: *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Bakterijski sojevi su kultivisani na podlozi MH (Müeller Hinton, Torlak) 24 časa u termostatu na 37 °C. Suspenzije izraslih kultura su pripremane u fiziološkom rastvoru turbiditeta 0.5 McFarlanda (oko 1×10^8 CFU/mL).

Primenjeni metod predstavlja modifikaciju klasičnog antibiogram testa (Prabuseenivasan i sar., 2006). Bakterijske suspenzije pripremljene u fiziološkom rastvoru (0,5 McF) su zasejane metodom razmazivanja na podlogu MH, pri čemu je količina inokuluma iznosila 100 μ L. Nakon sušenja, na površinu su postavljeni sterilni papirni diskovi (Sigma) dijametra 6 mm. Na svaki disk je stavljano po 30 μ L metanalnog ekstrakta testiranih cijanobakterija koncentracije 10 mg/mL. Kao kontrola korišćen je ekstragens primenjen za ekstrakciju, 75% metanol. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, meren je prečnik zone inhibicije. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost dva ponavljanja \pm standardna devijacija (SD).

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Određivanje vrednosti MIC i MBC je vršeno kod onih sojeva cijanobakterija koji su disk-difuzionom metodom pokazali antibakterijsku aktivnost, pri čemu su korišćeni metanolski i DMSO ekstrakti. Određivanje vrednosti MIC vršeno je prema protokolu (CLSI, 2007), u mikrotitar pločama. Svi ekstrakti su ispitani u seriji duplih razblaženja, pri čemu je za metanolske ekstrakte korišćen opseg finalnih koncentracija od 0,1875 do 3 mg/mL, a za DMSO ekstrakte od 0,625 do 10 mg/mL u podlozi MPB (mesopeptonski bujon, Torlak).

Svaki otvor mikrotitar ploče inokulisan je sa 1 μL 10 puta razblažene suspenzije 0.5 MacFarland određenog bakterijskog soja. Mikrotitar ploče su ostavljene na inkubaciju od 18 do 24 h na 37 °C. Najmanja koncentracija ekstrakta na kojoj je odsustvovao rast bakterija uzimana je za minimalnu inhibitornu koncentraciju. Negativna kontrola podrazumevala je inokulaciju bakterija na MPB podlogu u koje je dodata odgovarajuća zapremina ekstragensa. Sve kombinacije bakterija i koncentracija ispitivanih ekstrakata rađene su u tri ponavljanja.

Vrednost MBC je određena presejavanjem sadržaja onih tretmana kod kojih je zabeleža inhibicija ili odsustvo rasta bakterija sa mikrotitar ploče na podlogu MH. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C kao MBC uzimana je ona koncentracija ekstrakta pri kojoj je ubijeno 99,99% bakterija, odnosno pri kojoj nema rasta ili je rast bakterija na čvrstoj podlozi vrlo slab. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik tetraciklin čije MIC vrednosti su određene za pojedine bakterijske sojeve.

4.7.3. Određivanje antikancerogene aktivnosti *in vitro* u eseju sa humanom ćelijskom linijom HepG2

Za procenu antikancerogene aktivnosti cijanobakterija tj. citotoksične aktivnosti, korišćen je MTT test prema proceduri Kaišarević i sar. (2009), sa ćelijskom linijom humanog hepatocelularnog karcinoma - HepG2. Ovaj kolorimetrijski test se zasniva na merenju konverzije žutog jedinjenja MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid) u ljubičasti talog formazana. HepG2 ćelije su kultivisane u medijumu MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*; Sigma Aldrich) sa 1,5 g/L natrijum bikarbonata, 0,11 g/L natrijum piruvata, 0,1 g/L streptomicina i 100 000 IU/L penicilina, uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i HEPESA (20 mM). Ćelije su zasađene u mikrotitar ploče (30 000 ćelija po otvoru) i inkubirane 24 h u atmosferi zasićenoj vodenom parom, sa 5% CO₂ na 37 °C. Za testiranje citotoksičnosti, ispitivani DMSO cijanobakterijski ekstrakti su rastvoreni u kompletnom medijumu MEM u finalnim koncentracijama: 4, 100, 400 i 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. MEM medijum i paclitaxel (Teva, Srbija) su korišćeni kao negativna i pozitivna kontrola, respektivno. Takođe je testiran i ekstragens (DMSO), u rasponu koncentracija koje uključuju ispitane koncentracije ekstrakata.

Nakon perioda ekspozicije od 24 h, izbačen je sadržaj iz otvora mikrotitar ploča, nakon čega je u svaki otvor dodato 0,05 mg/0,1 mL/otvoru MTT-a rastvorenog u MEM-u bez FBS-a, i ostavljeno 3 h na inkubaciju. Nakon inkubacije, MTT je uklonjen iz otvora, i u sve otvore ploča je dodato po 100 μL 0,04 M HCl u izopropanolu. Nakon 10 minuta merena je apsorbancija na 540 nm, sa referentnom talasnom dužinom na 690 nm na spektrofotometru (Multiscan GO, Thermo Scientific).

Razlike između vrednosti očitanih apsorbanci na 540 i 690 nm su izračunate u programu Microsoft Office Excel 2007. Testirane koncentracije su log transformisane, i

dobijene vrednosti su normalizovane do procenata pre statističke analize. Svi rezultati su izraženi kao procenat vijabilnosti, i predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD).

4.7.4. Detekcija toksičnosti cijanobakterija

U cilju detekcije toksičnosti sojeva cijanobakterija korišćeni su bioeseji *Artemia salina*, *Daphnia magna*, test sa embrionima zebrice (*Danio rerio*, DarT), ćelijska linija RTL-W1 (ćelije jetre kalifornijske pastrmke, *Onchorhynchus mykiss*) i eseji inhibicije enzima protein fosfataze 1 (PP1) i acetilholinesteraze (AChE).

4.7.4.1. Detekcija toksičnih sojeva primenom bioeseja

Test akutne toksičnosti na vrsti *Artemia salina*

Bioesej *Artemia salina* je izveden po metodi Kivirante i sar. (1991), u mikrotitar pločama. U erlenmajer posudu sa 100 mL sterilne podloge ASW (*artificial sea water*) je dodato 0,6 g jaja račića vrste *Artemia salina* (Sanders, GREAT SALT LAKE ARTEMIA CYSTS, SAD) koja su inkubirana na 30 °C pod osvetljenjem i aeracijom. Istovremeno su u otvore mikrotitar ploča, koji su prethodno dobro isprani destilovanom vodom, stavljene ekstrakti u opsegu finalnih koncentracija od 0,44 do 10 mg/mL za MeOH ekstrakte i od 0,75 do 10 mg/mL za DMSO ekstrakte. Nakon apliciranja ekstrakata, ploče su ostavljene u termostatu radi uparavanja ekstragensa. Nakon 24-30 h, izlegle larve (Slika 28) su korišćene u bioeseju. U svaki otvor sa uparenim ekstraktom je dodato 10-20 izleglih larvi u zapremini od 100 μ L ASW, i po 100 μ L ASW. Kao kontrola korišćena je ASW, a postavljena je i tzv. dodatna kontrola sa uparenim ekstragensima (MeOH i DMSO). Ploče su pokrivene poklopcem i ostavljene na inkubaciju na 30 °C, pod osvetljenjem. Kao biološki parametar, u testu se pratio mortalitet račića, odnosno njihova imobilizacija nakon 24 h i 48 h. Kako bi se odredio ukupan broj račića potreban za izračunavanje mortaliteta, na kraju eksperimenta je u svaki otvor dodato po 100 μ L čistog metanola da bi se ubili svi račići. Kriterijum za validnost testa je zadovoljen jer je mortalitet jedinki u kontroli, kao i dodatnoj kontroli sa ekstragensom bio < 3% i 10%, respektivno.



Slika 28. Izleganje larve *A. salina* (www.scielo.br/scielo.php)

Mortalitet (%) za svaku testiranu koncentraciju je izračunat iz razlike srednje vrednosti mortaliteta iz tri ponavljanja i mortaliteta u kontroli. Na osnovu sprovedenih testova su izračunate letalne koncentracije, tj. LC_{50} i LC_{25} – koncentracije ekstrakata koje izazivaju smrtnost 50%, odnosno 25% eksponiranih jedinki. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD).

Test akutne toksičnosti na vrsti *Daphnia magna*

Test akutne toksičnosti na vrsti *Daphnia magna* (Slika 29) je izveden na osnovu ISO 6341 standardnog protokola (ISO, 1996). Period ekspozicije, koji je definisan standardnim protokolom, je iznosio 48 h. U testu su korišćene neonate – jedinke do 24 h starosti. Tri sata pred izvođenje testova neonate su nahranjene kvascem.

Test posude (laboratorijske čašice) su bile zapremine 50 ml i sadržale su 25 ml test rastvora. Svaki cijanobakterijski ekstrakt je ispitan u opsegu finalnih koncentracija od 60 do 480 $\mu\text{g/mL}$ za MeOH ekstrakte i u opsegu finalnih koncentracija i od 4,69 do 150 $\mu\text{g/mL}$ za DMSO ekstrakte. Svaki tretman je postavljan u četiri ponavljanja, sa pet neonata po test posudi (ukupno 20 neonata za svaki tretman). Tokom perioda trajanja testa neonate nisu hranjene. M_4 hranjivi rastvor (medijum) je korišćen kao kontrola i diluent za pravljenje serije razblaženja. Postavljena je i dodatna kontrola sa ekstragensom (0,1% DMSO, uparen MeOH). Svaki tretman je urađen kao jedan nezavisan eksperiment.

Na početku i na kraju testa su praćeni osnovni fizičko-hemijski parametri rastvora: temperatura, koncentracija kiseonika i pH. Temperatura je iznosila 22 °C, pH vrednost je bila u opsegu 6-9, dok je koncentracija kiseonika bila iznad 3 mg/l, što je bilo u okviru preporučenih vrednosti.



Slika 29. *Daphnia magna*
(www.moniqueslivefishfoods.co.uk)



Slika 30. Postavljeni tretmani

Test je izveden u statičkim uslovima, što znači da tokom celokupnog perioda trajanja testa nije vršena promena rastvora u kontroli i tretmanima sa ekstraktima. Intenzitet osvetljenja je bio oko 700 lux, a fotoperiod 16 h osvetljenosti i 8 h mraka. Test posude su postavljane nasumično da bi se minimalizovao uticaj razlika u osvetljenosti i temperaturi (Slika 30). Dodatno, test posude su bile prekrivene providnim staklenim pločama kako bi se umanjilo isparavanje i sprečila eventualna kontaminacija. Kao biološki parametar, u testu se pratilo uginuće neonata, odnosno njihova imobilizacija, i to nakon 24 h i na kraju testa, odnosno nakon 48 h. Kriterijum za validnost testa je zadovoljen jer je preživljavanje jedinki u kontroli, kao i dodatnoj kontroli sa ekstragensom bilo > 90%.

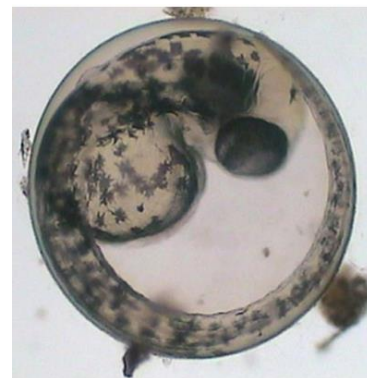
Neposredno pred izvođenje testova sa ekstraktima cijanobakterija, osetljivost laboratorijske kulture *D. magna* je proverena testom sa referentnom supstancom ($K_2Cr_2O_7$), u seriji od pet koncentracija u rasponu od 0,3125 do 5 mg/L. Laboratorijska kultura je pokazala zadovoljavajuću osetljivost, LC_{50} za $K_2Cr_2O_7$ je bila u okviru standardom propisanih vrednosti.

Test sa embrionima zebrice (*Danio rerio*) – DarT test

Test na embrionima vrste *Danio rerio* (DarT) je izveden prema metodi Nagel-a (2002), u mikrotitar pločama sa 24 otvora. Ekstrakt svakog uzorka (DMSO) rastvoren je u rekonstituisanoj vodi i testiran u finalnim koncentracijama u opsegu od 5 do 100 $\mu\text{g/mL}$. U testu su korišćeni riblji embrioni (Slika 31) starosti do 2h.

U svaki otvor ploče aplicirano je po 2 ml test rastvora, nakon čega je postavljan po jedan embrion/otvoru. Rekonstituisana voda je korišćena kao kontrola. Svaki test tretman je postavljan u 10 ponavljanja, a kontrolni u 20 ponavljanja. Postavljena je i dodatna kontrola sa ekstragensom (DMSO), kao i interna kontrola (4 otvora na svakoj ploči) sa rekonstituisanom vodom. Ploče sa embrionima su postavljene na $26\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Kao biološki parametar, u testu se pratilo uginuće embriona nakon 24 h i na kraju testa, odnosno nakon 48 h. Uginuće embriona se pratilo preko letalnih parametara: koagulacija, neodvajanje repa, odsustvo formiranja somita, nedostatak srčane frekvencije i izostanak ispijavanja.

Na osnovu sprovedenih testova izračunate su letalne koncentracije, tj. LC_{50} i LC_{25} , regresionom analizom korišćenjem softvera GraphPad Prism 6 za Windows. Kriterijum za validnost testa je zadovoljen, jer je preživljavanje embriona u kontroli, kao i dodatnoj kontroli sa ekstragensom bilo >70%. Nije bilo negativnog uticaja na preživljavanje embriona u tretmanu dodatne kontrole sa ekstragensom u odnosu na kontrolu, tako da su rezultati sa



Slika 31. Embrion *D. rerio*
(www.hydrotox.de/en)

testiranim ekstraktima, u testovima gde se koristio DMSO, poređeni sa dodatnom kontrolom sa ekstragensom.

Određivanje citotoksičnosti na ćelijskoj liniji RTL-W1

Za procenu citotoksičnosti cijanobakterija korišćen je MTT test prema proceduri Kaišarević i sar., (2009), sa ćelijskom linijom jetre kalifornijske pastrmke (*Onchorhynchus mykiss*) - RTL-W1. Ćelije su zasađene u mikrotitar ploče (15 000 ćelija po otvoru) i inkubirane 24 h na 17 °C. Za testiranje citotoksičnosti, ispitivani DMSO cijanobakterijski ekstrakti su rastvoreni u medijumu u finalnim koncentracijama: 4, 100, 400 i 2000 µg/mL. Medijum i paclitaxel (Teva, Srbija) su korišćeni kao negativna i pozitivna kontrola, respektivno. Takođe je testiran i ekstragens (DMSO), u rasponu koncentracija koje uključuju ispitane koncentracije ekstrakata.

Nakon perioda ekspozicije od 24 h, izbačen je sadržaj iz otvora mikrotitar ploča, nakon čega je u svaki otvor dodato 0,05 mg/0,1 mL/otvoru MTT-a rastvorenog u MEM-u bez FBS-a, i ostavljeno 3 h na inkubaciju. Nakon inkubacije, MTT je uklonjen iz otvora, i u sve otvore ploča je dodato po 100 µL 0,04 M HCl u izopropanolu. Nakon 10 minuta merena je apsorbanca na 540 nm, sa referentnom talasnom dužinom na 690 nm na spektrofotometru (Multiscan GO, Thermo Scientific).

Razlike između vrednosti očitanih apsorbanca na 540 i 690 nm su izračunate u programu Microsoft Office Excel 2007. Testirane koncentracije su log transformisane, i dobijene vrednosti su normalizovane do procenata pre statističke analize. Svi rezultati su izraženi kao procenat vijabilnosti, i predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja ± standardna devijacija (SD).

4.7.4.2. Detekcija toksičnih sojeva primenom enzimskih eseja

Test inhibicije enzima PP1

In vitro inhibicija aktivnosti enzima protein fosfataze 1 (PP1) cijanobakterijskim ekstraktima (MeOH) određena je po metodi (An i Carmichael, 1994; Simeunović, 2009) prilagođenoj za mikrotitar ploče. U testu je korišćen rekombinovan enzim PP1, ekspresovan u *E. coli* (PP1, Sigma Aldrich). Kao supstrat za enzim korišćen je p-nitrofenilfosfat (p-NPP) koji se aktivnošću PP1 prevodi do žutog produkta paranitrofenola (pNP).

U svaki otvor mikrotitar ploče stavljeno je 10 µL PP1 i 10 µl odgovarajućeg ekstrakta, nakon čega je dodato 180 µL pNPP. PP1 je rastvoren u puferu koji sadrži 50 mM Tris-HCl, 1

mM Na₂EDTA, 2 mM MnCl₂, 0,5 g/L BSA (Bovin serum albumin, Sigma) i 0,1% β-merkaptotanol, i pH je podešen na 7,4. p-NPP (60 mM) je rastvoren u puferu koji sadrži 50 mM Tris-HCl (pH 8,1), 0,2 mM MnCl₂ i 20 mM MgCl₂. Aktivnost PP1 enzima određena je merenjem intenziteta nastalog žutog produkta pNP nakon inkubacije na 37±1 °C u trajanju od 2 h. Apsorbanca pNP merena je na 405 nm na spektrofotometru (Multiscan GO, Thermo Scientific). Procenat inhibicije PP1 izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$I_{PP1} (\%) = (A_{kon} - A_{uz} / A_{kon}) \times 100$$

IC₅₀ i IC₂₅ vrednosti su izračunate regresionom analizom. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± standardna devijacija (SD). Kao negativna kontrola korišćena je dejonizovana voda, dok je pozitivna kontrola bio čist toksin mikrocistin-LR.

Test inhibicije enzima AChE – detekcija neurotoksičnosti

In vitro inhibicija aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE) cijanobakterijskim ekstraktima (MeOH) određena je po metodi Ellman-a i sar. (1961), prilagođenoj za mikrotitar ploče. Kao supstrat za AChE korišćen je acetilholin jodid (AChI) poreklom iz električne jegulje (Sigma Aldrich), koji se degradira do acetata i tioholina, i zajedano sa natrijum bikarbonatom i ditiobenzoatom (DTNB) ulazi u sastav Elmanovog reagensa. Metoda se zasniva na praćenju boje rastvora; DTNB sa nastalim tioholinom daje intenzivno žutu boju, dok u slučaju inhibicije AChE boja rastvora ostaje svetlo žuta. Svaki ekstrakt je testiran u 5 finalnih koncentracija u opsegu od 0,09 do 2,73 mg/mL. Pripremljeni rastvori prikazani su u Tabeli 8.

Tabela 8. Pripremljeni rastvori za određivanje inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze (AChE)

Radna proba	Korekcija	Kontrola
20 μL ekstrakta	20 μL ekstrakta	20 μL ekstragensa
150 μL Elmanovog reagensa	150 μL Elmanovog reagensa	150 μL Elmanovog reagensa
50 μL AChE	50 μL pufera pH 8	50 μL AChE

Radne probe sa ekstraktom i Elmanovim reagensom su preinkubirane 12 minuta na 25 °C. Nakon toga je u otvore mikrotitar ploče dodato 50 μL AChE (518 U/mL). Apsorbanca je merena tokom 10 minuta na 412 nm na spektrofotometru (Multiscan GO, Thermo Scientific). Rezultat je izražen kao procenat inhibicije AChE, i izračunat na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{rp} apsorbanca radne probe, a A_{kon} apsorbanca kontrole:

$$I_{\text{AChE}} (\%) = (1 - A_{\text{rp}}/A_{\text{kon}}) \times 100$$

IC₅₀ i IC₂₅ vrednosti su izračunate regresionom analizom. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± standardna devijacija (SD). Kao pozitivna kontrola korišćen je donepezil u koncentraciji 1 mg/mL (Donecept, Zdravlje Leskovac, Srbija).

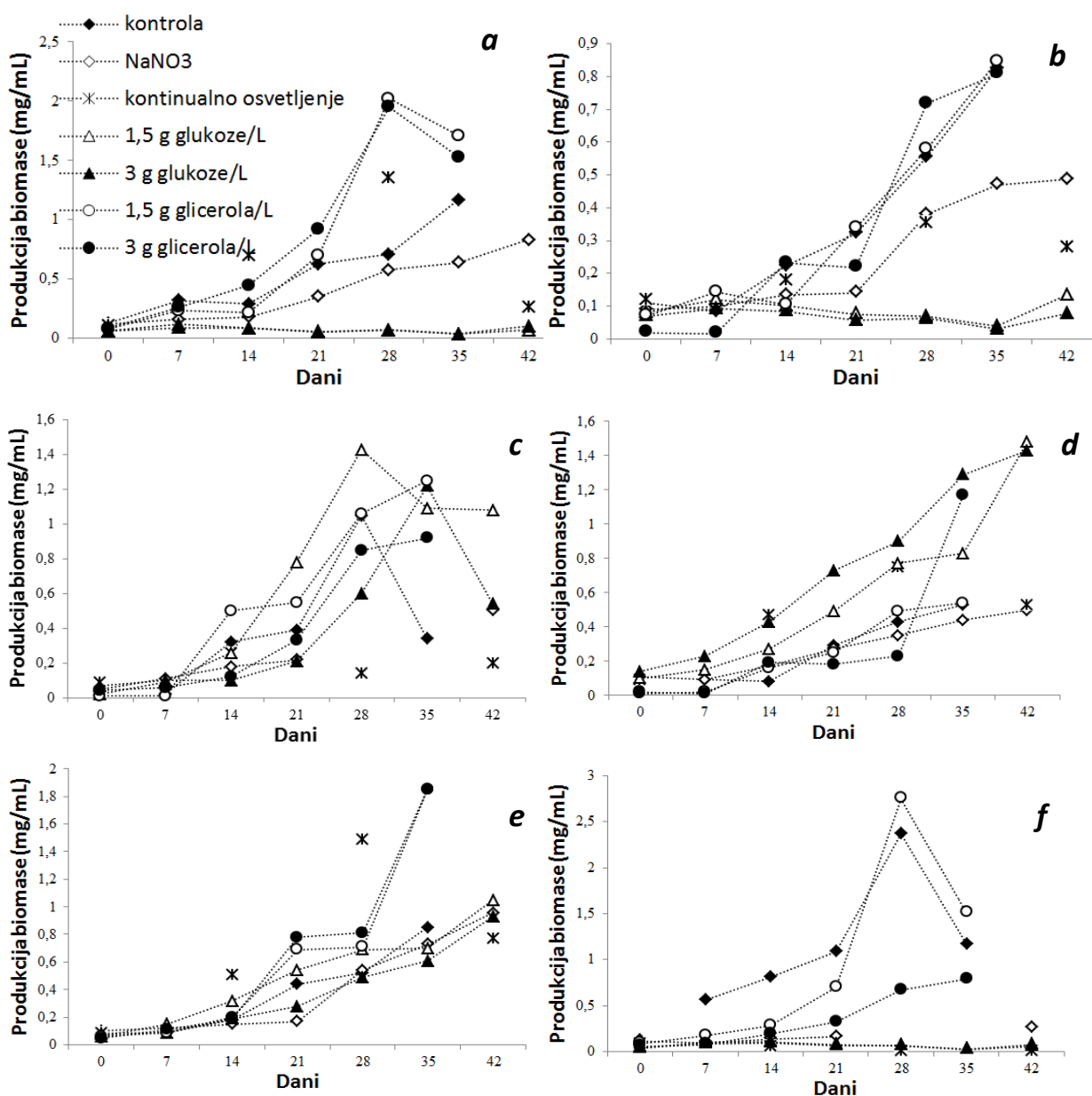
4.9. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

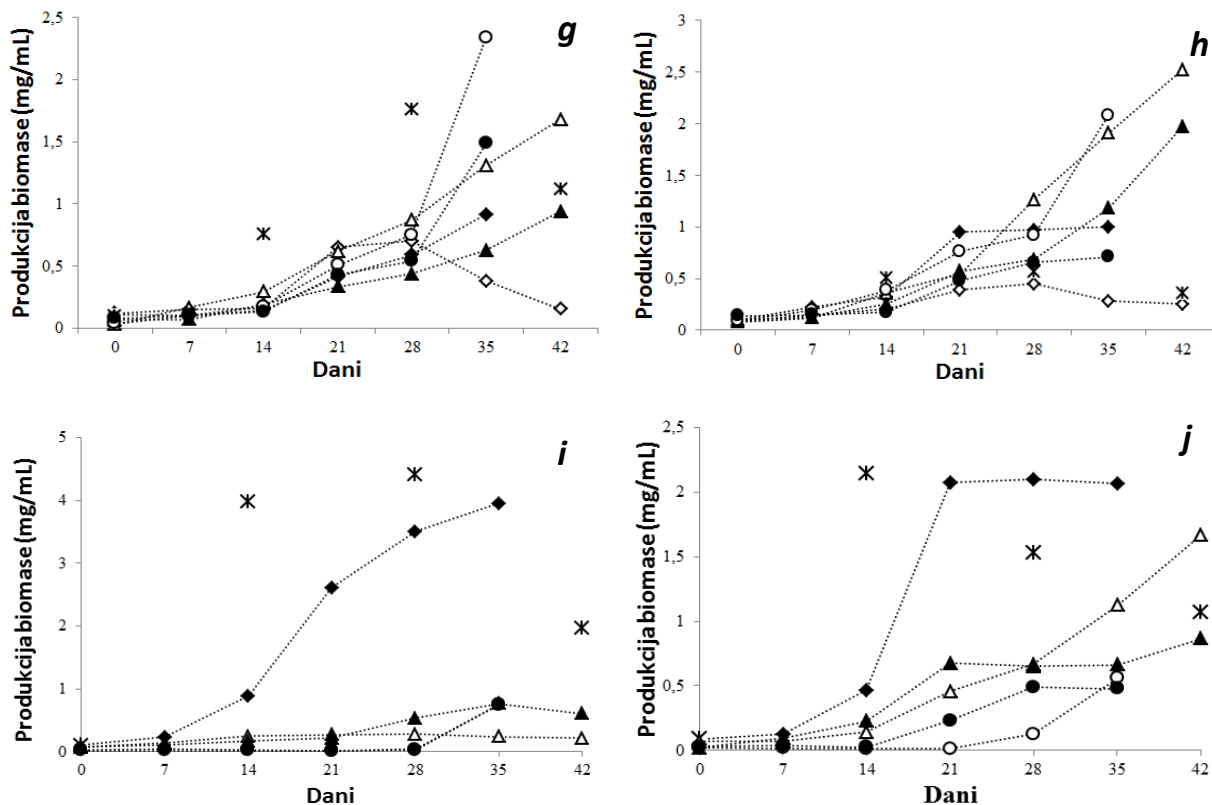
Za statističku obradu rezultata korišćeni su softverski paketi Microsoft Excel 2007 for Windows i StatSoft Statistica (data analysis software system), version 9.0. Dozno-zavisne krive u korišćenim bioesejima i esejima inhibicije enzima dobijene su korišćenjem nelinearnog regresionog modela u softveru GraphPad Prism 6 za Windows. Sva merenja su urađena u tri ponavljanja, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Pearson korelacije su izračunate između ukupnog sadržaja detektovanih fenola i antioksidantne aktivnosti u DPPH i FRAP testu. Tukey-ev test je korišćen za određivanje statistički značajne razlike antioksidativne aktivnosti između ekstrakata pri nivou značajnosti od $p < 0,05$.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. PRODUKCIJA BIOMASE ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA

U cilju određivanja osnovnih karakteristika rasta, produkcija biomase testiranih cijanobakterijskih sojeva određena je u različitim uslovima kultivacije (primenom spektrofotometrijske metode, na osnovu merenja koncentracije hlorofila *a*). Na Slici 32 prikazane su krive rasta testiranih sojeva u standardnim uslovima kultivacije, pod kontinualnim osvetljenjem, sa dodatkom glukoze, glicerola, a kod azotofiksirajućih sojeva i sa dodatkom NaNO_3 kao izvora azota (neazotofiksirajući uslovi). Kao takođe veoma važan parametar rasta određene su i stope rasta svih testiranih sojeva cijanobakterija (Tabela 9).





Slika 32. Produktivnost biomase kod testiranih sojeva cijanobakterija u različitim uslovima kultivacije. (a) – *Nostoc* 2S7B, (b) - *Nostoc* 2S9B, (c) – *Nostoc* 2S3B, (d) - *Nostoc* 2S1, (e) – *Nostoc* S8, (f) - *Nostoc* LC1B, (g) - *Anabaena* Č2, (h) - *Anabaena* Č5, (i) - *Spirulina* S1, (j) - *Spirulina* S2.

Uticaj ispitivanih faktora na sojeve cijanobakterija se razlikovao. Primenom kontinualnog osvetljenja, povećana proizvodnja biomase (2,5-6 puta) i specifična stopa rasta u odnosu na kontrolu uočena je kod 6 sojeva (*Nostoc* 2S7B, 2S1 i S8, *Anabaena* Č2, *Spirulina* S1 i S2), pri čemu je najveći efekat zabeležen kod sojeva roda *Spirulina*. Kod soja *Spirulina* S1 specifična stopa rasta je povećana od $0,102 \text{ dan}^{-1}$ do $0,260 \text{ dan}^{-1}$, a najveća proizvodnja biomase od $4,4 \text{ mg/mL}$ (Slika 32i) je zabeležena 28. dana kultivacije. Kod soja *Spirulina* S2 specifična stopa rasta je povećana od $0,149 \text{ dan}^{-1}$ do $0,227 \text{ dan}^{-1}$, dok je najveća proizvodnja biomase registrovana 14. dana i iznosila je $2,15 \text{ mg/mL}$ (Slika 32j). U kontrolama ovih sojeva najveća proizvodnja je zabeležena kasnije, 35. dana kod soja *Spirulina* S1 i 21. dana kod soja *Spirulina* S2. Poređenjem dobijenih rezultata se može uočiti da je pod kontinualnim osvetljenjem kod ova dva soja 14. dana kultivacije postignuta veća proizvodnja biomase u poređenju sa ostalim sojevima, pri čemu se kod soja *Spirulina* S2 nakon ovog perioda može uočiti postepeno smanjenje biomase. Sa druge strane, kod sojeva *Nostoc* 2S9B, 2S3B i LC1B primena kontinualnog osvetljenja je uticala na smanjenje proizvodnje biomase.

Kod fotosintetičkih organizama, svetlost određuje nivo NADP/NADPH, ATP i ugljenikovih jedinjenja, koji mogu učestvovati u moduliranju ćelijskih procesa (Grossman i

sar., 2001). Stimulativno dejstvo kontinualnog osvetljenja na produkciju biomase cijanobakterija su zabeležili Chaneva i sar. (2007) kod vrste *Arthronema africanum*, dok su Jacob-Lopes i sar. (2009) kod soja *Aphanothece* spp. sa smanjenjem perioda osvetljenja registrovali linearno smanjenje biomase i stope fiksacije CO₂, što ukazuje na značaj svetle faze fotosinteze u narednim reakcijama fiksacije ugljenika. Produkcija biomase od 4,0 mg/mL koja je u ovom istraživanju dobijena kod soja *Spirulina* S1 je bila veća u poređenju sa rezultatima drugih grupa autora za vrste roda *Spirulina* kultivisane u različitim svetlosnim uslovima: 0,8 mg/mL (Kepekçi i Saygideger, 2012), 1,0 mg/mL (Andrade i Costa, 2007) i 2,6 mg/mL (Ravelonandro i sar., 2008). Štaviše, u ovom istraživanju uočeno je da je primena kontinualnog osvetljenja imala najjači efekat na sojeve koji pripadaju rodu *Spirulina*, povećavajući njihovu biomasu za oko 4,5 puta. Dobijeni rezultati ukazuju na to da bi odgovor cijanobakterija na fotorežim mogao biti svojstvo specifično za određeni takson, koje bi se moglo koristiti naročito u cilju povećanja produkcije biomase vrsta roda *Spirulina* ili njihovih vrednih metabolita (Kovač i sar., 2017).

Najveći potencijal za miksotrofan rast uočen je kod azotofiksirajućih sojeva koji su rasli u podlozi sa oba testirana organska supstrata (*Nostoc* 2S3B, 2S1 i S8, *Anabaena* Č2 i Č5). Produkcija biomase je u prisustvu glukoze povećana kod 4 soja (*Nostoc* 2S3B i 2S1, *Anabaena* Č2 i Č5), a u prisustvu glicerola kod 7 sojeva (*Nostoc* 2S7B, 2S3B, 2S1, S8 i LC1B, *Anabaena* Č2 i Č5). Primenom glukoze, najveća produkcija biomase od 2,53 mg/mL je dobijena kod soja *Anabaena* Č5 (Slika 32h) i u odnosu na kontrolu povećana je 2,5 puta. Sa druge strane, specifična stopa rasta nije povećana, jer je u prisustvu glukoze produkcija biomase postepeno rasla u funkciji vremena i do 42. dana kultura nije ušla u stacionarnu fazu. Razlog tome mogao bi biti postepena adaptacija kulture na organski supstrat s obzirom da su svi sojevi u laboratorijskim uslovima održavani u fotoautotrofnim uslovima kultivacije. Ovaj obrazac rasta u prisustvu organskih supstrata se može uočiti kod većine ispitanih sojeva. Povećana specifična stopa rasta u prisustvu glukoze registrovana je jedino kod soja *Anabaena* Č2 pri koncentraciji 1,5 g glukoze/L i iznosila je 0,096 dan⁻¹. Sa druge strane, kod 6 sojeva kod kojih je produkcija biomase povećana primenom glicerola, u prisustvu glicerola su zabeležene i maksimalne specifične stope rasta. Među ovim sojevima, najveća produkcija biomase je dobijena kod sojeva *Nostoc* LC1B i *Anabaena* Č2. U prisustvu glicerola, kod soja *Nostoc* LC1B najveća produkcija biomase je iznosila 2,75 mg/mL (Slika 32f) i specifična stopa rasta je povećana sa 0,099 dan⁻¹ na 0,122 dan⁻¹, dok je kod soja *Anabaena* Č2 produkcija biomase povećana 2,6 puta i iznosila je 2,34 mg/mL (Slika 32g), pri čemu je specifična stopa rasta povećana sa 0,061 dan⁻¹ na 0,116 dan⁻¹. Sa druge strane, u prisustvu glicerola utvrđen je smanjen rast kod oba soja roda *Spirulina*, dok je u prisustvu glukoze smanjen rast utvrđen kod 3 soja roda *Nostoc* (2S7B, 2S9B, LC1B) i oba soja *Spirulina*. Takođe, kod soja *Spirulina* S1 u prisustvu glicerola odgajivačka podloga je promenila izgled, postala je gusta i ružičasta, što bi moglo ukazivati na oslobađanje određenih agenasa i pigmenta iz ćelija.

U ćeliji cijanobakterija, elektroni nastali u metabolizmu organskih supstrata mogu ući u fotosistem I zbog veze između respiratornog i fotosintetičkog transportnog lanca elektrona, i ovako intenzivirana energija za fotosintezu može pospešiti anaboličke reakcije (Yu i sar., 2009). Štaviše, CO₂ nastao u respiratornom metabolizmu može biti ponovo korišćen za fotoautotrofni rast, pri čemu CO₂-bogata sredina reguliše aktivnost enzima RuBisCO (Bhatnagar i sar., 2011) koji vezuje CO₂ u Calvinovom ciklusu. Produkcija biomase kod cijanobakterija se može povećati upotrebom različitih izvora organskog ugljenika čije korišćenje je species-specifično (cit. u Markou i Georgakakis, 2011). Generalno, korišćenje organskih supstrata od strane ćelija mikroalgi zavisi od prisustva specifičnih enzima permeaza (Bhatnagar i sar., 2011). Feng i sar. (2010) su pokazali da ćelije cijanobakterijskog soja *Cyanothece* ATCC 51142 u prisustvu glicerola mogu promeniti metaboličku strategiju i preći sa autotrofnog ili miksotrofnog na fotoheterotrofni rast, pri čemu redukuju korišćenje CO₂. Ovi autori su pretpostavili da maksimalno korišćenje glicerola može redukovati utrošak energije za fiksaciju CO₂ i sintezu gradivnog bloka, i u prisustvu dodatog glicerola uočili su višu stopu rasta nego u prisustvu glukoze i piruvata. Slični rezultati su dobijeni i u ovom istraživanju, jer je većina sojeva takođe bolje rasla u podlozi sa glicerolom nego sa glukozom. Promena koja je uočena kod soja *Spirulina* S1 u prisustvu glicerola, kod kog je podloga postala gusta i ružičasta, bi mogla ukazati na oslobađanje određenih jedinjenja iz ćelija u prisustvu glicerola. Poznato je da mnoge cijanobakterije proizvode egzopolisaharide koji se smatraju agensima za zgušnjavanje i emulgujućim agensima (De Philippis i sar., 2001). Međutim, pregled dostupne literature pokazuje da kod cijanobakterija postoji samo nekoliko izveštaja o ekskreciji pigmenata, uključujući braon (De Chazal i Smith, 1994) i ljubičasti pigment (Hirata i sar., 1996) iz *Nostoc* sp. i ružičasti pigment iz sojeva *Oscillatoria* BTCC/A0004 i *Scytonema* TISTR 8208 (Karseno i sar., 2009). U slučaju *Oscillatoria* spp., ružičasti pigment je ispoljio snažnu sposobnost emulgovanja i ekskretovan je samo tokom kokultivacije sa *Anabaena* sp., što ukazuje na određene signalne puteve (Susilaningih, 2007). Ekskrecija koja je uočena kod soja *Spirulina* S1 u prisustvu glicerola takođe ukazuje na određene fiziološke promene u prisustvu organskog supstrata.

Kod svih testiranih azotofiksirajućih sojeva rodova *Nostoc* i *Anabaena* izuzev *Anabaena* Č2, dodatak NaNO₃ u odgajivačku podlogu nije doveo do povećanja produkcije biomase i registrovane su niže stope rasta, ukazujući na prednost azotofiksirajućih uslova za kultivaciju ispitivanih sojeva. Ovi rezultati su naročito značajni sa ekonomskog aspekta, s obzirom da se efikasniji rast postiže bez upotrebe kombinovanog izvora azota.

Predstavljeni rezultati pokazuju da bi odgovor cijanobakterija na kontinualno osvetljenje i prisustvo organskog izvora ugljenika, u pogledu produkcije biomase, mogao biti specifično svojstvo soja. Rezultati takođe pokazuju da je produkcija biomase bila jače stimulisana kontinualnim osvetljenjem kod sojeva koji pripadaju rodu *Spirulina*, a organskim izvorima ugljenika kod azotofiksirajućih sojeva rodova *Nostoc* i *Anabaena*. Relativnim

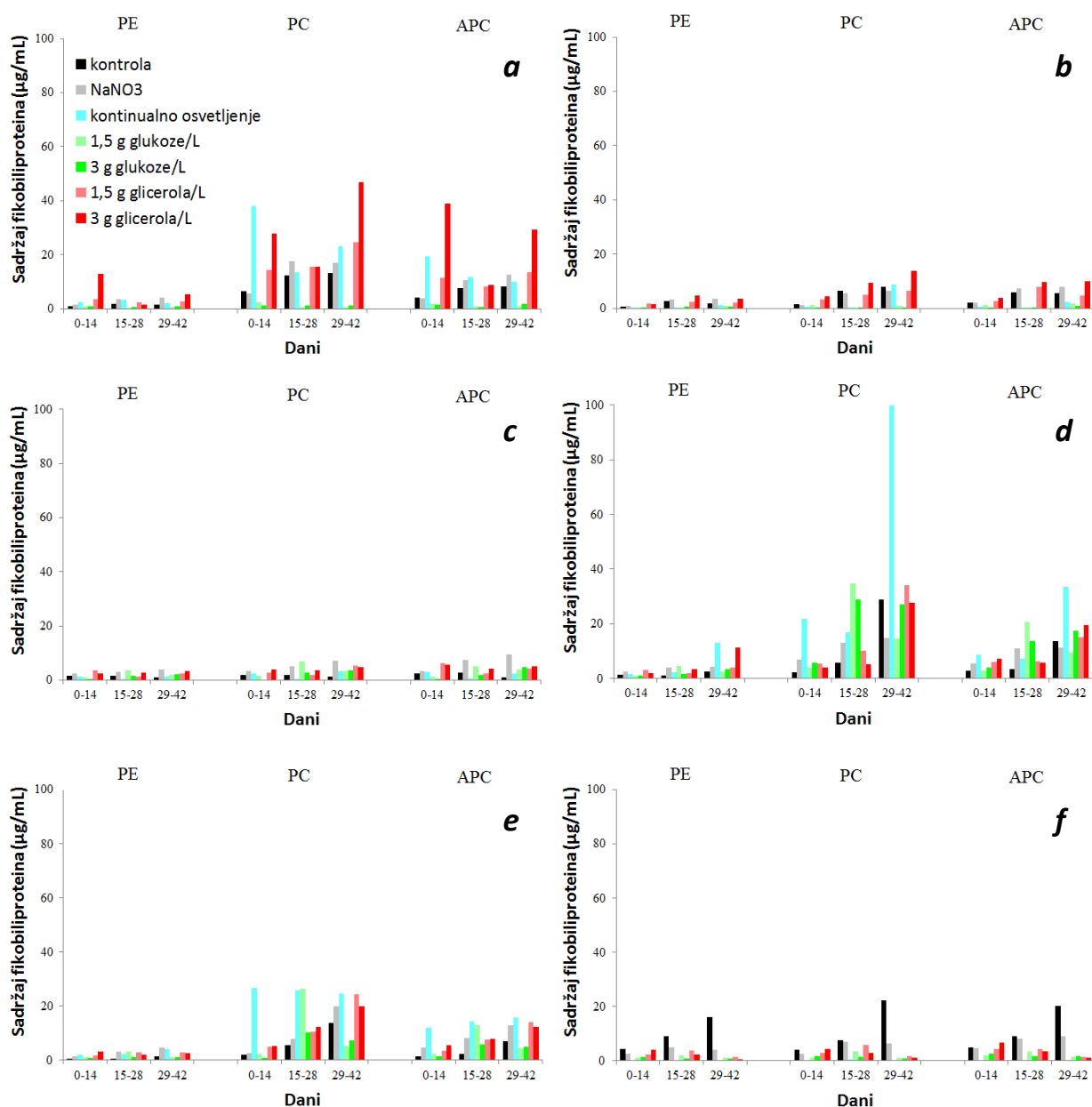
poređenjem rezultata dobijene produkcije biomase u funkciji vremena, kao sojevi sa najvećim potencijalom za proizvodnju biomase izdvajaju se *Spirulina S1* i *Spirulina S2*.

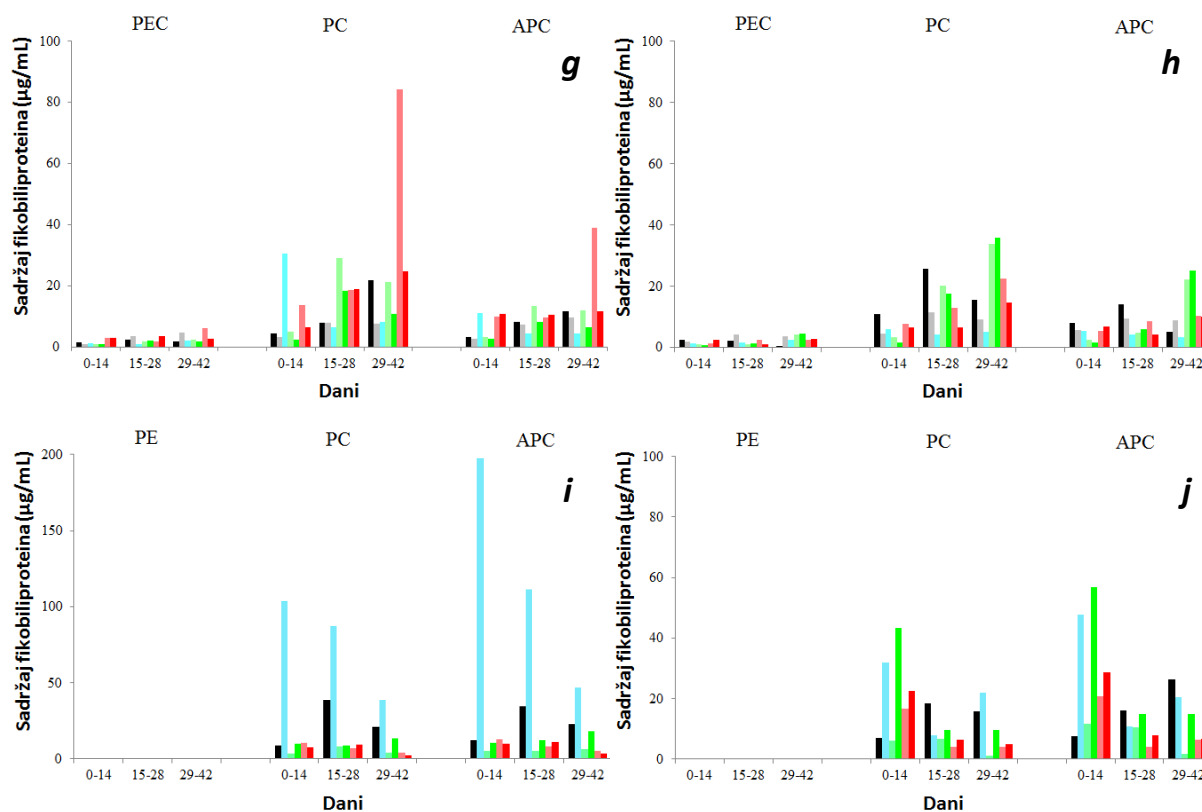
Tabela 9. Stope rasta testiranih cijanobakterijskih sojeva u različitim uslovima kultivacije (dan^{-1})

Cijanobakterijski soj	Uslovi kultivacije						
	Kontrola	NaNO ₃	Kontinualno osvetljenje	1,5 g glukoze/L	3 g glukoze/L	1,5 g glicerola/L	3 g glicerola/L
<i>Nostoc 2S7B</i>	0,063	0,046	0,090	0,004	0,012	0,115	0,110
<i>Nostoc 2S9B</i>	0,058	0,040	0,039	0,012	0,003	0,060	0,106
<i>Nostoc 2S3B</i>	0,166	0,055	0,019	0,152	0,082	0,138	0,090
<i>Nostoc 2S1</i>	0,074	0,036	0,076	0,064	0,055	0,114	0,116
<i>Nostoc S8</i>	0,081	0,054	0,100	0,068	0,058	0,098	0,103
<i>Nostoc LC1B</i>	0,099	0,018	0,000	0,004	0,017	0,122	0,074
<i>Anabaena Č2</i>	0,061	0,080	0,102	0,096	0,062	0,116	0,084
<i>Anabaena Č5</i>	0,107	0,057	0,062	0,082	0,071	0,090	0,046
<i>Spirulina S1</i>	0,102	-	0,260	0,060	0,070	0,100	0,090
<i>Spirulina S2</i>	0,149	-	0,227	0,075	0,090	0,095	0,100

5.2. PRODUKCIJA FIKOBILIPROTEINA ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBakterIJA

S obzirom na značaj koji imaju fikobiliproteinski pigmenti, kod testiranih cijanobakterijskih sojeva određen je sadržaj fikocijanina (PC), alofikocijanina (APC), fikoeritrina (PE) i fikoeritrocijanina (PEC). Produkcija ovih pigmenata zavisi pre svega od soja, ali i od uslova kultivacije. Zbog toga je ispitan uticaj nekoliko faktora na sadržaj fikobiliproteina sa ciljem utvrđivanja onih uslova koji mogu stimulirati veću produkciju ovih pigmenata. S obzirom da je sadržaj fikobiliproteina u radu praćen tokom rasta kulture, na Slici 33 prikazan je njihov maksimalan sadržaj registrovan u ispitivanim uslovima kultivacije u vremenskim periodima od 0-14., 15-28. i od 29-42. dana kultivacije.





Slika 33. Sadržaj fikobiliproteina kod testiranih sojeva cijanobakterija u različitim uslovima kultivacije. (a) – *Nostoc* 2S7B, (b) - *Nostoc* 2S9B, (c) – *Nostoc* 2S3B, (d) - *Nostoc* 2S1, (e) – *Nostoc* S8, (f) - *Nostoc* LC1B, (g) - *Anabaena* Č2, (h) - *Anabaena* Č5, (i) - *Spirulina* S1, (j) - *Spirulina* S2.

Najveći sadržaj fikobiliproteina je utvrđen kod sojeva kultivisanih u uslovima kontinualnog osvetljenja, *Spirulina* S1 sa 103,9 µg/mL PC i 197,45 µg/mL APC (Slika 33i), i *Nostoc* 2S1 sa 100,5 µg/mL PC i 33,5 µg/mL APC (Slika 33d). U poređenju sa kontrolom, kod soja *Spirulina* S1 u datim uslovima sadržaj PC je povećan 12 puta, a APC 16 puta, dok je kod soja *Nostoc* 2S1 sadržaj PC povećan 3,5 puta, a APC 2,5 puta. Sa druge strane, kod 5 sojeva (*Nostoc* 2S7B i 29B, oba soja *Anabaena*, *Spirulina* S2) najveći sadržaj fikobiliproteina postignut je korišćenjem mikсотrofniх uslova kultivacije. Sadržaj fikobiliproteina je u prisustvu glukoze povećan kod 6 sojeva (*Nostoc* 2S3B, 2S1 i S8, oba soja *Anabaena*, *Spirulina* S2), a u prisustvu glicerola kod 7 sojeva (*Nostoc* 2S7B, 2S9B, 2S3B, 2S1 i S8, *Anabaena* Č2, *Spirulina* S2). Naročito uticaj organskih supstrata na ove pigmente uočen je kod sojeva *Spirulina* S2 u prisustvu glukoze i *Anabaena* Č2 u prisustvu glicerola. U navedenim uslovima, u poređenju sa kontrolom kod soja *Spirulina* S2 sadržaj PC je povećan 23 puta (43,4 µg/mL), a APC 19 puta (56,8 µg/mL) (Slika 33j), dok je kod soja *Anabaena* Č2 sadržaj PC povećan 4 puta (84,3 µg/mL), a APC 2,5 puta (38,8 µg/mL) (Slika 33d). Kod soja *Spirulina* S2, uprkos intenzivnijem rastu u autotrofnim uslovima (kontrola i kontinualno osvetljenje), najveći sadržaj fikobiliproteina detektovan je u prisustvu glukoze i takođe je povećan sa dodavanjem glicerola, što ukazuje na stimulaciju produkcije fikobiliproteina

organskim izvorima ugljenika. Iako je kod soja *Nostoc* 2S3B najveći sadržaj pigmenata detektovan u podlozi sa dodatim azotom, kod testiranih sojeva se može konstatovati približan sadržaj pigmenata u azotofiksirajućim i neazotofiksirajućim uslovima kultivacije.

Uticaj intenziteta i kvaliteta svetlosti na produkciju fikobiliproteina je zabeležen u prethodnim istraživanjima (Chaneva i sar., 2007; Ravelonandro i sar., 2008; Kepekçi i Saygideger, 2012). U pogledu fotorežima, Prasanna i sar. (2004) su zabeležili da je sadržaj fikobiliproteina kod vrste *Calothrix elenkenii* povećan primenom kontinualnog osvetljenja, dok su Khajepour i sar. (2015) kod vrste *Nostoc calcicola* registrovali njihovo smanjenje sa povećanjem perioda osvetljenja. U poređenju sa *Calothrix elenkenii*, sadržaj PC i APC koji je u ovom radu dobijen kod soja *Spirulina* S1 pod kontinualnim osvetljenjem je veći za oko 10 puta. Takođe, najveći sadržaj fikobiliproteina koji je kod nekih sojeva registrovan 14. dana kultivacije u uslovima kontinualnog osvetljenja bi mogao ukazivati na strategiju ćelija da u uslovima kontinuirane fotosinteze akumuliraju pomoćne pigmente u ranoj fazi rasta kulture, kada je potrebno mnogo energije za intenzivne procese sinteze.

Sadržaj fikobiliproteina kod cijanobakterija zavisi naročito od izvora azota (Simeunović i sar., 2013) i ugljenika (cit. u Simeunović i sar., 2012) i može se povećati dodavanjem različitih organskih supstrata, kao što je bio slučaj kod sojeva u ovom istraživanju. Kod većine sojeva je takođe uočen niži sadržaj PE/PEC u odnosu na sadržaj PC i APC i u uslovima kontinualnog osvetljenja i u prisustvu organskih supstrata. Poznato je da je PE najfleksibilniji fikobiliprotein koji olakšava adaptaciju na promene u životnoj sredini (Ajayan i sar., 2012), i da regulacijom sadržaja tetrapirola cijanobakterije odgovaraju na različite signale životne sredine (Prasanna i sar., 2004). S obzirom na veći broj tetrapirolskih hromofora u monomeru PE u odnosu na monomere ostalih fikobiliproteina (Glazer, 1988), prema Simeunović i sar. (2013), kod cijanobakterija bi u azotofiksirajućim uslovima mogla biti favorizovana sinteza PC ili APC koji zahtevaju manje azota, dok bi se sa druge strane njihovim većim sadržajem mogao postići efikasniji prenos energije na fotosistem II. Ovo bi moglo biti objašnjenje za povećan sadržaj PC i APC u uslovima sa povećanim prenosom energije - kontinuirana fotosinteza i miksotrofna ishrana (Kovač i sar., 2017).

Predstavljeni rezultati pokazuju da su ispitani sojevi cijanobakterija značajan izvor prirodnih fikobiliproteinskih pigmenata, koji predstavljaju alternativu sintetičkim bojama. Poređenjem rezultata sadržaja fikobiliproteina u različitim uslovima kultivacije, kao sojevi sa najvećim potencijalom za produkciju ovih pigmenata izdvajaju se *Spirulina* S1, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* Č2 i *Spirulina* S2. Dobijeni rezultati takođe pokazuju da bi odgovor cijanobakterija na kontinualno osvetljenje i prisustvo izvora organskog ugljenika u pogledu produkcije fikobiliproteina mogao biti svojstvo specifično za svaki soj, ali i da su kod većine sojeva u testiranim uslovima prvenstveno produkovani PC i APC. Dobijeni rezultati takođe pokazuju da je moguće da u uslovima kontinuirane fotosinteze neke cijanobakterije akumuliraju fikobiliproteine u ranoj fazi rasta kulture kako bi se obezbedila dovoljna količina energije za intenzivne procese sinteze. Posebno je važno naglasiti da dobijeni rezultati jasno ukazuju na

moćnost manipulacije metaboličkim procesima na nivou ćelija cijanobakterija primenom određenih uslova kultivacije, u cilju postizanja veće produkcije određenih biotehnoški značajnih jedinjenja.

5.3.SADRŽAJ MASNIH KISELINA ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBAKTERIJA

Rezultati kvalitativnog i kvantitativnog sastava masnih kiselina kod testiranih cijanobakterijskih sojeva ukazuju da se sadržaj masnih kiselina razlikovao kod sojeva koji pripadaju različitim rodovima, kao i da je zavisio od uslova rasta. U ispitivanim sojevima identifikovano je ukupno 16 masnih kiselina. U Tabelama 10 i 11 prikazani su rezultati masnokiselinskog profila nakon kultivacije u azotofiksirajućim i neazotofiksirajućim uslovima. Rezultati su izraženi kao % masne kiseline u ukupnom sadržaju masnih kiselina.

Sadržaj zasićenih masnih kiselina kod testiranih cijanobakterijskih sojeva kretao se u opsegu od 4,84% kod soja *Anabaena* Č2 do 41,66% kod soja *Spirulina* S1, sa dominacijom palmitinske kiseline (C16:0), dok je kod svih sojeva izuzev soja *Nostoc* S8 detektovana i stearinska kiselina (C18:0). Mononezasićene masne kiseline su bile distribuirane u manjim količinama u odnosu na zasićene - od 5,53% kod soja *Spirulina* S1 do 41,65% kod soja *Anabaena* Č2, među kojima su najzastupljenije bile palmitoleinska (C16:1) i oleinska (C18:1 n9) kiselina. Sadržaj polinezasićenih masnih kiselina je bio veći u odnosu na zasićene i mononezasićene masne kiseline kod svih sojeva izuzev soja *Nostoc* LC1B, i kretao se u opsegu od 25,58% kod soja *Nostoc* 2S9B do 57,55% kod soja *Nostoc* 2S3B. Među polinezasićenim masnim kiselinama dominantne su bile linolna (C18:2 n6), α -linoleinska (C18:3 n3) i γ -linolenska (C18:3 n6) kiselina. Ostale masne kiseline su uglavnom bile prisutne u malim količinama, ili nisu identifikovane u analiziranim uzorcima.

Palmitinska kiselina, koja je bila najdominantnija zasićena masna kiselina u svim uzorcima bila je zastupljena u opsegu od 17,11% kod soja *Nostoc* 2S1 do 40,85% kod soja *Spirulina* S1, i bila je najzastupljenija masna kiselina sojeva roda *Spirulina* (40,85% i 37,68%) i nekoliko azotofiksirajućih sojeva. Ambrozova i sar. (2014) su takođe u testiranim uzorcima roda *Spirulina* palmitinsku kiselinu detektovali kao dominantnu masnu kiselinu (od 44,85 do 61,06%), dok su Thingujam i sar. (2015) kod soja *Spirulina platensis* BTA174 ovu kiselinu detektovali u nižem sadržaju od 6,89%. Palmitinska kiselina je bila dominantna i kod sojeva jednoćelijskih vrsta cijanobakterija u istraživanju Opris i sar. (2013), sa sadržajem koji je prelazio 90%, a detektovana je i kod svih neheterocistnih filamentoznih sojeva u istraživanju Thingujam-a i sar. (2015), u kojim se kretala u opsegu od 0,42 do 27,9%.

Kao dominantna mononezasićena masna kiselina u svim uzorcima detektovana je palmitoleinska kiselina, sa sadržajem od 4,92% kod soja *Spirulina* S1 do 35,30% kod soja *Anabaena* Č2, dok je sadržaj oleinske kiseline bio niži - od 0,57% kod soja *Spirulina* S2 do 9,43% kod soja *Nostoc* 2S3B. Za razliku od dobijenih rezultata, u istraživanju Thingujam-a i sar. (2015) među testiranim neheterocistnim filamentoznim sojevima palmitoleinska kiselina

Tabela 10. Sastav masnih kiselina cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u azotofiksirajućim uslovima, izraženim kao % od ukupnih masnih kiselina

Cijanobakterijski soj	Masna kiselina																UFA	MUFA	PUFA	SFA	PUFA/SFA
	C14:0	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1 n9t	C18:1 n9c	C18:2 n6	C18:3 n6	C18:3 n3	C20:2	C23:0	C22:2	C24:0	C20:5 n3	C24:1					
<i>Nostoc</i> 2S7B	n.d.	23,96	21,43	n.d.	0,78	n.d.	2,94	16,14	n.d.	23,88	n.d.	10,87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64,39	24,37	40,02	35,61	1,12
<i>Nostoc</i> 2S9B	n.d.	23,51	26,13	n.d.	1,15	n.d.	3,62	16,30	n.d.	27,73	n.d.	n.d.	n.d.	1,56	n.d.	n.d.	73,78	29,74	44,04	26,22	1,68
<i>Nostoc</i> 2S3B	n.d.	22,25	13,71	n.d.	1,78	n.d.	4,72	11,03	13,16	15,82	n.d.	n.d.	17,53	n.d.	n.d.	n.d.	75,97	18,43	57,55	24,03	2,40
<i>Nostoc</i> 2S1	n.d.	27,06	24,75	n.d.	1,16	n.d.	3,62	17,05	n.d.	26,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	71,77	28,37	43,40	28,23	1,54
<i>Nostoc</i> S8	n.d.	21,99	26,94	n.d.	n.d.	n.d.	2,85	15,86	n.d.	31,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,28	n.d.	78,01	29,79	48,22	21,99	2,19
<i>Nostoc</i> LC1B	0,49	31,99	15,09	0,52	1,17	n.d.	3,36	13,31	n.d.	26,65	n.d.	6,85	n.d.	0,57	n.d.	n.d.	58,93	18,97	39,96	41,07	0,97
<i>Anabaena</i> Č2	n.d.	n.d.	35,30	n.d.	1,41	n.d.	6,35	18,97	n.d.	34,54	n.d.	n.d.	n.d.	3,43	n.d.	n.d.	95,16	41,65	53,51	4,84	11,05
<i>Anabaena</i> Č5	0,56	26,47	22,137	n.d.	1,08	n.d.	4,16	15,94	n.d.	26,61	n.d.	0,46	0,50	2,08	n.d.	n.d.	69,35	26,301	43,049	30,65	1,40

n.d.-nije detektovano, UFA-nezasićene masne kiseline, MUFA-mononezasićene masne kiseline, PUFA-polinezasićene masne kiseline, SFA-zasićene masne kiseline

Tabela 11. Sastav masnih kiselina cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u neazotofiksirajućim uslovima, izraženim kao % od ukupnih masnih kiselina

Cijanobakterijski soj	Masna kiselina																UFA	MUFA	PUFA	SFA	PUFA/SFA
	C14:0	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1 n9t	C18:1 n9c	C18:2 n6	C18:3 n6	C18:3 n3	C20:2	C23:0	C22:2	C24:0	C20:5 n3	C24:1					
<i>Nostoc</i> 2S7B	n.d.	21,20	24,56	n.d.	n.d.	n.d.	2,30	18,29	n.d.	27,48	n.d.	n.d.	n.d.	6,17	n.d.	n.d.	72,63	26,87	45,77	27,37	1,67
<i>Nostoc</i> 2S9B	n.d.	27,73	32,33	n.d.	n.d.	n.d.	8,38	16,46	n.d.	9,12	n.d.	n.d.	n.d.	5,99	n.d.	n.d.	66,28	40,70	25,58	33,72	0,76
<i>Nostoc</i> 2S3B	n.d.	25,49	25,28	0,71	n.d.	n.d.	9,43	9,65	6,37	12,54	n.d.	n.d.	10,53	n.d.	n.d.	n.d.	74,51	35,42	39,09	25,49	1,53
<i>Nostoc</i> 2S1	n.d.	17,11	26,72	n.d.	0,65	n.d.	2,58	20,63	n.d.	21,49	n.d.	n.d.	n.d.	2,66	8,15	n.d.	79,57	29,30	50,27	20,43	2,46
<i>Nostoc</i> S8	n.d.	22,77	27,52	n.d.	n.d.	n.d.	3,72	22,60	n.d.	21,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,73	n.d.	77,23	31,24	45,99	22,77	2,02
<i>Nostoc</i> LC1B	n.d.	35,69	18,69	n.d.	2,82	n.d.	7,29	15,74	n.d.	19,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	61,49	25,98	35,51	38,51	0,92
<i>Anabaena</i> Č2	n.d.	21,332	30,033	n.d.	n.d.	n.d.	5,41	20,23	n.d.	23,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	78,67	35,44	43,22	21,33	2,03
<i>Anabaena</i> Č5	n.d.	25,10	18,148	n.d.	4,86	8,09	3,89	13,25	n.d.	22,31	n.d.	n.d.	n.d.	4,34	n.d.	n.d.	65,69	30,13	35,56	34,31	1,04
<i>Spirulina</i> S1	n.d.	40,85	4,9153	n.d.	0,81	n.d.	0,61	19,03	33,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58,342	5,5275	52,814	41,658	1,27
<i>Spirulina</i> S2	n.d.	37,676	6,9864	n.d.	0,71	n.d.	0,57	21,64	31,10	n.d.	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,69	61,615	8,2404	53,374	38,385	1,39

n.d.-nije detektovano, UFA-nezasićene masne kiseline, MUFA-mononezasićene masne kiseline, PUFA-polinezasićene masne kiseline, SFA-zasićene masne kiseline

se kretala u nižem rangu, od 0,18 do 8,90%, i nije detektovana u svim uzorcima, kao ni u istraživanju Opris-a i sar. (2013) kod kojih je detektovana samo kod soja *Synechococcus* PC 7002. Ambrozova i sar. (2014) su kod vrste *S. platensis* palmitoleinsku kiselinu registrovali kao dominirajuću mononezasićenu masnu kiselinu, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za testirane sojeve roda *Spirulina* u ovoj tezi, dok Thingujam i sar. (2015) kod soja *S. platensis* BTA174 ovu kiselinu nisu detektovali. Oleinska kiselina je u ovom radu detektovana kod svih testiranih sojeva, dok u radu Thingujam i sar. (2015) data kiselina nije registrovana kod svih neheterocistnih filamentoznih sojeva, ali je konstatovana u većem sadržaju kod soja *Lyngbya martensiana* BTA640 koji je iznosio 56,2%, a kod soja *S. platensis* BTA174 4,45%, što je značajno više u odnosu na sojeve roda *Spirulina* testirane u ovoj tezi (0,57% i 0,61%).

Među polinezasićenim masnim kiselinama linolna kiselina je detektovana kod svih testiranih sojeva, u opsegu od 9,65% kod soja *Nostoc* 2S3B do 22,60% kod soja *Nostoc* S8. Kod svih azotofiksirajućih sojeva detektovana je α -linoleinska kiselina, u opsegu od 9,12% kod soja *Nostoc* 2S9B do 34,54% kod soja *Anabaena* Č2, dok je γ -linolenska kiselina pronađena samo kod sojeva roda *Spirulina* sa sadržajem od 31,10% i 33,78%, i u nižem sadržaju kod soja *Nostoc* 2S3B (6,37%/13,16%). Za razliku od rezultata dobijenih u ovoj tezi, Thingujam i sar. (2015) su linolnu kiselinu detektovali u manjem broju testiranih neheterocistnih filamentoznih sojeva, kod kojih je bila prisutna u manjem sadržaju, od 1,20 do 11,8%. Kod sojeva roda *Spirulina* testiranih u ovoj tezi može se uočiti sličnost u masnokiselinskom profilu, pre svega u pogledu dominacije palmitinske, γ -linolenske i linolne kiseline, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Ambrozove i sar. (2014). Za razliku od dobijenih rezultata, Thingujam i sar., (2015) kod soja *S. platensis* BTA174 nisu detektovali linolnu kiselinu, dok su γ -linolensku kiselinu registrovali u nižem sadržaju od 7,89%. Cijanobakterije roda *Spirulina* su poznate kao komercijalan izvor γ -linolenske kiseline, koja je zbog korisnih zdravstvenih efekata na tržištu dostupna kao dodatak ishrani. Ambrozova i sar. (2014) su u uzorcima roda *Spirulina* pronašli γ -linolensku kiselinu sa sadržajem od 15,22% i 23,98%, što je bilo više u odnosu na sadržaj kod ispitanih vrsta zelenih, crvenih i mrkih algi. Thingujam i sar. (2015) su γ -linolensku kiselinu detektovali kod manjeg broja testiranih neheterocistnih filamentoznih sojeva sa sadržajem do svega 8,82%, dok kod testiranih sojeva jednoćelijskih vrsta Guedes sar. (2011) nisu otkrili njenu sintezu. Kod azotofiksirajućih sojeva testiranih u ovoj tezi, među dominirajućim masnim kiselinama bila je i α -linoleinska kiselina, sa najvećim sadržajem kod sojeva *Anabaena* Č2 (34,54%) i *Nostoc* S8 (31,09%). Iako su Guedes i sar. (2011) među testiranim mikroalgama najveću produkciju α -linoleinske kiseline registrovali u okviru klasa *Eustigmatophyceae* i *Chlorophyceae*, najveću produktivnost α -linoleinske kiseline su zabeležili kod heterocistne vrste cijanobakterija *Nodularia harveyana*, kod koje je u skladu sa rezultatima za heterocistne cijanobakterije analizirane u ovoj tezi, dominirala α -linoleinska kiselina. U poređenju sa rezultatima koji su dobijeni u istraživanju Milovanović (2016) u kojem je detektovano 10

masnih kiselina u ispitivanim uzorcima, u ovom istraživanju testiranjem je obuhvaćen veći broj sojeva i registrovano je 16 masnih kiselina.

Prema Behrens-u i Kyle-u (1996), glavne masne kiseline cijanobakterija su palmitinska i palmitoleinska, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za većinu sojeva u ovom istraživanju. Masne kiseline sa 16 i 18 ugljenikovih atoma su dominirale kod svih testiranih sojeva, kao i u istraživanjima drugih grupa autora (Patil i sar., 2007; Guedes i sar., 2011; Thingujam i sar., 2015). Detektovane dominantne masne kiseline - palmitinska, palmitoleinska, oleinska, linolna, α -linoleinska i γ -linolenska predstavljaju visoko vredna jedinjenja za farmaceutsku industriju (Thingujam i sar., 2015). Oleinska kiselina je prekursor u biosintezi masnih kiselina sa n9 terminalnom strukturom i sa dužinom lanaca od 20 do 24 ili više ugljenikovih atoma, dok su linolna i α -linoleinska kiselina esencijalne dijetetske komponente koje u životinjskim i biljnim tkivima služe za sintezu ostalih n6 i n3 masnih kiselina (www.lipidhome.co.uk/lipids). Otkriveno je da palmitoleinska kiselina ima karakterističnu funkciju u tkivu miševa kao lipidni hormon lipokin (www.lipidhome.co.uk/lipids). Detektovane masne kiseline su potencijalni funkcionalni sastojci, među kojima oleinska kiselina ima antioksidativnu aktivnost, palmitoleinska kiselina smanjuje rizik od određenih srčanih bolesti, dok linolna, palmitinska i oleinska kiselina ispoljavaju antibakterijsku aktivnost (Plaza i sar., 2009), kao i γ -linolenska kiselina koja se primenjuje kao pomoćno sredstvo antimikrobne hemoterapije u eksperimentalnim modelima infekcije. Ova masna kiselina ima značajnu ulogu i u prevenciji dijabetesa, reproduktivnih poremećaja i nekih kožnih bolesti (cit. u Guedes sar., 2011). Prijavljena je kao obećavajuće terapeutsko sredstvo za brojne zdravstvene poremećaje jer je prekursor prostaglandina E1, neophodnog za smanjenje inflamacije i u lečenju srčanih oboljenja (Thingujam i sar., 2015), dok dodavanje α -linoleinske kiseline u ishranu pozitivno utiče na atopijski dermatitis (Gubić, 2016).

Među masnim kiselinama, od naročitog komercijalnog interesa su i dokozaheksaenska (C22:6 n3) i eikozapentaenska kiselina (C20:5 n3). Iako je vrsta *S. platensis* takođe prirodan izvor dokozaheksaenske kiseline koja može iznositi do 9,1% (Yukino i sar., 2005), ova masna kiselina nije detektovana u ovom radu kod testiranih sojeva roda *Spirulina*, kao ni kod azotofiksirajućih sojeva. U istraživanju Guedes i sar. (2011) takođe nijedan soj cijanobakterija nije okarakterisan značajnom produkcijom dokozaheksaenske kiseline, dok je eikozapentaenska kiselina detektovana samo kod soja roda *Gloeotheca*. U rezultatima dobijenim u ovoj tezi eikozapentaenska kiselina je pronađena kod sojeva *Nostoc* 2S1 (8,15%) i *Nostoc* S8 (1,28%/1,73%).

Sadržaj polinezasićenih masnih kiselina je kod nekih sojeva bio veći u azotofiksirajućim uslovima kultivacije, a kod drugih u neazotofiksirajućim uslovima, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Guedes i sar. (2011). Međutim, može se uočiti da je kod svih ispitivanih sojeva izuzev *Nostoc* 2S7B, sadržaj α -linoleinske kiseline bio veći u

azotofiksirajućim uslovima kultivacije. Odnos polinezasićenih/zasićenih masnih kiselina se može koristiti za brzu procenu masnokiselinskih profila analiziranih uzoraka, pri čemu veća vrednost ovog odnosa podrazumeva više zdravstvenih koristi (Ambrozova i sar., 2014). U tom pogledu, kao sojevi sa najvećim odnosom bi se mogli izdvojiti *Nostoc* 2S1 (2,46), *Nostoc* 2S3B (2,39), *Nostoc* S8 (2,02/2,19) i *Anabaena* Č2 (2,03). Sojevi roda *Spirulina* su imali manji odnos (1,27/1,39), ali su registrovane vrednosti ipak bile veće u poređenju sa vrednostima dobijenim za uzorke vrste *S. platensis* (od 0,46 - 0,74) u istraživanju Ambrozove i sar. (2014).

Dobijeni rezultati masnokiselinskog profila pokazuju da svi ispitani sojevi produkuju masne kiseline za koje su drugi autori dokazali zdravstveno korisne efekte, među kojima su od naročitog značaja γ -linolenska, detektovana kod sojeva roda *Spirulina* i α -linoleinska, detektovana kod azotofiksirajućih sojeva rodova *Nostoc* i *Anabaena*. Dobijeni rezultati takođe pokazuju da je kod skoro svih sojeva sadržaj polinezasićenih masnih kiselina bio veći u odnosu na sadržaj zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, pri čemu najveći sadržaj polinezasićenih masnih kiselina karakteriše soj *Nostoc* 2S3B. Dobijeni rezultati takođe pokazuju značaj azotofiksirajućih uslova kultivacije u produkciji α -linoleinske kiseline.

5.4. HPLC-MS/MS ANALIZA ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBakterIJA

U cilju utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja 44 odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima testiranih cijanobakterijskih sojeva, primenjena je optimizovana metoda za analizu 14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana. Rezultati skrininga fenolnih jedinjenja u ispitivanim sojevima kultivisanih u azotofiksirajućim i neazotofiksirajućim uslovima prikazani su u Tabelama 12 i 13.

Kod testiranih cijanobakterijskih ekstrakata detektovano je ukupno osam fenolnih jedinjenja, sa ukupnim sadržajem u opsegu od 14,86 µg/g suve mase kod soja *Anabaena* Č2 do 701,69 µg/g suve mase kod soja *Nostoc* 2S7B. Utvrđeno je prisustvo tri fenolne kiseline - hinske, hlorogene i galne, i pet flavonoida - katehina, epikatehina (flavanoli), rutina, kemferola (flavonoli) i apiina (flavon glikozid).

Tabela 12. Sadržaj odabranih fenolnih komponenti u ekstraktima cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u azotofiksirajućim uslovima, izraženim u µg/g suve mase

Cijanobakterijski soj	Galna kiselina	Hinska kiselina	Hlorogena kiselina	Katehin	Epikatehin	Kemferol	Rutin	Apiin	Ukupan sadržaj
<i>Nostoc</i> 2S7B	77,59	594,43	n.d.	29,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	701,69
<i>Nostoc</i> 2S9B	n.d.	114,15	n.d.	25,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	139,70
<i>Nostoc</i> 2S3B	n.d.	16,74	n.d.	31,15	n.d.	2,94	n.d.	n.d.	50,83
<i>Nostoc</i> 2S1	n.d.	55,25	n.d.	22,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	77,78
<i>Anabaena</i> Č2	n.d.	n.d.	n.d.	14,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14,86
<i>Anabaena</i> Č5	n.d.	n.d.	n.d.	19,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19,48

n.d.-nije detektovano

Tabela 13. Sadržaj odabranih fenolnih komponenti u ekstraktima cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u neazotofiksirajućim uslovima, izraženim u µg/g suve mase

Cijanobakterijski soj	Galna kiselina	Hinska kiselina	Hlorogena kiselina	Katehin	Epikatehin	Kemferol	Rutin	Apiin	Ukupan sadržaj
<i>Nostoc</i> 2S7B	n.d.	70,83	n.d.	22,15	n.d.	1,83	n.d.	n.d.	94,81
<i>Nostoc</i> 2S9B	81,84	347,47	9,55	28,55	n.d.	1,92	2,38	3,44	475,15
<i>Nostoc</i> 2S3B	n.d.	39,75	n.d.	17,95	n.d.	2,56	n.d.	n.d.	60,26
<i>Nostoc</i> 2S1	n.d.	39,75	n.d.	19,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58,85
<i>Nostoc</i> S8	n.d.	59,49	n.d.	30,04	29,82	n.d.	n.d.	n.d.	119,35
<i>Nostoc</i> LC1B	n.d.	37,55	n.d.	26,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	63,86
<i>Anabaena</i> Č2	n.d.	n.d.	n.d.	18,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,72
<i>Anabaena</i> Č5	n.d.	108,48	n.d.	35,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	143,67
<i>Spirulina</i> S1	n.d.	n.d.	n.d.	24,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24,05
<i>Spirulina</i> S2	n.d.	n.d.	n.d.	24,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24,05

n.d.-nije detektovano

Kod većine sojeva, najzastupljenije fenolno jedinjenje bila je hinska kiselina, sa najvećim sadržajem od 594,43 $\mu\text{g/g}$ suve mase kod soja *Nostoc* 2S7B, dok je visok sadržaj pronađen i kod sojeva *Nostoc* 2S9B (347,47 $\mu\text{g/g}$ suve mase) i *Anabaena* Č5 (108,47 $\mu\text{g/g}$ suve mase). Slično dobijenim rezultatima, Babić i sar. (2015) su detektovali hinsku kiselinu kod tri od pet testiranih cijanobakterijskih sojeva, *Phormidium* M1 (502 $\mu\text{g/g}$ suve mase), *Nostoc* M1 (33 $\mu\text{g/g}$ suve mase) i *Oscillatoria* M2 (12,6 $\mu\text{g/g}$ suve mase), dok je Babaoğlu Aydaş i sar. (2013) nisu registrovali kod sojeva roda *Synechocystis*. Hinska kiselina je u prirodi uglavnom zastupljena u obliku estara, uključujući hlorogenu kiselinu (Pero i Lund, 2009). Kod sojeva ispitanih u ovom radu, hlorogena kiselina je detektovana samo kod soja *Nostoc* 2S9B (9,54 $\mu\text{g/g}$ suve mase), dok u nekim ranijim istraživanjima nije registrovana kod cijanobakterija (Babaoğlu Aydaş i sar., 2013; Babić i sar., 2015; Ijaz i Hasnain, 2016), a kod vrste *Anabaena doliolum* je detektovana u nanogramskim količinama (Onofrejová i sar., 2010). Sa druge strane, sadržaj galne kiseline koja je pronađena kod dva soja roda *Nostoc* (2S7B i 2S9B) od 77,59 i 81,84 $\mu\text{g/g}$ suve mase je sličan sadržaju koji je detektovan kod soja *Phormidium* M1 (84,9 $\mu\text{g/g}$ suve mase) (Babić i sar., 2015). U istraživanju koje su sproveli Ijaz i Hasnain (2016) kod soja *Leptolyngbya* sp. SI-SM galna kiselina je detektovana u većem sadržaju, od 205,4 $\mu\text{g/g}$ suve mase, dok se u ostalim uzorcima kretala u opsegu od 2,53 do 61,4 $\mu\text{g/g}$ suve mase, a Babaoğlu Aydaş i sar. (2013) su je kod dva soja roda *Synechocystis* detektovali u sadržaju manjem od 10 $\mu\text{g/g}$ suve mase. Registrovane količine galne kiseline kod cijanobakterija testiranih u ovom radu i navedenim istraživanjima su mnogo više u odnosu na one zabeležene u nekim istraživanjima kod eukariotskih mikroalgi (Machu i sar., 2015; Safafar i sar., 2015), kod kojih je registrovano ≤ 5 $\mu\text{g/g}$ suve mase. Iako su hlorogena i galna kiselina bile među najzastupljenijim fenolnim komponentama kod vrsta *Spirulina maxima* (Abd El-Bakky i sar., 2009) i *S. platensis* (Shalaby i Shanab, 2013), ove kiseline nisu pronađene kod sojeva roda *Spirulina* testiranih u ovoj tezi.

Najzastupljeniji flavonoid kod svih sojeva testiranih u ovoj tezi bio je katehin, sa sadržajem u opsegu od 14,86 do 35,19 $\mu\text{g/g}$ suve mase. Sa druge strane, Machu i sar. (2015) su među 9 algalnih prehrambenih proizvoda samo kod dva detektovali katehin, dok je najzastupljenije fenolno jedinjenje bio epikatehin, koji je u ovoj tezi detektovan samo kod soja *Nostoc* S8. Dobijeni rezultati bi mogli da ukažu na favorizovanu sintezu katehina u odnosu na epikatehin kod cijanobakterija, što zahteva dodatna i detaljnija biohemijska ispitivanja. Tako su Shalaby i Shanab (2013) registrovali samo katehin kod vrste *S. platensis* (32,32 $\mu\text{g/g}$ suve mase), dok Babić i sar. (2015) kod ispitivanih cijanobakterija nisu detektovali ova dva jedinjenja. Sadržaj kemferola koji je detektovan kod tri soja roda *Nostoc* (2S7B, 2S9B, 2S3B), od 1,83 do 2,94 $\mu\text{g/g}$ suve mase, je sličan sadržaju koji su Babić i sar. (2015) detektovali kod sojeva *Nostoc* M1 i *Anabaena* M2 (1,08 i 1,23 $\mu\text{g/g}$ suve mase), a Abd El-Bakky i sar. (2009) kod uzorka vrste *Spirulina maxima* (od 1,33 do 7,38 $\mu\text{g/g}$ suve mase). Iako je rutin detektovan jedino kod soja *Nostoc* 2S9B (2,38 $\mu\text{g/g}$ suve mase) u sličnom sadržaju koji su Babić i sar. (2015) registrovali kod sojeva *Nostoc* M1 i *Phormidium* M1 (4,52

i 2,21 $\mu\text{g/g}$ suve mase), u istraživanju Ijaz-a i Hasnain-a (2016) rutin je bio među najzastupljenijim fenolnim komponentama cijanobakterija sa sadržajem do 176,2 $\mu\text{g/g}$ suve mase. Apiin, koji je pronađen jedino kod soja *Nostoc* 2S9B, nije detektovan kod cijanobakterija u istraživanjima prethodno navedenih autora.

Najzastupljenija fenolna komponenta kod većine sojeva bila je hinska kiselina, koja predstavlja glavni intermedijer u biosintetičkom putu većine aromatičnih jedinjenja. Pored hinske, utvrđeno je prisustvo i galne kiseline kod dva soja i hlorogene kiseline kod samo jednog soja. Dobijeni rezultati sadržaja fenolnih jedinjenja se razlikuju od onih koje su drugi autori zabeležili kod cijanobakterija. Tako su Babaoğlu Aydaş i sar. (2013) kod sojeva roda *Synechocystis* kao glavna jedinjenja registrovali galnu, trans-cimetnu, *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu, dok su za vrstu *Spirulina maxima* Miranda i sar. (1998) kao glavna fenolna jedinjenja konstatovali salicilnu, trans-cimetnu, sinapinsku, hlorogenu, hinsku i kafenu kiselinu. Do sličnih rezultata su došli Abd El-Bakky i sar. (2009) koji su kod ove vrste detektovali galnu, hlorogenu, cimetnu, *p*-OH-benzoevu, hinsku, kafenu, vanilinsku i ferulnu kiselinu. Sa druge strane, najzastupljenije komponente među odabranim fenolima cijanobakterija u istraživanju Ijaz-a i Hasnain-a (2016) bile su rutin, orcinol, floroglucinol, taninska i protokatehinska kiselina. Za razliku od rezultata navedenih grupa autora, u ovoj tezi pored hinske kiseline koja je detektovana u najvećem sadržaju, katehin je bio jedino jedinjenje prisutno u svim testiranim sojevima, i takođe najzastupljeniji flavonoid. Ovakvi rezultati bi mogli da ukažu na različite puteve biosinteze fenola kod cijanobakterija. S obzirom na distribuciju, kao i količine hinske kiseline i katehina i u azotofiksirajućim i u neazotofiksirajućim uslovima, testirani cijanobakterijski sojevi se mogu smatrati značajnim producentima naročito ova dva fenolna jedinjenja.

Produkcija fenolnih jedinjenja kod testiranih sojeva zavisila je od azotnih uslova kultivacije. Najveći efekat uočen je u slučaju hinske kiseline kod soja *Nostoc* 2S7B sa 8,4 puta većim sadržajem u azotofiksirajućim uslovima i soja *Nostoc* 2S9B sa 3 puta većim sadržajem u neazotofiksirajućim uslovima, dok je sličan trend uočen i kod galne kiseline. Takođe je uočeno da su hlorogena kiselina, rutin i apiin, detektovani kod soja *Nostoc* 2S9B, kao i epikatehin detektovan kod soja *Nostoc* S8, produkovani samo u neazotofiksirajućim uslovima.

Fenolna jedinjenja detektovana kod testiranih sojeva cijanobakterija su snažni antioksidansi i ispoljavaju različite zdravstveno korisne efekte, uključujući antikancerogeno delovanje. S obzirom da je antioksidativna aktivnost polifenola vezana za stepen i obrazac hidroksilacije, Onofrejevová i sar. (2010) su dobili relativno visoke odgovore za hlorogenu (pet -OH grupa) kiselinu, dok galna kiselina (tri -OH grupe) hvata DPPH slobodne radikale bolje u odnosu na sintetički antioksidans BHA (Sanchez-Moreno i sar., 1999), a rutin bolje u odnosu na sintetički antioksidans BHT (cit. u Sakač i sar., 2014). Apiin takođe poseduje sposobnost hvatanja slobodnih radikala, kao i odličnu *in vivo* antioksidativnu aktivnost kod miševa, štiteći nekoliko značajnih organa od oksidativnog stresa (Li i sar., 2014). U biljkama i voću, katehini

su glavni „skevendžeri“ slobodnih radikala, helatori metala i inhibitori oštećenja DNK od strane ROS-a kod inflamacije kože i imunološke supresije indukovane UV zracima (Ramalho i sar., 2014). Efekti dijetetskog kemferola u smanjenju rizika od raznih hroničnih bolesti, posebno kancera, su opisani u mnogim istraživanjima (Limtrakul i sar., 2005; Chen i Chen, 2013). Rutin ispoljava mnoga farmakološka i zdravstveno korisna dejstva (cit. u Sakač i sar., 2014), dok hinska kiselina takođe ima širok spektar antioksidativnih svojstava i patentirana je kao prirodni proizvod koji štiti DNK (Quinmax™) (Pero i Lund, 2009).

Dobijeni rezultati skrininga fenolnih jedinjenja su izuzetno važni s obzirom da o produkciji ovih jedinjenja kod cijanobakterija postoji svega nekoliko literaturnih navoda. Predstavljeni rezultati pokazuju da svi ispitani sojevi produkuju fenolne komponente koje uključuju fenolne kiseline i flavonoide, pri čemu se naročito ističu kao producenti hinske kiseline i katehina. Kao sojevi sa najvećim potencijalom za produkciju fenolnih jedinjenja izdvajaju se *Nostoc* 2S7B i *Nostoc* 2S9B. Dobijeni rezultati takođe pokazuju značaj azotnih uslova kultivacije kod cijanobakterija u produkciji fenolnih jedinjenja, što je bilo naročito izraženo kod sojeva *Nostoc* 2S7B i *Nostoc* 2S9B. U daljim istraživanjima bi se trebala ispitati mogućnost povećanja produkcije fenolnih jedinjenja primenom različitih uslova kultivacije. U daljim istraživanjima bi svakako trebalo ispitati uticaj različitih faktora rasta na kvalitativni i kvantitativni sadržaj fenolnih jedinjenja, kao i mogućnost povećanja produkcije ovih jedinjenja primenom kombinacije različitih uslova kultivacije.

5.5. ANTIOKSIDANTNI POTENCIJAL ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBakterIJA

Antioksidantna aktivnost ispitanih etanolnih cijanobakterijskih ekstrakata određena je primenom testova za određivanje kapaciteta neutralizacije DPPH[•] radikala i redukcionu sposobnosti - FRAP test. U Tabelama 14 i 15 prikazane su IC₅₀ vrednosti (mg/mL) testiranih ekstrakata na neutralizaciju DPPH[•] radikala i rezultati redukcionog potencijala izraženi su u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta (mg AAE/g). Antioksidantna aktivnost ispitanih cijanobakterijskih sojeva je određena nakon kultivacije u azotofiksirajućim i neazotofiksirajućim uslovima.

IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata u DPPH testu iznose od 0,04 ± 0,01 mg/mL za soj *Nostoc* LC1B koji je ispoljio najveću sposobnost „hvatanja“ DPPH[•] radikala, do 9,47 ± 3,61 mg/mL za soj *Nostoc* 2S9B koji je ispoljio najnižu aktivnost. Među najpotentnijim sojevima u ovom testu bio je *Nostoc* S8 sa IC₅₀=0,06 ± 0,01 mg/mL. Dobijena aktivnost svih testiranih ekstrakata je bila slabija u poređenju sa sintetičkim antioksidantom BHT (IC₅₀=8,5 ± 0,8 µg/mL). Poređenjem aktivnosti istih sojeva kultivisanih u azotofiksirajućim i neazotofiksirajućim uslovima, nije uočena statistički značajna razlika.

Rezultati dobijeni u DPPH testu su u skladu sa istraživanjem koje su sproveli Ijaz i Hasnain (2016) koji su kod cijanobakterija zabeležili IC₅₀ vrednosti u opsegu od 67,49 do 119,6 µg/mL, kao i sa istraživanjima Babić i sar. (2015) u kojem su IC₅₀ vrednosti iznosile od 30,72 do 102,47 µg/mL. Manja inhibicija DPPH radikala zabeležena je u ekstraktima vrsta *Lyngbya limnetica* (28,32% pri 100 µg/mL) (Sharathchandra i Rajashekhar, 2013) i *Phormidium fragile* (58,1% pri 250 µg) (Mukund i sar., 2014), dok je kod nekih sojeva testiranih u ovoj tezi inhibicija bila znatno niža tako da su registrovane IC₅₀ vrednosti bile preko 1 mg/mL. Ipak, dobijene aktivnosti registrovane u etanolnim ekstraktima su bile mnogo

Tabela 14. Antioksidativna aktivnost ekstrakata cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u azotofiksirajućim uslovima

Cijanobakterijski soj	DPPH test IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP test (mg AAE/g)
<i>Nostoc</i> 2S7B	0,11 ± 0,00 ^a	12,23 ± 0,13 ^c
<i>Nostoc</i> 2S9B	4,71 ± 0,59 ^b	10,22 ± 0,97 ^d
<i>Nostoc</i> 2S3B	9,47 ± 3,61 ^b	9,44 ± 0,28 ^d
<i>Nostoc</i> 2S1	1,39 ± 0,63 ^a	13,69 ± 1,62 ^c
<i>Nostoc</i> S8	0,06 ± 0,01 ^a	11,34 ± 0,68 ^c
<i>Nostoc</i> LC1B	0,04 ± 0,01 ^a	11,38 ± 0,91 ^c
<i>Anabaena</i> Č2	0,11 ± 0,01 ^a	12,30 ± 0,35 ^c
<i>Anabaena</i> Č5	0,12 ± 0,01 ^a	12,89 ± 0,43 ^c

^{a-d} u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od p<0,05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa)

Tabela 15. Antioksidativna aktivnost ekstrakata cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u neazotofiksirajućim uslovima

Cijanobakterijski soj	DPPH test IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP test (mg AAE/g)
<i>Nostoc</i> 2S7B	0,11 ± 0,00 ^a	13,28 ± 0,29 ^c
<i>Nostoc</i> 2S9B	0,13 ± 0,00 ^a	9,13 ± 0,34 ^d
<i>Nostoc</i> 2S3B	5,84 ± 2,26 ^b	8,36 ± 0,08 ^d
<i>Nostoc</i> 2S1	1,76 ± 0,26 ^a	11,92 ± 0,41 ^c
<i>Nostoc</i> S8	0,50 ± 0,12 ^a	11,20 ± 0,38 ^c
<i>Nostoc</i> LC1B	2,11 ± 0,70 ^a	11,53 ± 0,47 ^c
<i>Anabaena</i> Č2	0,09 ± 0,00 ^a	12,64 ± 0,40 ^c
<i>Anabaena</i> Č5	0,12 ± 0,01 ^a	11,38 ± 0,20 ^c
<i>Spirulina</i> S1	0,12 ± 0,00 ^a	21,01 ± 1,66 ^a
<i>Spirulina</i> S2	0,10 ± 0,00 ^a	15,14 ± 0,12 ^b

^{a-d} u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti, pri nivou značajnosti od $p < 0,05$ (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa)

više u poređenju sa rezultatima Milovanović (2016) u kojima je testirana aktivnost u metanolno/vodenim i heksanskim ekstraktima i bila u opsegu od 22 – 110 mg/mL. Sa druge strane, sposobnost „hvatanja“ DPPH radikala u ekstraktu vrste *Plectonema boryanum* pri koncentraciji od 50 µg/mL je bila veća u poređenju sa askorbinskom kiselinom (Suhail i sar., 2011), a u ekstraktu vrste *Oscillatoria agardhii* je bila slična sa sintetičkim antioksidantom BHA (Abd El-Aty i sar., 2014). Štaviše, IC₅₀ vrednosti od 30,72 µg/mL kod soja *Calothrix* M2 (Babić i sar., 2015) i 26,90 µg/mL kod uzorka vrste *S. platensis* (Kepekçi i Saygideger, 2012), ukazuju da su neke cijanobakterije izuzetan izvor antioksidativnih jedinjenja. Kao naročito potentan soj testiran u ovoj tezi u pogledu ispoljene antioksidativne aktivnosti izražene kroz neutralizaciju DPPH radikala može se izdvojiti *Nostoc* LC1B.

Najveći redukcionni potencijal u FRAP testu pokazao je ekstrakt soja *Spirulina* S1 (21,01 ± 1,66 mg AAE/g), dok je najmanji pokazao ekstrakt soja *Nostoc* 2S3B (8,36 ± 0,08 mg AAE/g). Kod svih ispitivanih sojeva redukcionni potencijal se nije statistički značajno razlikovao u zavisnosti od azotnih uslova kultivacije, ali se značajno razlikovao među pripadnicima različitih rodova. Najveći redukcionni potencijal je registrovan kod sojeva roda *Spirulina* i u slučaju soja *Spirulina* S1 bio je oko 2 puta veći nego kod testiranih azotofiksirajućih sojeva. Ipak, redukcionni potencijal testiranih ekstrakata je bio manji u odnosu na sintetički antioksidant BHT (25,32 ± 2,50 mg AAE/g). U ranije sprovedenim istraživanjima, zabeležene su i veće FRAP aktivnosti cijanobakterijskih ekstrakata, od 22,48 mg AAE/g (Babić i sar., 2015) i 35,57 µM AAE/g (Kepekçi i Saygideger, 2012).

S obzirom da se fenolna jedinjenja smatraju najjačim prirodnim antioksidantima, izračunati su koeficijenti korelacije između antioksidativnih aktivnosti i ukupnog sadržaja detektovanih fenolnih jedinjenja (galna kiselina, hlorogena kiselina, hinska kiselina, katehin, epikatehin, kemferol, rutin, apiin) (Tabela 16). Pearsonov koeficijent korelacije pokazao je da

ne postoji korelacija između antioksidantne aktivnosti i ukupnog sadržaja detektovanih fenolnih jedinjenja, osim u slučaju sojeva kultivisanih u neazotofiksirajućim uslovima u FRAP testu gde je koeficijent korelacije bio značajan. Takvi rezultati ukazuju na to da kod većine testiranih cijanobakterijskih sojeva za ispoljenu antioksidativnu aktivnost najverovatnije nisu odgovorna registrovana fenolna jedinjenja.

Tabela 16. *P* vrednosti i Pearsonov koeficijent korelacije (*r*) između antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja detektovanih fenolnih jedinjenja ekstrakata azotofiksirajućih sojeva

Azotni uslovi kultivacije	Kapacitet „hvatanja“ DPPH radikala		Redukcioni potencijal	
	<i>r</i>	<i>P</i> vrednost	<i>r</i>	<i>P</i> vrednost
azotofiksirajući uslovi	-0,2432	0,331	0,0580	0,819
neazotofiksirajući uslovi	-0,3022	0,151	-0,4769	0,018*

Nivo značajnosti je $p < 0,05$

Li i sar. (2007) su konstatovali da je kod cijanobakterija iznenađujuće da različite vrste u okviru iste familije, pa čak i sojevi u okviru iste vrste, mogu ispoljiti veoma različitu sposobnost „hvatanja“ radikala, što se takođe može uočiti kod rezultata dobijenih u ovoj tezi. Za procenu antioksidativnog kapaciteta uzoraka preporučuje se kombinacija različitih metoda zbog njihovih različitih karakteristika i mehanizama reakcije (Číž i sar., 2010). Prema Hajmahmoodi-ju i sar. (2009) može se očekivati da se primenom testova DPPH i FRAP kod cijanobakterija tačno odražavaju svi antioksidanti u uzorku. Za razliku od DPPH testa, FRAP test ne može da detektuje jedinjenja koja „hvataju“ radikale prenosom atoma vodonika, jer se zasniva na redukciji metala, i trebao bi uglavnom da detektuje antioksidativnu aktivnost polifenola (Goiris i sar., 2012). Tako su u istraživanju koje su sproveli Hajmahmoodi i sar. (2009) fenoli su bili glavni nosioci ispoljenog antioksidativnog delovanja u FRAP testu, ali ne i u DPPH testu. Sa druge strane, otkriveno je da specifični karoteni i ksantofili takođe pokazuju značajnu FRAP aktivnost (Müller i sar., 2011), tako da su Safafar i sar. (2015) kao glavne nosioce redukcionog potencijala kod testiranih mikroalgi registrovali karotenoide. Kako su u ovoj tezi testirani sojevi roda *Spirulina*, koji su prikazani kao siromašniji producenti fenola, ispoljili najveću FRAP aktivnost, ona bi se mogla pripisati fenolnim komponentama koje nisu detektovane korišćenom metodom, ili nekim drugim jedinjenjima. Cepoi i sar. (2009) su pretpostavili da je kod vrsta *Spirulina platensis* i *Nostoc linckia* antioksidantna aktivnost verovatno povezana sa značajnim količinama karotenoida i tokoferola koji su bolje ekstrahovani pri višim koncentracijama etanola (55% i 70%), dok su Goiris i sar. (2012) pokazali da pored fenola i karotenoida i druge komponente doprinose antioksidativnoj aktivnosti cijanobakterija. Štaviše, ovi organizmi bi mogli da sadrže antioksidanse i fenole koji nisu prisutni kod biljaka (Li i sar., 2007; Goiris i sar., 2012). Cijanobakterije mogu da sintetizuju različite fitohemikalije uključujući tanine, terpenoide i

steroidne (Shalaby i Shanab, 2013; Sharathchandra i Rajashekhar, 2013), scitonemin i mikosporinu-slične aminokiseline (MAA), isparljiva jedinjenja (Milovanović i sar., 2015), fikobiliproteine, polinezasićene masne kiseline, i u takvim složenim smešama specifičan antioksidans može biti regenerisan drugim antioksidansom (Miranda i sar., 1998; Goiris i sar., 2012).

Predstavljeni rezultati pokazuju da svi ispitani sojevi proizvode antioksidativne agense. Relativnim poređenjem rezultata dobijene antioksidantne aktivnosti zasnovane na neutralizaciji slobodnih radikala i transferu elektrona, kao sojevi sa najvećim antioksidantnim potencijalom izdvajaju se *Spirulina* S1 i *Spirulina* S2. Dobijeni rezultati takođe ukazuju i da je antioksidantna aktivnost ekstrakata najverovatnije rezultat sinergizma različitih komponenti, koje bi mogle biti alternativa sintetičkim antioksidantima. U cilju preciznijeg određivanja antioksidativnog potencijala i identifikacije jedinjenja odgovornih za ispoljenu aktivnost, dalje istraživanje bi trebalo usmeriti ka detaljnijoj hemijskoj karakterizaciji ekstrakata testiranih sojeva cijanobakterija.

5.6. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ISPITIVANIH SOJEVA CIJANOBakterIJA

Antibakterijska aktivnost ispitanih cijanobakterijskih ekstrakata prema 8 referentnih bakterijskih sojeva određena je primenom disk-difuzione i mikrodilucione metode. S obzirom da je u mnogim ranijim istraživanjima metanol pokazan kao najbolji rastvarač za ekstrakciju antibakterijskih agenasa cijanobakterija, metanolni ekstrakti su korišćeni u skriningu u disk-difuzionoju metodi i u Tabelama 17 i 18 prikazane su registrovane zone inhibicije izražene u mm. U cilju određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) korišćeni su metanolni i DMSO ekstrakti. Rezultati registrovanih MIC vrednosti predstavljeni su u Tabeli 19.

Rezultati skrininga antibakterijske aktivnosti ispitanih cijanobakterijskih ekstrakata ukazali su na potencijal određenih sojeva u produkciji antibakterijskih agenasa prema određenim bakterijskim sojevima. Primenom disk-difuzione metode antibakterijska aktivnost je registrovana kod šest ispitivanih cijanobakterijskih sojeva: *Nostoc* 2S7B, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* Č2, *Anabaena* Č5, *Spirulina* S1 i *Spirulina* S2, pri čemu su svi navedeni sojevi ispoljili inhibitorni efekat na više od jedan testiran bakterijski soj. Sojevi *Anabaena* Č2, *Nostoc* 2S7B i *Nostoc* 2S1 su ispoljili najjaču aktivnost, delujući inhibitorno na po četiri bakterijska soja, dok je soj *Spirulina* S2 delovao na dva soja bakterija. Nijedan od ispitivanih cijanobakterijskih sojeva nije pokazao antibakterijsku aktivnost na bakterije *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 12453, *K. pneumoniae* ATCC 31488 i *S. aureus* ATCC 25923. Najosetljiviji na delovanje cijanobakterijskih ekstrakata bili su bakterijski sojevi *S. enteritidis* ATCC 13076 i *E. faecalis* ATCC 19433 na koje je antibakterijsku aktivnost ispoljilo šest cijanobakterijskih sojeva, dok su na *P. aeruginosa* ATCC 9027 i *B. subtilis* ATCC 6633 antibakterijsku aktivnost ispoljila po četiri cijanobakterijska soja. Kod nekih sojeva produkcija antibakterijska aktivnost je zavisila od primenjenih azotnih uslova kultivacije. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je registrovana kod svih 6 ispitanih cijanobakterijskih sojeva u slučaju metanolnih ekstrakata za *E. faecalis* ATCC 19433 i soja *Anabaena* Č2 za *Bacillus subtilis* ATCC 6633, i u svim slučajevima iznosila je 3 mg/mL (najveća testirana koncentracija metanolnih ekstrakata). Sa druge strane, nijedan testiran DMSO ekstrakt nije ispoljio aktivnost u ispitanom opsegu koncentracija primenom mikrodilucione metode, ni u najvećim testiranim koncentracijama (10 mg/mL). Registrovane MIC vrednosti cijanobakterijskih metanolnih ekstrakata su bile značajno veće u odnosu na minimalne inhibitorne koncentracije dobijene testiranjem čistog antibiotika tetraciklina. Minimalna baktericidna koncentracija ispitanih ekstrakata (MBC) nije registrovana ni u jednom slučaju. Zbog toga bi se za sojeve kod kojih u opsegu testiranih koncentracija ekstrakata nisu utvrđene MBC vrednost, trebalo ponoviti testiranje sa širim koncentracijskim opsegom ekstrakata u cilju preciznijeg utvrđivanja da li sojevi ipak produkuju antibakterijske supstance, ali sa nižim sadržajem u biomasi.

Tabela 17. Antibakterijska aktivnost cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u azotofiksirajućim uslovima

Cijanobakterijski soj	Bakterijski soj							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 31488	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Nostoc</i> 2S7B	-	11*	-	-	-	12	12	-
<i>Nostoc</i> 2S9B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> 2S3B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> 2S1	-	10	-	-	-	12,5	13	-
<i>Nostoc</i> S8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> LC1B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anabaena</i> Č2	-	11	-	-	-	16	14	-
<i>Anabaena</i> Č5	-	10	-	-	-	-	12	-

*Zona inhibicije (mm)

Tabela 18. Antibakterijska aktivnost cijanobakterijskih sojeva kultivisanih u neazotofiksirajućim uslovima

Cijanobakterijski soj	Bakterijski soj							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 31488	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Nostoc</i> 2S7B	-	11*	8	-	-	-	11	-
<i>Nostoc</i> 2S9B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> 2S3B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> 2S1	-	14	9	-	-	7	14	-
<i>Nostoc</i> S8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> LC1B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anabaena</i> Č2	-	9	10	-	-	-	12	-
<i>Anabaena</i> Č5	-	13	10	-	-	-	13	-
<i>Spirulina</i> S1	-	10	-	-	-	8	18	-
<i>Spirulina</i> S2	-	10	-	-	-	-	8	-

*Zona inhibicije (mm)

Kao doprinos naporima koji se ulažu za otkrivanje novih prirodnih jedinjenja efikasnih protiv bakterija, u ovom istraživanju ispitan je potencijal autohtonih sojeva cijanobakterija. Rezultati antibakterijskog skrininga pokazuju da većina testiranih sojeva (60%) ispoljava antibakterijsku aktivnost, sa dijametrima zona inhibicije od 7 do 18 mm. Ipak, kod nekih testiranih ekstrakata nisu uočene zone inhibicije, ili su bile male, što bi moglo biti zbog niskog difuzionog potencijala njihovih aktivnih komponenti u agarizovanoj podlozi (Najdenski i sar., 2013), kao i zbog niskog sadržaja/odsustva aktivnih jedinjenja u biomasi tj. ekstraktu. Sa druge strane, kada su testirani u tečnoj podlozi (mesopeptonski bujon), većina uzoraka nije pokazala aktivnost ni pri visokim koncentracijama ekstrakata. Ipak, može se uočiti da je najveća aktivnost u disk-difuzionoj metodi ispoljena na bakterijski soj *E. faecalis* ATCC 19433, kao i na *B. subtilis* ATCC 6633 od strane soja *Anabaena* Č2, i da su upravo u ovim kombinacijama u mikrodilucionoj metodi registrovane MIC vrednosti.

Prethodna istraživanja pokazuju ogroman potencijal cijanobakterija za produkciju antibakterijskih agenasa. U istraživanju koje su sproveli Jaki i sar. (1999) 49% testiranih sojeva cijanobakterija je proizvelo antimikrobna jedinjenja, dok su Svirčev i sar. (2008) kod 41% testiranih sojeva iz rodova *Anabaena* i *Nostoc* registrovali produkciju antibakterijskih agenasa, uključujući ekstracelularne i intracelularne supstance. Do sličnih podataka su došli i Silva-Stenico i sar. (2011) koji su kod 48% testiranih brazilskih izolata (redovi *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Stigonematales*) registrovali odgovor protiv većine testiranih bakterija. Pripadnici rodova *Nostoc* i *Anabaena* su pokazani kao producenti antibakterijskih agenasa u nekoliko prethodnih istraživanja (El-Sheekh, 2006; Svirčev i sar., 2008; Guedes i sar., 2011), kao i pripadnici roda *Spirulina* (Kaushik i Chauhan, 2008; Kumar i sar., 2011), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi. Metanolski ekstrakti nekih sojeva testirani u ovom istraživanju su pokazali značajnu aktivnost prema različitim bakterijama. U istraživanju drugih autora (Ozdemir i sar., 2004; Kaushik i Chauhan, 2008) je takođe u različitim sirovim ekstraktima cijanobakterija registrovana aktivnost prema različitim patogenima. Kaushik i Chauhan (2008) su registrovali naj snažniju antimikrobnu aktivnost upravo u metanolskom ekstraktu u odnosu na heksanski, etil-acetatni i dihlorometanski, dok su Ozdemir i sar. (2004) registrovali veću aktivnost u metanolnim ekstraktima u poređenju sa isparljivim komponentama. U poređenju sa rezultatima drugih autora, registrovane zone inhibicije u ovom istraživanju su bile manje u odnosu na zabeležene za *S. aureus* od 24 mm i *S. typhimurium* od 22 mm (Kumar i sar., 2011), dok su za različite tipove ekstrakata *S. platensis* Kaushik i Chauhan (2008) zabeležili zone inhibicije od 4,45 – 15,21 mm. U istraživanju ovih autora sve testirane bakterije (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*) izuzev *K. pneumoniae* su pokazale osetljivost na metanolski ekstrakt *S. platensis*. Ipak, pomenuti autori su za ispitane cijanobakterijske uzorke registrovali MIC vrednosti od 128 do 512 µg/mL. Najdenski i sar. (2013) su takođe kod testiranih uzoraka cijanobakterija zabeležili mnogo niže MIC vrednosti u poređenju sa MIC vrednostima zabeleženim u ovoj tezi, koje su dostizale 125 µg/mL.

Tabela 19. Antibakterijska aktivnost metanolnih i DMSO ekstrakata cijanobakterijskih sojeva kultiviranih u azotofiksirajućim uslovima (MIC, mg/mL) koji su ispoljili antibakterijsku aktivnost

Cijanobakterijski soj	Bakterijski soj							
	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	
	M	D	M	D	M	D	M	D
<i>Nostoc</i> 2S7B	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>Nostoc</i> 2S1	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>Anabaena</i> Č2	-	-	-	-	3	-	3	-
<i>Anabaena</i> Č5	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>Spirulina</i> S1	-	-	-	-	-	-	3	-
<i>Spirulina</i> S2	-	-	-	-	-	-	3	-

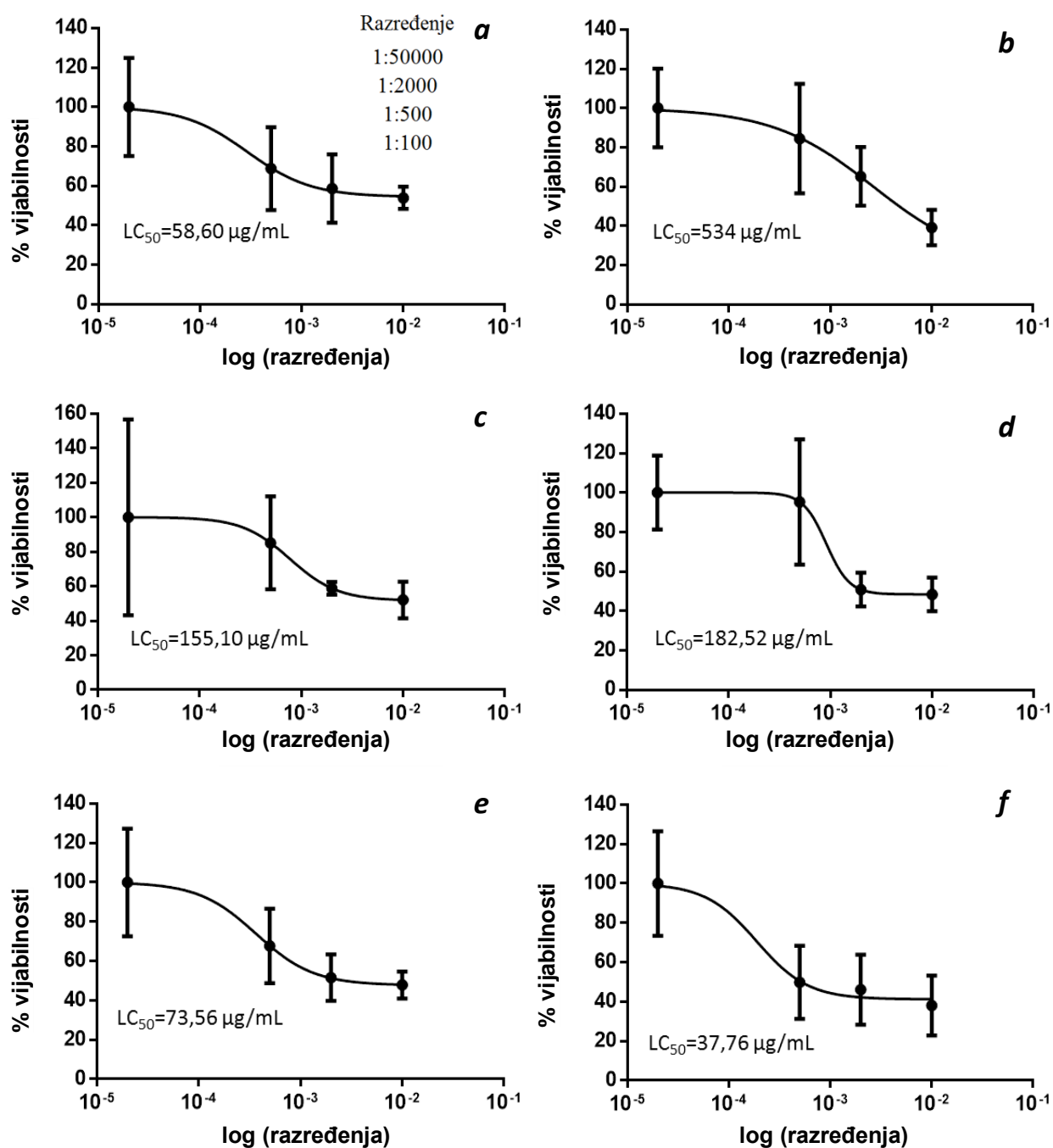
M – metanolni ekstrakt, D – DMSO ekstrakt

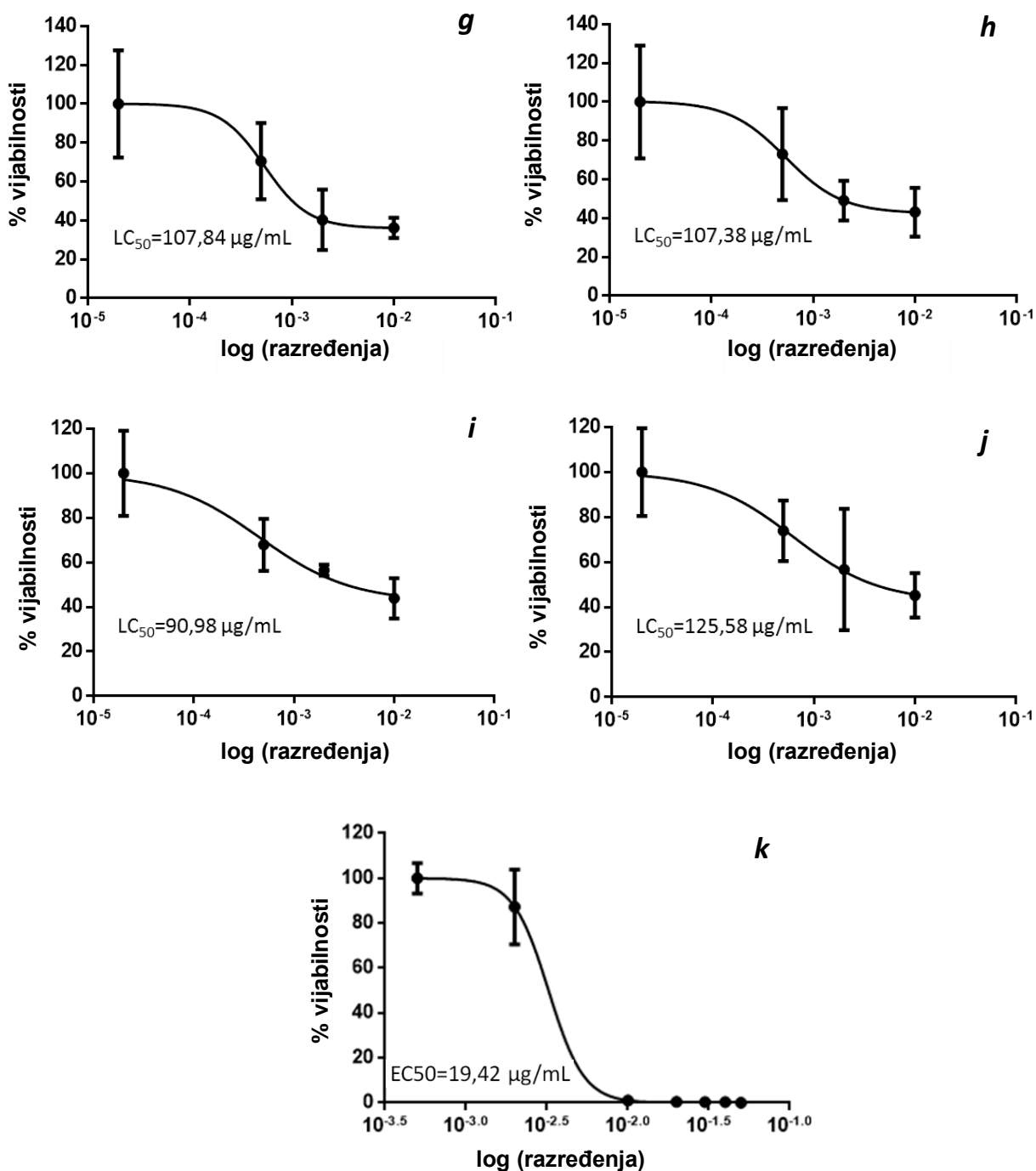
U cilju utvrđivanja koja jedinjenja bi mogla biti nosioci ispoljene aktivnosti, neophodna su dalja ispitivanja sa različitim frakcijama ekstrakata testiranih cijanobakterijskih sojeva. Kao što je već spomenuto, mnogi autori antibakterijsku aktivnost cijanobakterija povezuju sa različitim masnim kiselinama, od kojih su sve one (γ -linolenska, α -linoleinska, palmitinska, linolna, oleinska) detektovane kao dominantne masne kiseline kod ispitivanih sojeva u ovoj tezi. U istraživanju koje su sproveli Najdenski i sar. (2013), ekstrahovane masne kiseline svih testiranih cijanobakterija su pokazale antibakterijsku aktivnost. Iako tačan mehanizam mikrobicidnog efekta masnih kiselina nije u potpunosti razjašnjen, dokazan je efekat na oštećenje ćelijske membrane (Mostafa i sar., 2012; Najdenski i sar., 2013). Pored masnih kiselina kao potencijalna antibakterijska jedinjenja, u ovom istraživanju su kod svih sojeva detektovani fikobiliproteinski pigmenti za koje je takođe utvrđena antibakterijska aktivnost. C-fikocijanin (C-PC) iz vrste *S. platensis* je identifikovan kao snažan agens prema različitim patogenima - *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* (Sarada i sar., 2011).

Predstavljeni rezultati pokazuju da ispitivani sojevi cijanobakterija: *Nostoc* 2S7B, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* Č2, *Anabaena* Č5, *Spirulina* S1 i *Spirulina* S2 mogu predstavljati potencijalno značajan izvor prirodnih antibakterijskih jedinjenja. U cilju preciznijeg određivanja potencijala za produkciju antibakterijskih agenasa, dalje istraživanje bi trebalo da uključi ispitivanje drugih tipova ekstrakata na veći broj bakterijskih sojeva, frakcionisanje ekstrakata kao i detaljniju hemijsku karakterizaciju biaktivnih komponenti.

5.7. ANTIKANCEROGENA AKTIVNOST – ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOG EFEKTA SOJEVA CIJANOBAKTERIJA

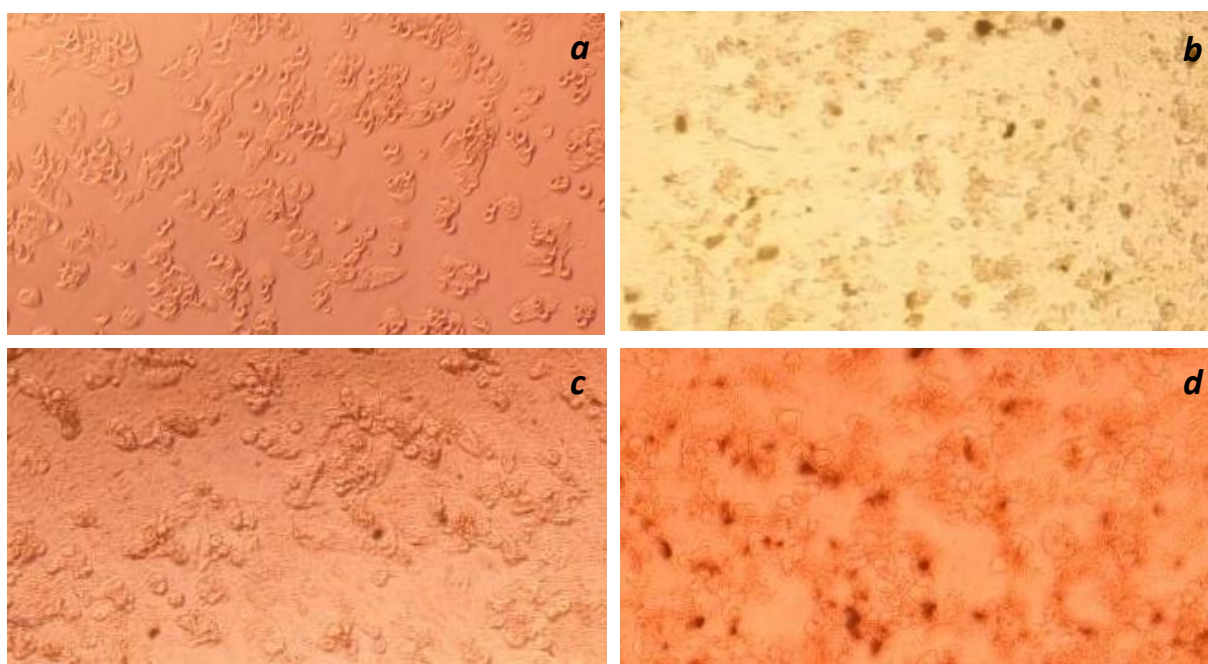
Antikancerogena aktivnost sojeva cijanobakterija testirana je u eseju sa ćelijskom linijom humanog hepatocelularnog karcinoma - HepG2. Antikancerogena aktivnost ispitanih cijanobakterijskih ekstrakata određena je primenom MTT testa, zasnovanim na enzimskoj redukciji 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromida (MTT) do plavo obojenog formazana u mitohondrijama. Na Slici 34 prikazane su dozno-zavisne krive sa LC_{50} vrednostima ($\mu\text{g/mL}$) ekstrakata testiranim na ćelijskoj liniji HepG2.





Slika 34. Preživljavanje HepG2 ćelija eksponiranih ekstraktima testiranih sojeva cijanobakterija. (a) – *Nostoc* 2S7B, (b) - *Nostoc* 2S9B, (c) – *Nostoc* 2S3B, (d) - *Nostoc* 2S1, (e) – *Nostoc* S8, (f) - *Nostoc* LC1B, (g) - *Anabaena* Č2, (h) - *Anabaena* Č5, (i) - *Spirulina* S1, (j) - *Spirulina* S2. Pozitivna kontrola (Paclitaxel) je prikazana na slici k. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost procenta vijabilnosti \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta urađena u tri ponavljanja.

Svi testirani sojevi ispoljili su citotoksični efekat na ćelijsku liniju humanog hepatocelularnog karcinoma, izazivajući značajno smanjenje aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze i produkcije formazana. Vijabilnost ćelija se smanjivala sa povećanjem koncentracije kod ekstrakata svih testiranih sojeva cijanobakterija i LC_{50} vrednosti su bile u opsegu od 37,76 $\mu\text{g/mL}$ (razblaženje 1:5296) za soj *Nostoc* LC1B koji je pokazao najveću antikancerogenu aktivnost (Slika 34f) do 534 $\mu\text{g/mL}$ (razblaženje 1:375) za soj *Nostoc* 2S9B koji je ispoljio najslabiju antikancerogeni efekat. Kod svih testiranih sojeva izuzev *Nostoc* 2S9B, LC_{50} vrednost je bila ispod 200 $\mu\text{g/mL}$, ukazujući na značajnu citotoksičnu aktivnost sojeva. Dobijena aktivnost svih testiranih ekstrakata je bila slabija u poređenju sa onom koja je registrovana za pozitivnu kontrolu, paclitaxel, što je bilo i očekivano. Ipak, može se uočiti da su registrovane LC_{50} vrednosti određenih sojeva bile slične sa LC_{50} dobijenom za paclitaxel, naročito soja *Nostoc* LC1B koja je bila oko 2 puta viša, što ukazuje na snažnu citotoksičnu aktivnost ovog ekstrakta. Na Slici 35 predstavljen je izgled ćelija nakon ekspozicije ekstraktima određenih sojeva cijanobakterija, pri čemu je moguće uočiti izmenjenu morfologiju HepG2 ćelija nakon delovanja ekstrakata cijanobakterijskih sojeva.



Slika 35. Izgled HepG2 ćelija humanog hepatocelularnog karcinoma nakon 24-časovne ekspozicije ekstraktima cijanobakterija koncentracije 2 mg/mL. (a) - kontrola, (b) - ćelije eksponirane ekstraktu soja *Nostoc* LC1B, (c) - ćelije eksponirane ekstraktu soja *Spirulina* S1, (d) ćelije eksponirane ekstraktu soja *Nostoc* 2S7B.

Slično dobijenim rezultatima, Costa i sar. (2014) su kod 46% testiranih cijanobakterijskih sojeva detektovali aktivnost prema HepG2 ćelijskoj liniji. Štaviše, ova grupa autora je testirala 28 sojeva cijanobakterija na 8 ćelijskih linija humanih karcinoma i utvrdila da je većina ispitanih sojeva ispoljila citotoksičan efekat na najmanje jednoj ćelijskoj liniji, pri čemu su sojevi *Leptolyngbya fragilis* LEGE 07167 i *Synechocystis salina* LEGE 06155 okarakterisani kao sojevi sa najvećom antikancerogenom aktivnošću. Ovi autori su testirali ekstrakte u koncentracijama od 1, 10 i 100 µg/mL, i u mnogim slučajevima utvrdili citotoksični efekat samo za koncentraciju od 100 µg/mL. Navedena koncentracija je pokazana kao najefikasnija u skriningu koji su sproveli Leao i sar. (2013), koji su ekstrakte marinskih cijanobakterija testirali u nekoliko ekološki relevantnih bioeseja. Shanab i sar. (2012) su takođe testirali vodene ekstrakte cijanobakterija u koncentraciji od 100 µg/mL u HepG2 i EACC ćelijskim linijama, u kojima su registrovali antitumorsku efikasnost u opsegu od 9,5-89,4% i od 15,68-87,25% respektivno, pri čemu su najveću aktivnost u obe ćelijske linije ispoljili sojevi vrsta *Nostoc muscorum* i *Oscillatoria* sp. U skladu sa istraživanjima ovih grupa autora, svi sojevi testirani u ovoj tezi izuzev *Nostoc* 2S1 su ispoljili citotoksičnu aktivnost pri koncentraciji od 100 µg/mL. Sa druge strane, u istraživanju Yang-a i sar. (2011), ekstrakti vrsta *Spirulina platensis* i *Nostoc commune* var. *sphaeroides* su ispoljili nisku aktivnost prema HepG2 ćelijskoj liniji, i pri koncentraciji od 500 µg/mL vijabilnost ćelija je bila od 70-80%. Ovi autori su testirali heksanske, hloroformske, metanolske i vodene ekstrakte, dok su u ovoj tezi korišćeni sirovi ekstrakti (DMSO) inicijalno rastvoreni u smeši dihlometana i metanola. U istraživanju koje su sproveli Costa i sar. (2014) upravo su sirovi ekstrakti dobijeni u smeši dihlometana i metanola ispoljili veću bioaktivnost u poređenju sa naknadno dobijenim frakcijama (heksan, etil-acetat, metanol). Dobijene rezultate objasnili su prisustvom smeše različitih bioaktivnih jedinjenja, koja se gube frakcionisanjem. Sa druge strane, s obzirom da u MTT testu rezultati u velikoj meri zavise od mitohondrijalne aktivnosti, ukoliko je njihova aktivnost poremećena rezultati mogu ukazati na to da ćelije nisu žive ili ne proliferišu, što realno nije slučaj (Kaišarević, 2009). Takođe se može propustiti efekat nekih citotoksičnih metabolita koji bi mogli uticati na druge ćelijske organele, bez ometanja funkcija mitohondrija (Weyermann i sar., 2005). Pored toga, citotoksični efekti se mogu javiti u različitim vremenskim intervalima i inicijalno uticati na mitohondrije, a kasnije i na membrane Costa i sar. (2014).

Antikancerogena aktivnost cijanobakterija se pripisuje različitim jedinjenjima. Kao što je navedeno, fenolna jedinjenja se smatraju snažnim antioksidansima koji učestvuju u prevenciji širokog spektra oboljenja, uključujući kancer. Za fenolna jedinjenja koja su detektovana kod testiranih sojeva cijanobakterija, katehin (najzastupljeniji flavonoid kod svih testiranih sojeva), kemferol (detektovan kod sojeva *Nostoc* 2S7B, 2S9B i 2S3B), apiin i hlorogenu kiselinu (detektovani kod soja *Nostoc* 2S9B) je dokazano da ispoljavaju antikancerogenu aktivnost. Pokazano je da bi katehin hidrat mogao biti alternativni lek za rak grlića materice (Al-Hazzani i sar., 2011), dok su efekti dijetetskog kemferola u smanjenju

rizika od raznih hroničnih bolesti, posebno kancera, takođe opisani (Limtrakul i sar., 2005; Chen i Chen, 2013). Limtrakul i sar. (2005) su pokazali da kemferol smanjuje otpornost KB ćelija kancera (KB-V1) na antikancerogene lekove vinblastin i paklitaksel smanjenjem i ekspresije i funkcije P-glikoproteina (P-gp), čime pomaže u prevenciji od kancera. Apigenin (aglikon apiina) obezbeđuje zaštitu protiv širokog spektra kancera (Lefort i Blay, 2013), dok je i za hlorogenu kiselinu pokazano potencijalno preventivno antikancerogeno delovanje (cit. u Miranda i sar., 1998).

Shanab i sar. (2012) su pretpostavili da bi ispoljena antikancerogena aktivnost vodenih cijanobakterijskih ekstrakata registrovania prema HepG2 i EACC ćelijama mogla biti rezultat velikog sadržaja fikobiliproteinskih pigmenata, sekundarnih metabolita (terpenoida, fenola, alkaloida) i polisaharida, s obzirom da su ekstrahovana visoko polarna jedinjenja. Wang i sar. (2007) su takođe zabeležili da su vodeni ekstrakti crvenih algi koje su sadržale uglavnom c-fikocijanin (C-PC) ispoljili veću antiproliferativnu aktivnost, indukujući formiranje apoptotskih tela. Ovi autori su objasnili da fikocijanin interaguje sa membranski vezanim B-tubulinom i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazom (GAPDH), izazivajući polimerizaciju mikrotubula i aktinskih filamenata, što vodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G0/G1 fazi. Pokazano je da ovaj pigment smanjuje aktivnost agensa tumorskih ćelija CoX-2, smanjuje rast ćelija humane leukemije, i u krvnoj plazmi miševa smanjuje nivo faktora nekroze tumora. Osim toga, zajedno sa porfirinima se može koristiti kao fotosenzibilizator u laserskoj terapiji karcinoma kože (Stadnichuk i Tropin, 2017). Shodno navedenim istraživanjima, C-PC koji je detektovan kod svih cijanobakterija u ovom istraživanju, bi se takođe mogao povezati sa ispoljenom antikancerogenom aktivnošću. Sve to svakako zahteva dodatna istraživanja u cilju preciznijeg određivanja jedinjenja odgovornih za ispoljen efekat. Predstavljeni rezultati pokazuju da svi ispitani sojevi cijanobakterija ispoljavaju aktivnost prema HepG2 ćelijama humanog karcinoma, pri čemu se kao sojevi sa najvećim citotoksičnim potencijalom naročito izdvajaju *Nostoc* LC1B i *Nostoc* 2S7B. Dobijeni rezultati su pokazali da ekstrakti ispitivanih sojeva cijanobakterija predstavljaju značajan izvor antikancerogenih agenasa koji bi mogli biti važni u ispitivanju i primeni potencijalnih terapeutika u lečenju određenih tipova kancera. Ova činjenica ide u prilog nastavku istraživanja na ovom polju, kako bi se utvrdilo koja jedinjenja su nosioci antikancerogene aktivnosti.

5.8. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI SOJEVA CIJANOBAKTERIJA

1) Toksičnost sojeva cijanobakterija detektovana u bioesejima

U cilju detekcije toksičnih sojeva cijanobakterija korišćeni su bioeseji *Artemia salina*, *Daphnia magna*, test sa embrionima zebrice (*Danio rerio*, DarT), kao i riblja ćelijska linija RTL-W1 (ćelije jetre kalifornijske pastrmke, *Onchorhynchus mykiss*). U Tabeli 20 prikazane su LC₅₀ vrednosti (µg/mL) testiranih metanolnih i DMSO ekstrakata registrovane u primenjenim esejima nakon perioda ekspozicije od 24 h i 48 h.

Toksičnost testiranih sojeva cijanobakterija se razlikovala kako u zavisnosti od soja, tipa ekstrakta, vremena ekspozicije, tako i u zavisnosti od primenjenog eseja. U većini slučajeva zabeležena je dozna zavisnost kao i vremenska zavisnost u ispoljavanju toksičnosti testiranih sojeva cijanobakterija.

Rezultati dobijeni u bioeseju *A. salina* ukazuju na toksičnost određenih sojeva, sa LC₅₀ vrednostima u opsegu od 1530 µg/mL za soj *Anabaena* Č2 koji je ispoljio najveću toksičnost, do 4870 µg/mL za soj *Nostoc* 2S1. Značajan nivo toksičnosti ispoljio je i soj *Nostoc* 2S3B sa LC₅₀=2360 µg/mL. Dozno-zavisne krive ekstrakata koji su ispoljili toksičnost u bioeseju *A. salina* date su u Prilogu 1.

Bioesej *A. salina* se često koristi u skriningu toksičnosti cijanobakterija i pokazao se kao naročito značajan za detekciju ukupne, akutne toksičnosti u kombinaciji sa drugim metodama. Ovaj test organizam je pokazao senzitivnost na različite cijanotoksine, uključujući mikrocistine (Lee i sar., 1999; Akin-Oriola i Lawton, 2006; Douma i sar., 2009), nodularin (Agrawal i sar., 2012), cilindrospermopsin (Metcalf i sar., 2002) i anatoksin-a (Lahtl i sar., 1995). Štaviše, Lee i sar. (1999) su konstatovali sličnu osetljivost bioeseja *A. salina* i bioeseja u kojem se koriste kao test organizmi miševi. Slično rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, Metcalf i sar. (2002) su u bioeseju *A. salina* kod cijanobakterijskih ekstrakata detektovali LC₅₀ vrednosti u opsegu od 1000 do >20000 µg/mL, pri čemu su za toksin-produkujuće sojeve ove vrednosti bile u opsegu od 1000 - 2210 µg/mL, dok su Mohamed i sar. (2006) nakon 24 h registrovali LC₅₀ vrednosti u opsegu od 2300 - 16200 µg/mL. U cilju ispitivanja toksičnosti vodenih sojeva cijanobakterija izolovanih sa područja Vojvodine, u istraživanju Simeunović (2009) registrovana je visoka korelaciju između sadržaja mikrocistina i mortaliteta u bioeseju *A. salina*, pri čemu su LC₅₀ vrednosti bile u opsegu od 240 do 3890 µg/mL i identifikovano je nekoliko veoma toksičnih sojeva. U istraživanju Akin-Oriola-e i Lawton-a (2006), LC₅₀ vrednost najtoksičnijeg soja iznosila je 800 µg/mL (18 h), dok su Lee i sar. (1999) za određivanje toksičnosti koristili minimalnu koncentraciju ekstrakta koja ubija sve jedinke za 24 h, i ona je varirala od 5000 do >100000 µg/mL. Poređenjem rezultata dobijenih u ovom radu sa rezultatima navedenih grupa autora, može se konstatovati

Tabela 20. LC₅₀ vrednosti (µg/mL) cijanobakterijskih ekstrakata u bioesejima nakon 24 h i/ili 48 h

Cijanobakterijski soj	<i>Artemia salina</i>				<i>Daphnia magna</i>				DarT		RTL-W1	
	24 h		48 h		24 h		48 h		24 h	48 h	24 h	
	M	D	M	D	M	D	M	D	D	D	D	
<i>Nostoc</i> 2S7B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> 2S9B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> 2S3B	-	-	2360	-	-	-	-	-	-	-	LC ₁₀₀ =50	-
<i>Nostoc</i> 2S1	4330	-	4870	-	-	-	-	102	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> S8	-	-	4050	-	110	-	110	-	-	-	43,7	-
<i>Nostoc</i> LC1B	4690	-	4320	-	-	-	-	66,4	100	-	87	-
<i>Anabaena</i> Č2	1570	-	1530	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anabaena</i> Č5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,7	-
<i>Spirulina</i> S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spirulina</i> S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-“: vrednost nije određena jer je mortalitet manji od 50%, M – metanolni ekstrakti, D – DMSO ekstrakti

visoka toksičnost soja *Anabaena* Č2, koji je izazvao 100% mortalitet nakon 24 h pri koncentraciji od 10000 µg/mL, sa LC₅₀ vrednostima od 1570 µg/mL nakon 24 h i 1530 µg/mL nakon 48 h. Sa druge strane, detektovane LC₅₀ vrednosti za testirane cijanobakterijske ekstrakte u istraživanju Lopes-a i sar. (2010) su bile u opsegu od 8950-79920 µg/mL, dok su Frazao i sar. (2010) za sve testirane sojeve registrovali LC₅₀ vrednosti u opsegu od 48300-51500 µg/mL. U skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi, LC₅₀ vrednosti navedenih autora su bile niže nakon 48 h nego nakon 24 h, što ukazuje na povećanje toksičnosti sa dužinom ekspozicije.

Rezultati dobijeni u bioesejima sa neonatama vrste *Daphnia magna* i embrionima vrste *Danio rerio* pokazuju osetljivost ovih organizama na testirane cijanobakterijske ekstrakte, koji su delovali u nižim koncentracijama u odnosu na *A. salina* bioesej. U oba bioeseja toksičnost su ispoljili sojevi *Nostoc* LC1B sa registrovanim LC₅₀ vrednostima (48 h) od 66,4 µg/mL (*D. magna*) i 87 µg/mL (*D. rerio*) i *Nostoc* S8 sa LC₅₀ vrednostima (48 h) od 110 µg/mL (*D. magna*) i 43,7 µg/mL (*D. rerio*). Soj *Nostoc* 2S1 je takođe ispoljio toksičnost u bioeseju *D. magna* (LC₅₀=102 µg/mL), dok su na embrione *D. rerio* toksičnost ispoljili sojevi *Anabaena* Č5 (LC₅₀=31,7 µg/mL) i *Nostoc* 2S3B (LC₁₀₀=50 µg/mL), koji je pri koncentraciji od 100 µg/mL izazvao 100% mortalitet. Dozno-zavisne krive ekstrakata koji su ispoljili toksičnost u bioesejima *D. magna* i *D. rerio* date su u Prilozima 2 i 3. Sa druge strane, ni jedan soj nije ispoljio značajnu citotoksičnost na riblju ćelijsku liniju RTL-W1.

Vrsta *Daphnia magna* je najčešći model organizam slatkovodnih beskičmenjaka koji se u velikoj meri koristi za proučavanje ekotoksičnosti zbog relativno visoke osetljivosti na toksikante, brze reprodukcije i kratkog životnog ciklusa (Smutná i sar., 2014). U mreži ishrane, rod *Daphnia* ima centralnu poziciju (Lampert, 2006). Međutim, većina vrsta ovog roda je osetljiva na toksine cijanobakterija u koncentracijama preko 10 µg/mL, zbog čega nisu pogodne za detekciju mikrocistina i nodularina u nižim koncentracijama (Agrawal i sar., 2012). U istraživanju koje su sprovedeli Smutná i sar. (2014) testiranjem uzoraka cvetajućih cijanobakterija na vrsti *D. magna*., koristeći vodene ekstrakte u opsegu koncentracija od 0 do 405 µg/mL, naročito visoka akutna toksičnost je detektovana u uzorku vrste *Anabaena spiroides* sa EC₅₀ od 118 µg/mL i uzorku sa 2 soja roda *Microcystis* (vrste *M. aeruginosa* i *M. wesenbergii*) sa EC₅₀ od 126,3 µg/mL. Štaviše, ova grupa autora je utvrdila da su efekti u akutnim i hroničnim testovima bili nezavisni od sadržaja mikrocistina i istakli značaj drugih toksičnih komponenti u registrovanju ukupne toksičnosti uzoraka na vrstu *D. magna*. U poređenju sa rezultatima ovih autora, sojevi *Nostoc* LC1B, S8 i 2S1 su ispoljili veću akutnu toksičnost u bioeseju *D. magna*.

Embrion vrste *Danio rerio* predstavlja važan model u analizi razvića kičmenjaka, koji se primenjuje u istraživanju toksičnih agenasa koji inhibiraju ili interferiraju sa procesima razvića (razvojni toksini), uključujući jedinjenja koja imaju potencijalan značaj i za zdravlje ljudi i životnu sredinu, kao i za biomedicinu. Ovaj sistem se sve više primenjuje za proučavanje toksina mikroorganizama, i kao akvatični organizam sve više se koristi u

istraživanjima toksina marinskih i slatkovodnih mikroalgi (Berry i sar., 2007). Rezultati dobijeni sa embrionima vrste *D. rerio* u ovoj tezi pokazuju osetljivost ovih organizama na testirane cijanobakterijske ekstrakte, koji su delovali u niskim koncentracijama, pri čemu je aktivnost registrovana kod 3 soja roda *Nostoc* i 1 soja roda *Anabaena*. U istraživanju koje su sprovedeli Berry i sar. (2007), oko 17% testiranih sojeva cijanobakterija je produkovalo jedinjenja koja inhibiraju razvoj embriona zebrica, pri čemu je najviše aktivnih sojeva pripadalo upravo rodu *Nostoc*. Ovi autori su registrovali inhibiciju embriogeneze u različitim stadijumima razvika, pri čemu su naročito visoku toksičnost utvrdili kod ekstrakta soja *Oscillatoria* 48-3 koji je izazvao 100% mortalitet embriona jedan dan nakon fertilizacije (24 h) pri koncentraciji od 50 µg/mL, dok je ekstrakt soja *Fischerella* 52-1 izazvao 100% mortalitet 2-3 dana nakon fertilizacije (48-72 h). U poređenju sa rezultatima ovih autora, može se zaključiti da je naročito soj *Nostoc* 2S3B koji je u ovom istraživanju ispoljio 100% mortalitet pri koncentraciji od 50 µg/mL veoma toksičan. Visoka toksičnost je takođe zabeležena kod ekstrakata vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* i *Aphanizomenon ovalisporum* kod kojih je nakon ekspozicije od 24 h 100% mortalitet registrovan kod 2 izolata pri koncentraciji od 14,3 µg/mL, a kod većine pri 71,5 i 143 µg/mL, dok je nakon 48 h pri koncentraciji od 71,5 µg/mL 100% embriona eksponiranih skoro svim ekstraktima bilo mrtvo ili deformisano (Berry i sar., 2009). Rezultati ovih autora su takođe ukazali da je cijanotoksin cilindrospermopsin letalan za embrione zebrice, ali da kod testiranih sojeva specifične razvojne puteve inhibiraju i drugi metaboliti.

Kao što je spomenuto, ne postoji bioesej kojim se mogu detektovati svi cijanotoksini. Maršalek i Blaha (2004) su poredili toksičnost dva cijanobakterijska uzorka u 17 bioeseja i nakon 48 h detektovali veću toksičnost u bioeseju *A. salina* u poređenju sa *D. magna* (LC₅₀ 3,57/6,4 mg/mL u toksičnijem uzorku i 5/6 mg/mL u manje toksičnom uzorku), dok su u uzorku koji nije sadržao mikrocistin-LR registrovali obrnut odgovor (LC₅₀ 31,9/9,9 mg/mL). Sa druge strane, u nekim istraživanjima registrovana je veća osetljivost u bioeseju *Daphnia pulex* u poređenju sa bioesejom *A. salina* (Kyselkova i Maršalek, 2000; Maršalek i Blaha, 2004), dok su Asselman i sar. (2014) pokazali efekat na preživljavanje vrste *D. magna*, ali ne i vrste *D. pulex*. Ferrão-Filho i sar. (2014) su istakli da različite vrste kladocera pokazuju različite odgovore na različite cijanotoksine.

Kao što se može videti iz rezultata, toksičnost cijanobakterija u bioesejima zavisila je od tipa korišćenog ekstrakta. Tako je u istraživanju Berry i sar. (2007) lipofilna frakcija (CHCl₃) bila znatno aktivnija na embrione *D. rerio* u poređenju sa etanolskom. U istraživanju Lopes i sar. (2010) vodeni ekstrakti su ispoljili toksičnost u bioeseju *A. salina* za razliku od metanolnih ekstrakata, dok su Frazao i sar. (2010) registrovali sličnu toksičnost vodenih, metanolnih i dihlorometanskih ekstrakata. Sa druge strane, i visoke koncentracije različitih jedinjenja poput proteina, organskih kiselina, jona i dr. u sirovim ekstraktima mogu uticati na fizičko-hemijske karakteristike test medijuma, tako da toksičnost ne mora biti povezana striktno sa cijanotoksinama (Maršalek i Blaha, 2000), dok bi i smeša različitih jedinjenja

prisutnih u sirovim ekstraktima mogla da ostvari sinergistički toksični efekat (Martins i sar., 2007; Hisem i sar., 2011).

Poređenjem rezultata dobijenih u korišćenim bioesejima, može se uočiti da je na toksične supstance prisutne u ekstraktima testiranih cijanobakterija najmanje osetljiva bila vrsta *A. salina*, kod koje je registrovana osetljivost u većim koncentracijama u poređenju sa neonatama vrste *D. magna* i embrionima vrste *D. rerio* kod kojih je registrovana osetljivost reda veličine nekoliko desetina mikrograma, tj. ova da test organizma su pokazali veću osetljivost prema testiranim ekstraktima sojeva. Takođe se može uočiti da su svi sojevi kod kojih su registrovane LC_{50} vrednosti, izuzev sojeva *Anabaena* Č2 i *Anabaena* Č5, ispoljili toksičnost u najmanje dva bioeseja. Dobijeni rezultati ukazuju da bi najtoksičniji sojevi mogli biti *Nostoc* S8 i *Nostoc* LC1B, koji su ispoljili toksičnost u sva tri bioeseja. Ipak, u cilju biotehnološke upotrebe biomase cijanobakterijskih sojeva potrebno je uraditi frakcionisanje ekstrakata i specifičnije analize za detekciju prisutnih cijanotoksina, dok bi se za sojeve kod kojih u opsegu testiranih koncentracija ekstrakata nisu utvrđene LC_{50} vrednost, trebalo ponoviti testiranje sa širim koncentracijskim opsegom ekstrakata u cilju preciznijeg utvrđivanja da li su sojevi netoksični ili ipak produkuju toksine, ali sa nižim sadržajem u biomasi.

2) Toksičnost sojeva cijanobakterija detektovana u enzimskim esejima

Osim bioeseja, vrlo često se u cilju utvrđivanja toksičnosti cijanobakterija koriste i različiti enzimski eseji. Produkcija hepatotoksina i neurotoksina testiranih cijanobakterijskih sojeva određena je primenom eseja za određivanje inhibicije enzima protein fosfataze 1 (PP1) i acetilholinesteraze (AChE). U Tabeli 21 prikazane su izračunate inhibitorne koncentracije testiranih metanolnih ekstrakata. Produkcija hepatotoksina i neurotoksina ispitanih cijanobakterijskih sojeva određena je nakon kultivacije u azotofiksirajućim uslovima.

Inhibicija PP1 enzima je registrovana jedino kod sojeva *Nostoc* LC1B i *Nostoc* S8. Ipak, ni kod jednog soja nije registrovana IC_{50} vrednost, dok je kod sojeva *Nostoc* LC1B i *Nostoc* S8 registrovana IC_{25} vrednost od 332,32 $\mu\text{g/mL}$ i 430,14 $\mu\text{g/mL}$. Kod 4 soja (*Nostoc* 2S7B i 2S3B, *Anabaena* Č2 i Č5) inhibicija PP1 enzima je bila manja od 25%, dok kod ostala 4 soja (*Nostoc* 2S9B i 2S1, *Spirulina* S1 i S2) nije uočen nikakav efekat. Dobijena inhibicija svih testiranih ekstrakata u PP1 testu je bila značajno slabija u poređenju sa inhibicijom enzima u slučaju čistog toksina mikrocistina-LR ($IC_{50}=0,173 \mu\text{g/L}$) koji je služio kao pozitivna kontrola. Takvi rezultati jasno pokazuju da testirani sojevi cijanobakterija nisu ispoljili značajniji nivo inhibicije enzima PP1.

Tabela 21. IC₂₅ vrednosti cijanobakterijskih sojeva u enzimskim esejima

Cijanobakterijski soj	PP1 test IC ₂₅ (µg/mL)	AChE test IC ₂₅ (mg/mL)
<i>Nostoc</i> 2S7B	-	-
<i>Nostoc</i> 2S9B	-	0,50 ± 0,14
<i>Nostoc</i> 2S3B	-	-
<i>Nostoc</i> 2S1	-	1,82 ± 0,13
<i>Nostoc</i> S8	430,14	-
<i>Nostoc</i> LC1B	332,32	-
<i>Anabaena</i> Č2	-	2,70 ± 0,06
<i>Anabaena</i> Č5	-	0,58 ± 0,10
<i>Spirulina</i> S1	-	1,93 ± 0,13
<i>Spirulina</i> S2	-	1,46 ± 0,11

PP1 esej je vrlo efikasan i selektivan u detekciji hepatotoksina koji predstavljaju visoko specifične inhibitore protein fosfataza (Yoshizawa i sar., 1990). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na mogućnost produkcije toksičnih jedinjenja tipa hepatotoksina kod sojeva *Nostoc* LC1B i *Nostoc* S8, ali u niskim koncentracijama. Ipak, s obzirom da sve varijante hepatotoksina, naročito mikrocistina, inhibiraju enzime protein fosfataze, ali sa različitom efikasnošću, ovom metodom se ne može odrediti koje su varijante ovih toksina (MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-YR i dr.) potencijalno prisutne u testiranim uzorcima (Simeunović, 2009).

U testu inhibicije enzima AChE 6 sojeva je izazvalo inhibiciju enzima, u dozno-zavisnom trendu. Takođe ni kod jednog soja nije registrovana IC₅₀ vrednost, dok su IC₂₅ vrednosti bile u opsegu od 0,50 ± 0,14 mg/mL kod soja *Nostoc* 2S9B koji je ispoljio najveću sposobnost inhibicije enzima AChE do 2,70 ± 0,06 mg/mL kod soja *Anabaena* Č2 koji je ispoljio najmanju sposobnost inhibicije enzima AChE. Kod ostala 4 soja (*Nostoc* 2S7B, 2S3B, S8 i LC1B) inhibiciju enzima AChE je bila manja od 25% pri najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakta. Registrovana inhibicija AChE svih testiranih cijanobakterijskih sojeva je bila slabija u poređenju sa pozitivnom kontrolom, donepezilom (99,27%).

U skriningu 54 sojeva roda *Nostoc* koji su sproveli Zelik i sar. (2009), većina ispitanih sojeva nije pokazala inhibiciju AChE - samo 15 ekstrakata je pokazalo antiacetilholinesteraznu aktivnost, pri čemu je značajna inhibitorna aktivnost od 65,3% - 96,6% utvrđena kod 4 soja, umerena inhibitorna aktivnost od 29% - 38% kod 4 soja, a slaba inhibitorna aktivnost od 10,2% - 19% kod 7 sojeva. U poređenju sa rezultatima ove grupe autora, koji su takođe koristili metanolne ekstrakte u koncentraciji od 3 mg/mL, kod sojeva ispitanim u ovoj tezi pri koncentraciji od 2,73 mg/mL visoku inhibiciju AChE nije pokazao ni

jedan soj, dok je umerenu inhibitornu aktivnost pokazalo 5 sojeva (*Nostoc* 2S9B i 2S1, *Spirulina* S1 i S2 i *Anabaena* Č5) sa inhibicijom od 30% - 40%. Cijanobakterijski sojevi sa registrovanom anti-AChE aktivnošću koji su identifikovani u ovom istraživanju su značajni sa toksikološkog, ali i farmakološkog aspekta u pogledu produkcije inhibitora AChE kao potencijalnih agenasa za lečenje Alchajmerove bolesti. Poznato je da anatoksin-a(s) deluje kao potentni ireverzibilni inhibitor AChE. Vezivanje antiacetilholinesteraznog jedinjenja i enzima može da bude reverzibilno ili ireverzibilno, pri čemu se potencijalnim lekovima u terapiji smatraju samo ona jedinjenja koja formiraju reverzibilne veze (Nair i sar., 2004). U istraživanju koje su sprovedi Carvalho i sar. (2013), sojevi rodova *Calothrix*, *Tolypothrix*, *Phormidium* i *Geitlerinema* pokazali su *in vitro* antiacetilholinesteraznu aktivnosti i kod miševa uzrokovali sistemske efekte slične onima opisanim za antiholinesterazne lekove, pri čemu su kod većina ekstrakata bili reverzibilnog karaktera, ukazujući na potencijal cijanobakterija za produkciju ovih jedinjenja. Ipak, nemoguće je predvideti da li je AChE inhibitorna aktivnost sirovog ekstrakta rezultat prisustva visoko aktivnog jedinjenja pri veoma niskoj koncentraciji ili manje potentnog inhibitora prisutnog u većoj koncentraciji (Zelík i sar., 2009). U tom pogledu, kod sojeva sa najvećom registrovanom AChE inhibicijom u ovom istraživanju, naročito *Spirulina* S1 i S2 i *Nostoc* 2S9B, bi se trebalo uraditi fracionisanje ekstrakata u cilju hemijske karakterizacije i detekcije jedinjenja odgovornih za ispoljenu aktivnost.

5.9. REZULTATI ODREĐIVANJA SOJEVA SA NAJVEĆIM BIOTEHNOLOŠKIM POTENCIJALOM

Prilikom određivanja sojeva sa najvećim biotehnološkim potencijalom korišćena su dva prethodno opisana metoda višekriterijumske analize: AHP i SAW. Metod AHP je korišćen u grupnom kontekstu za određivanje težina definisanih kriterijuma, dok je metod SAW korišćen za konačno rangiranje sojeva (alternativa) na osnovu prethodno dobijenih težina kriterijuma i dobijenih rezultata laboratorijskih analiza. Na početku AHP metoda, tri izabrana eksperta (EX1, EX2 i EX3) su u parovima poredili deset definisanih kriterijuma koristeći Satijevu skalu relativnog značaja. Kriterijumi i njihove skraćenice su sledeći:

1. Produkcija biomase (X_{\max})
2. Sadržaj fikocijanina (PC)
3. Sadržaj alofikocijanina (APC)
4. Sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA)
5. Sadržaj γ -linolenske kiseline (GLA)
6. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC)
7. Antioksidativna aktivnost (DPPH)
8. Antioksidativna aktivnost (FRAP)
9. Antibakterijska aktivnost (BAKT)
10. Antikancerogena aktivnost (KANC)

U Tabelama 22-24 su data individualna vrednovanja eksperata pomoću metoda AHP.

Tabela 22. Vrednovanje EX1

	X_{\max}	PC	APC	PUFA	GLA	TPC	DPPH	FRAP	BAKT	KANC
X_{\max}	1	1/3	1/3	1/7	1/7	1/3	1/3	1/3	1/2	1/7
PC		1	1	1/5	1/3	1/3	1	1	1/3	1/5
APC			1	1/7	1/5	1/5	1	1	1/3	1/5
PUFA				1	1	5	3	3	1	1/3
GLA					1	5	3	3	1	1/3
TPC						1	1	1	1	1/5
DPPH							1	1	1	1/2
FRAP								1	1	1/2
BAKT									1	1/3
KANC										1

Tabela 23. Vrednovanje EX2

	X_{\max}	PC	APC	PUFA	GLA	TPC	DPPH	FRAP	BAKT	KANC
X_{\max}	1	3	3	2	2	3	3	3	3	1
PC		1	1	1/2	1/2	2	1	1	1	1/3
APC			1	1/2	1/2	1	1	1	1	1/4
PUFA				1	1	3	2	2	3	1/4
GLA					1	3	3	3	3	1/3
TPC						1	1/2	1/2	1	1/5
DPPH							1	1	1	1/5
FRAP								1	1	1/5
BAKT									1	1/5
KANC										1

Tabela 24. Vrednovanje EX3

	X_{\max}	PC	APC	PUFA	GLA	TPC	DPPH	FRAP	BAKT	KANC
X_{\max}	1	1	3	7	5	9	7	7	3	3
PC		1	3	9	9	9	7	7	3	3
APC			1	9	9	9	7	7	3	3
PUFA				1	1	1	1	1	1	1
GLA					1	1	1	1	1	1
TPC						1	1	1	1	1
DPPH							1	1	1	1
FRAP								1	1	1
BAKT									1	1
KANC										1

Na osnovu vrednovanja iz Tabela 22-24, određene su individualne težine kriterijuma (Tabela 25). EX1 i EX2 su kao najvažniji identifikovali kriterijum Antikancerogena aktivnost (KANC) dodeljujući mu težine 0,261 i 0,263. EX3 je na prvo mesto stavio kriterijum Sadržaj fikocijanina (PC) sa težinom 0,272. EX1 je na poslednje mesto rangirao kriterijum Produkcija biomase (X_{\max}), dok su EX2 i EX3 smatrali da kriterijumu Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC) treba dodeliti najmanju težinu (0,042 i 0,034). Konačno, u poslednjem redu Tabele 25 se nalaze grupne težine kriterijuma dobijene aritmetičkim osrednjavanjem individualnih težina (pri čemu su svi EX imali jednake težine). U grupnom kontekstu najveću težinu je dobio kriterijum Antikancerogena aktivnost (KANC) (0,191), na drugom mestu je kriterijum Produkcija biomase (X_{\max}) sa težinom 0,153, dok je poslednje rangiran kriterijum Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC) sa težinom 0,050.

Tabela 25. Individualne težine kriterijuma dobijene vrednovanjem EX i konačne-grupne težine kriterijuma

	X_{\max}	PC	APC	PUFA	GLA	TPC	DPPH	FRAP	BAKT	KANC
EX1	0,023 ⁻	0,044	0,039	0,177	0,162	0,074	0,063	0,063	0,093	0,261 ⁺
EX2	0,184	0,061	0,055	0,110	0,123	0,042 ⁻	0,056	0,056	0,050	0,263 ⁺
EX3	0,252	0,272 ⁺	0,201	0,035	0,036	0,034 ⁻	0,036	0,036	0,049	0,049
Grupne težine	0,153	0,126	0,098	0,107	0,107	0,050 ⁻	0,052	0,052	0,064	0,191 ⁺

Prethodno dobijene grupne težine kriterijuma iz Tabele 25 zajedno sa rezultatima laboratorijskih analiza sojeva za svaki naveden kriterijum predstavljaju ulazne podatke za metod SAW (Tabela 26) koji treba da omogući rangiranje analiziranih sojeva. U Tabeli 26 treba obratiti pažnju da su osam kriterijuma maksimizaciona dok su dva kriterijuma minimizaciona (DPPH i KANC).

Tabela 26. Početna matrica odlučivanja za metod SAW

	x_{\max}	PC	APC	PUFA	GLA	TPC	DPPH	FRAP	BAKT	KANC
Tip krit.	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>min</i>
Tež. krit.	0,153	0,126	0,098	0,107	0,107	0,050	0,052	0,052	0,064	0,191
<i>Nostoc</i> 2S7B	1,17	13,13	8,29	40,02	0	701,69	0,11	12,23	+ (1)	58,6
<i>Nostoc</i> 2S9B	0,82	7,97	6,00	44,04	0	139,70	4,71	10,22	- (0)	534
<i>Nostoc</i> 2S3B	1,05	1,96	2,76	57,55	13,16	50,83	9,47	9,44	- (0)	155,1
<i>Nostoc</i> 2S1	0,53	28,92	13,70	43,40	0	77,78	1,39	13,69	+ (1)	182,52
<i>Nostoc</i> S8	0,85	13,67	7,11	48,22	0	119,35	0,06	11,34	- (0)	73,56
<i>Nostoc</i> LC1B	2,37	22,23	20,30	39,96	0	63,86	0,04	11,38	- (0)	37,76
<i>Anabaena</i> Č2	0,91	21,71	11,73	53,51	0	14,86	0,11	12,30	+ (1)	107,84
<i>Anabaena</i> Č5	1,00	25,63	13,89	43,05	0	19,48	0,12	12,89	+ (1)	107,38
<i>Spirulina</i> S1	3,95	38,63	34,43	52,81	33,78	24,05	0,12	21,01	+ (1)	90,98
<i>Spirulina</i> S2	2,10	18,53	26,34	53,37	31,10	24,05	0,10	15,14	+ (1)	125,58

Nakon pretvaranja minimizacionih kriterijuma u maksimizacione (uzimanjem njihovih recipročnih vrednosti) i nakon normalizacije početne matrice odlučivanja (Tabela 26) dobija se normalizovana matrica odlučivanja gde su svi kriterijumi maksimizacioni (Tabela 27). Normalizacija je izvršena da bi vrednosti kriterijuma bile uporedive.

Na kraju, množenjem normalizovanih vrednosti iz Tabele 27 sa pripadajućim težinama kriterijuma i njihovim sabiranjem, dobijene su težine analiziranih sojeva i njihovo rangiranje (Tabela 28).

Tabela 27. Normalizovana matrica odlučivanja u kojoj su svi kriterijumi maksimizacioni

x_{max}	PC	APC	PUFA	GLA	TPC	DPPH	FRAP	BAKT	KANC	
Tip krit.	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	<i>max</i>	
Tež. krit.	0,153	0,126	0,098	0,107	0,107	0,050	0,052	0,052	0,064	0,191
<i>Nostoc</i> 2S7B	0,079	0,068	0,057	0,084	0,000	0,568	0,104	0,094	0,167	0,157
<i>Nostoc</i> 2S9B	0,056	0,041	0,042	0,093	0,000	0,113	0,002	0,079	0,000	0,017
<i>Nostoc</i> 2S3B	0,071	0,010	0,019	0,121	0,169	0,041	0,001	0,073	0,000	0,059
<i>Nostoc</i> 2S1	0,036	0,150	0,095	0,091	0,000	0,063	0,008	0,106	0,167	0,051
<i>Nostoc</i> S8	0,058	0,071	0,049	0,101	0,000	0,097	0,190	0,087	0,000	0,125
<i>Nostoc</i> LC1B	0,161	0,116	0,140	0,084	0,000	0,052	0,286	0,088	0,000	0,244
<i>Anabaena</i> Č2	0,062	0,113	0,081	0,112	0,000	0,012	0,104	0,095	0,167	0,085
<i>Anabaena</i> Č5	0,068	0,133	0,096	0,090	0,000	0,016	0,095	0,099	0,167	0,086
<i>Spirulina</i> S1	0,268	0,201	0,238	0,111	0,433	0,019	0,095	0,162	0,167	0,101
<i>Spirulina</i> S2	0,142	0,096	0,182	0,112	0,398	0,019	0,114	0,117	0,167	0,073

Tabela 28. Težine sojeva i njihovo rangiranje

Vrsta soja	Težina soja	Rang soja
<i>Nostoc</i> 2S7B	0,115	4
<i>Nostoc</i> 2S9B	0,041	10
<i>Nostoc</i> 2S3B	0,062	9
<i>Nostoc</i> 2S1	0,073	8
<i>Nostoc</i> S8	0,077	7
<i>Nostoc</i> LC1B	0,131	3
<i>Anabaena</i> Č2	0,082	6
<i>Anabaena</i> Č5	0,084	5
<i>Spirulina</i> S1	0,192	1*
<i>Spirulina</i> S2	0,144	2

Primenom metoda višekriterijumske analize (AHP i SAW) najveću težinu 0,192 je dobio soj *Spirulina* S1 koji je u višekriterijumskom kontekstu najbolje rangirana alternativa (soj). Na drugom mestu je soj *Spirulina* S2 (0,144), na trećem soj *Nostoc* LC1B (0,131), dok je soj *Nostoc* 2S9B na poslednjem (desetom) mestu sa težinom 0,041. Treba imati u vidu da su pri ovoj analizi u obzir uzimane vrednosti navedenih kriterijuma dobijene u kontroli, kao i da nije uzimana u obzir toksičnost sojeva. Stoga bi pre donošenja konačne odluke prvenstveno trebala biti ispitana toksičnost dodatnim specifičnijim metodama. Sa druge strane, rezultati produkcije biomase i fikobiliproteinskih pigmenata primenom različitih uslova kultivacije bi mogli ukazati primenom kog faktora bi se kod određenih sojeva mogao povećati biotehnoški potencijal.

6. ZAKLJUČAK

1. Produkcija biomase kod svih ispitivanih cijanobakterijskih sojeva zavisila je od primenjenih uslova kultivacije. Među ispitanim faktorima, u pravcu stimulacije produkcije biomase naročito su delovali kontinualno osvetljenje i glicerol, pri čemu je kod sojeva roda *Spirulina* produkcija biomase bila jače stimulirana kontinualnim osvetljenjem, a kod azotofiksirajućih sojeva rodova *Nostoc* i *Anabaena* organskim izvorima ugljenika. Kao soj sa najvećim potencijalom za proizvodnju biomase izdvaja se *Spirulina* S1, kod kog je registrovana najveća produkcija od 4,4 mg/mL u uslovima kontinualnog osvetljenja, što je bilo oko 4,5 puta više u odnosu na biomasu dobijenu u kontroli.
2. Testirani sojevi cijanobakterija predstavljaju značajan izvor fikobiliproteinskih pigmenata, na čiji kvalitativni i kvantitativni sadržaj su veliki uticaj imali uslovi kultivacije. Kod većine sojeva u testiranim uslovima prvenstveno su registrovani PC i APC. Najveći sadržaj ovih pigmenata utvrđen je u uslovima kontinualnog osvetljenja kod sojeva *Spirulina* S1 sa 103,9 µg/mL PC i 197,45 µg/mL APC (povećani 12 i 16 puta u poređenju sa kontrolom) i *Nostoc* 2S1 sa 100,5 µg/mL PC i 33,5 µg/mL APC. Primenom glukoze sadržaj fikobiliproteina je povećan kod šest sojeva, a primenom glicerola kod sedam sojeva. Kao sojevi sa najvećim potencijalom za produkciju ovih pigmenata izdvajaju se *Spirulina* S1, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* Č2 i *Spirulina* S2.
3. Masno kiselinski sadržaj cijanobakterijskih sojeva varirao je u zavisnosti od soja i od uslova kultivacije. Masne kiseline sa 16 i 18 ugljenikovih atoma su dominirale kod svih ispitivanih sojeva, od kojih su najzastupljenije bile palmitinska, palmitoleinska, oleinska, linolna, α -linoleinska i γ -linolenska. Kod svih sojeva izuzev *Nostoc* LC1B sadržaj polinezasićenih masnih kiselina bio je veći u odnosu na sadržaj zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, i kretao se u opsegu od 25,58% kod soja *Nostoc* 2S9B do 57,55% kod soja *Nostoc* 2S3B. Oba ispitana soja roda *Spirulina* su produkovala γ -linolensku kiselinu, dok su svi ispitani azotofiksirajućih sojevi rodova *Nostoc* i *Anabaena* produkovali α -linoleinsku kiselinu, pri čemu rezultati ukazuju na značaj azotofiksirajućih uslova kultivacije u cilju povećanja produkcije α -linoleinske kiseline. Samo kod dva soja *Nostoc* 2S1 i *Nostoc* S8 detektovana je eikozapentaenska kiselina. Dobijeni rezultati ukazuju na to da bi testirani sojevi cijanobakterija mogli predstavljati značajan izvor esencijalnih supstanci tipa masnih kiselina.
4. Kvalitativni i kvantitativni sadržaj fenolnih jedinjenja razlikovao se među rodovima, ali i među sojevima istog roda. Kod ispitivanih cijanobakterijskih sojeva detektovano

je ukupno 8 fenolnih jedinjenja: hinska kiselina, hlorogena kiselina, galna kiselina, katehin, epikatehin, rutin, kemferol i apiin, pri čemu su najzastupljenije komponente bile hinska kiselina i katehin. Najveći sadržaj detektovanih fenolnih jedinjenja zabeležen je kod soja *Nostoc* 2S7B sa 701,69 µg/g suve mase i sadržajem hinske kiseline od 594,43 µg/g suve mase, dok je najviše fenolnih jedinjenja (7) detektovano kod soja *Nostoc* 2S9B. Dobijeni rezultati takođe pokazuju značajan uticaj azotnih uslova kultivacije na produkciju fenolnih jedinjenja kod testiranih sojeva cijanobakterija.

5. Svi ispitivani sojevi cijanobakterija su ispoljili antioksidativnu aktivnost. IC₅₀ vrednosti ispitanih etanolnih ekstrakata u DPPH testu bile su u opsegu od 0,04 mg/mL za soj *Nostoc* LC1B koji je ispoljio najveću sposobnost „hvatanja“ DPPH radikala, do 9,47 mg/mL za soj *Nostoc* 2S9B koji je ispoljio najnižu aktivnost. Redukcioni potencijal određen primenom FRAP testa se statistički značajno razlikovao među pripadnicima različitih rodova i bio je najveći kod sojeva roda *Spirulina*. Najveći redukcioni potencijal je registrovan kod ekstrakta soja *Spirulina* S1 sa 21,01 mg AAE/g, dok je najmanji redukcioni potencijal registrovan u ekstraktu soja *Nostoc* 2S3B sa 8,36 mg AAE/g. Statističkom analizom pokazano je da detektovani fenoli nisu bili glavni nosioci antioksidativne aktivnosti testiranih ekstrakata cijanobakterija, osim u slučaju sojeva kultivisanih u neazotofiksirajućim uslovima u FRAP testu. Relativnim poređenjem rezultata registrovane antioksidantne aktivnosti u dva korišćena testa, kao sojevi sa najvećim antioksidantnim potencijalom izdvajaju se *Spirulina* S1 i *Spirulina* S2.
6. Antibakterijska aktivnost intracelularnih metanolnih ekstrakata detektovana je kod 6 cijanobakterijskih sojeva: *Nostoc* 2S7B, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* Č2, *Anabaena* Č5, *Spirulina* S1 i *Spirulina* S2. Sojevi *Anabaena* Č2, *Nostoc* 2S7B i *Nostoc* 2S1 su ispoljili najjaču aktivnost, delujući inhibitorno na četiri bakterijska soja (*S. enteritidis* ATCC 13076, *E. faecalis* ATCC 19433, *P. aeruginosa* ATCC 9027 i *B. subtilis* ATCC 6633). Metanolni ekstrakti pokazali su veću efikasnost u odnosu na DMSO ekstrakte. Najosetljiviji na delovanje ekstrakata bili su bakterijski sojevi *S. enteritidis* ATCC 13076 i *E. faecalis* ATCC 19433 na koje je antibakterijsku aktivnost ispoljilo šest cijanobakterijskih sojeva.
7. Primenom MTT testa pokazano je da svi ispitani cijanobakterijski sojevi ispoljavaju antikancerogenu aktivnost *in vitro* prema ćelijskoj liniji humanog hepatocelularnog karcinoma, HepG2. Uočena je dozno-zavisna citotoksična aktivnost jer se vijabilnost ćelija smanjivala sa povećanjem koncentracije testiranih ekstrakata. Registrovane LC₅₀ vrednosti su bile u opsegu od 37,76 µg/mL za soj *Nostoc* LC1B koji je pokazao

najveću aktivnost do 534 $\mu\text{g/mL}$ za soj *Nostoc* 2S9B koji je ispoljio najslabiju antikancerogenu aktivnost. Kod svih testiranih sojeva izuzev *Nostoc* 2S9B, LC_{50} vrednost je bila ispod 200 $\mu\text{g/mL}$, što u poređenju sa pozitivnom kontrolom ($\text{LC}_{50} = 19,49 \mu\text{g/mL}$) ukazuje na značajan citotoksičan efekat i potencijal produkcije antikancerogenih supstanci.

8. Ispitivanjem akutne toksičnosti intracelularnih ekstrakata u bioesejima (*A. salina*, *D. magna* i *D. rerio*) konstatovan je mali broj sojeva koji su ispoljili toksičnost na test organizme, što sa aspekta potencijalne biotehnoške primene sojeva ima veliki značaj. Bioesej *A. salina* pokazao se kao najmanje osetljiv, dok su se bioesej *D. magna* i DarT test pokazali kao osetljivije metode za detekciju ukupne toksičnosti cijanobakterijskih uzoraka. U slučaju detektovane toksičnosti uočena je doznavisnost, kao i vremenska zavisnost u ispoljavanju aktivnosti. Dobijeni rezultati ukazuju na najveću toksičnost sojeva *Nostoc* LC1B i *Nostoc* S8, koji su ispoljili toksičnost u sva tri bioeseja. Ispitivanjem toksičnosti *in vitro* u enzimskim esejima konstatovano je da je manji broj sojeva (2) inhibirao aktivnost enzima PP1 u odnosu na aktivnost enzima AChE (6 sojeva) ukazujući na mogućnost ovih sojeva da produkuju neurotoksine i/ili inhibitore AChE. Specifična osetljivost datih enzima prema testiranim ekstraktima sojeva može da ukaže na različit sadržaj toksičnih komponenti cijanobakterijskih sojeva. U cilju biotehnoške primene toksičnih jedinjenja potrebno je izvršiti specifičnije hemijske analize prisustva i identifikacije toksičnih produkata sojeva. Testirani sojevi cijanobakterija nisu ispoljili citotoksičnost *in vitro* na ćelijsku liniju RTL-W1.
9. Primenom metoda višekriterijumske analize (AHP i SAW) koje su korišćene za određivanje sojeva cijanobakterija sa najvećim biotehnoškim potencijalom u grupnom kontekstu, najveću težinu je dobio kriterijum Antikancerogena ativnost (KANC) (0,191), na drugom mestu je kriterijum Produkcija biomase (X_{max}) sa težinom 0,153, dok je poslednje rangiran kriterijum Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC) sa težinom 0,050. Najveću težinu 0,192 je dobio soj *Spirulina* S1 koji je u višekriterijumskom kontekstu najbolje rangirana alternativa (soj). Na drugom mestu je soj *Spirulina* S2 (0,144), na trećem soj *Nostoc* LC1B (0,131) dok je soj *Nostoc* 2S9B na poslednjem (desetom) mestu sa težinom 0,041.

7. LITERATURA

1. Abd El-Aty A. M., Mohamed A. A., Samhan F. A. (2014): In vitro antioxidant and antibacterial activities of two fresh water cyanobacterial species, *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena sphaerica*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4: 69-75.
2. Abd El-Baky H. H., El Baz F. K., El-Baroty G. S. (2009): Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *African Journal of Biotechnology* 8: 7059-7067.
3. Adarme Vega T. C., Lim D. K. Y., Timmins M., Vernen F., Li Y., Schenk P. M. (2012): Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories* 11: 96.
4. Agrawal M., Sulekha Y., Chanda P., Neelima R., Manish K. A. (2012): Bioassay methods to identify the presence of cyanotoxins in drinking water supplies and their removal strategies. *European Journal of Experimental Biology* 2: 321-336.
5. Agyei D., Danquah M. K., Sarethy I. P., Pan S. (2015): Antioxidative peptides derived from food proteins. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 417-430.
6. Ajayan K. V., Selvaraju M., Thirugnanamoorthy K. (2012): Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: an *in-vitro* study. *Biomass and bioenergy* 47: 436-441.
7. 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: 16-18.
8. Al-Hazzani A. A., Alshatwi A. A. (2011): Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 49: 3281–3286.
9. Ambrozova J. V., Misurcova L., Vicha R., Machu L., Samek D., Baron M., Mlcek J., Sochor J., Jurikova T. (2014): Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules* 19: 2344-2360.
10. An J., Carmichael W. W. (1994): Use of colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno sorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32: 1495-1507.
11. Andrade M. R., Costa J. A. V. (2007): Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* 264: 130–134.
12. Apeldoorn M. E., Van Egmond H. P., Speijers G. J., Bakker G. J. (2007): Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 7-60.
13. APHA (1992): Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
14. Asselman J., Hochmuth J. D., De Schamphelaere K. A. C. (2014): A comparison of the sensitivities of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* to six different cyanobacteria. *Harmful Algae* 39: 1–7.
15. Ayyappan S., Pandey B. K., Sarkar S., Saha D., Tripathy S. D. (1991): Potential of *Spirulina* as feed supplement for carp fry. pp. 86-88. In Proceedings of the National Symposium of Freshwater Aquaculture, CIFA, Bhubaneswar, India. Bhubaneswar, CIFA.
16. Babaoğlu Aydaş S., Ozturk S., Aslim B. (2013): Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chemistry* 136:164–169.
17. Babić O., Kovač D., Rašeta M., Šibul F., Svirčev Z., Simeunović J. (2016): Evaluation of antioxidant activity and phenolic profile of filamentous terrestrial cyanobacterial strains isolated from forest ecosystem. *Journal of Applied Phycology* 28: 2333-2342.
18. Banack S. A., Johnson H. E., Cheng R., Cox P. A. (2007): Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Marine drugs* 5: 180-196.
19. Barsanti L., Gualtieri P. (2006): Algae and men. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor and Francis Group, Florida, USA, 251-291.

20. Becker E. W. (1994): Microalgae: biotechnology and microbiology (Vol. 10). Cambridge University Press.
21. Becker E. W. (2007): Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207-210.
22. Behrens P. W., Kyle D. J. (1996): Microalgae as a source of fatty acids. *Journal of Food Lipids* 3: 259-272.
23. Bennett A., Bogorad L. (1973): Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
24. Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
25. Berry J. P., Gantar M., Gibbs P. D. L., Schmale M. C. (2007): The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 145: 61-72.
26. Berry J. P., Gibbs P. D., 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.
27. Bhandari R., Sharma P. K. (2006): High-light-induced Changes on Photosynthesis, Pigments, Sugars, Lipids and Antioxidant Enzymes in Freshwater (*Nostoc spongiaeforme*) and Marine (*Phormidium corium*) Cyanobacteria. *Photochemistry and photobiology* 82: 702-710.
28. Bhateja P., Mathur T., Pandya M., Fatma T., Rattan A. (2006): Activity of blue – green microalgae extracts against in vitro generated *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Phytoterapia* 77: 233-235.
29. Bhatnagar A., Chinnasamy S., Singh M., Das K. C. (2011): Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy* 88: 3425-3431.
30. Blagojević B. (2015): Minimizaciona odstupanja grupne od individualnih odluka primenom inteligentnih stohastičkih algoritama u problemima vodoprivrede i poljoprivrede. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
31. Bláha L., Babica P., Maršálek B. (2009): Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 36-41.
32. Blaženčić J. (2007): *Sistematika algi*. Beograd: NNK Internacional.
33. Bui T. N., Jansen R., Pham T. L., Mundt S. (2007): Carbamidocyclophanes A-E, chlorinated paracyclophanes with cytotoxic and antibiotic activity from the vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. *Journal of Natural Products* 70: 499-503.
34. Cannon D. (2009): From fish oil to microalgae oil a winwin shift for humans and our habitat. *Explore* 5: 299-303.
35. Cardozo K. H. M., Guaratini T., Barros M. P., Falcão V. R., Tonon A. P., Lopes N. P., Campos S., Torres M. A., Souza A. O., Colepicolo P., Pinto E. (2007): Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146: 60-78.
36. Carvalho L. R., Costa-Neves A., Conserva G. A. A., Brunetti R. L., Hentschke G. S., Malone C. F. S., Torres L. M. B., Sant'Anna C. L., Rangel M. (2013): Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23: 471-480.
37. Çelekli A., Topyürek A., Markou G., Bozkurt H. (2016): A multivariate approach to evaluate biomass production, biochemical composition and stress compounds of *Spirulina platensis* cultivated in wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180: 728-739.
38. Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D. (2009): Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Fascicula Biologie* 16: 43-48.
39. Chainapong T., Traichaiyaporn S., Deming R. L. (2012): Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural Technology* 8: 1593-1604.

40. Chaneva G., Furnadzhieva S., Minkova K., Lukavsky J. (2007): Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum* - a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology* 19: 537-544.
41. Cheirsilp B., Torpee S. (2012): Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology* 110: 510–516.
42. Chen A. Y., Chen Y. C. (2013): A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry* 138: 2099–2107.
43. Chen F., Zhang Y. (1997): High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology* 20: 221–224.
44. Chen T., Zheng W., Yang F., Bai Y., Wong Y. S. (2006): Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 103–107.
45. Chisti Y. (2007): Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294 – 306.
46. Chojnacka K., Noworyta A. (2004): Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 461–465.
47. CLSI (2007): Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventh Informational Supplement CLSI document M100-S17, Wayne, Pennsylvania, USA.
48. Codd G.A., Lindsay J., Young L.F., Morrison L.F., Metcalf J.S. (2005): Harmful Cyanobacteria. In: Harmful Cyanobacteria, 1-23. Springer Netherlands.
49. Colla L. M., Reinehr C. O., Reichert C., Costa J. A. V. (2007): Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology* 98: 1489–1493.
50. Costa M., Garcia M., Costa-Rodrigues J., Costa M. S., Ribeiro M. J., Fernandes M. H., Barros P., Barreiro A., Vasconcelos V., Martins R. (2014): Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese coast: high potential as a source of anticancer compounds. *Marine Drugs* 12: 98-114.
51. Custódio L., Justo T., Silvestre L., Barradas A., Vizetto Duarte C., Pereira H., Barreira L., Rauter A. P., Alberício F., Varela J. (2012): Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry* 131: 134-140.
52. Číž M., Čížová H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., Lojek A. (2010): Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control* 21: 518–523.
53. Danesi E. D. G., Rangel-Yagui C. D. O., De Carvalho J. C. M., Sato S. (2002): An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy* 23: 261-269.
54. De Chazal N. M., Smith G. D. (1994): Characterization of a brown *Nostoc* species from Java that is resistant to high light intensity and UV. *Microbiology* 140: 3183-3189.
55. De Philippis R., Sili C., Paperi R., Vincenzini M. (2001): Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *Journal Applied Phycology* 13: 293-299.
56. Del Campo J. A., García González M., Guerrero M. G. (2007): Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 1163–1174.
57. Diplock A. T., Agget P. J., Ashwell M., Bornet F., Fern E. B., Roberfroid M. B. (1999): Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition* 81: 1–27.
58. Douma M., Loudiki M., Oudra B., Mouhri K., Ouahid Y., Del Campo F. F. (2009): Taxonomic diversity and toxicological assessment of cyanobacteria in Moroccan inland waters. *Journal of Water Science*, 22: 435-449.
59. Dussault D., Vu K. D., Vansach T., Horgen F. D., Lacroix M. (2016): Antimicrobial effects of marine algal extracts and cyanobacterial pure compounds against five foodborne pathogens. *Food Chemistry* 199: 114–118.

60. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88–95.
61. El-Sheekh M. M., Osman M. E. H., Dyab M. A., Amer M. S. (2006): Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21: 42–50.
62. Espin J. C., Soler-Rivas C., Wichers H. J. (2000): Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 648–656.
63. Eussen S., Klungel O., Garssen J., Verhagen H., van Kranen H., van Loveren H., Rompelberg C. (2010): Support of drug therapy using functional foods and dietary supplements: focus on statin therapy. *Br. J. Nutr.* 103: 1260–1277.
64. Feng X., Bandyopadhyay A., Berla B., Pagec L., Wu B., Pakrasi H. B., Tang Y. J. (2010): Mixotrophic and photoheterotrophic metabolism in *Cyanothece* sp. ATCC 51142 under continuous light. *Microbiology* 156: 2566–2574.
65. Ferrão-Filho A.S., Galvão L. E. C., Magalhães V. F. (2014): Differential susceptibility of cladoceran species to a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 9: 33–41.
66. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–509.
67. Forman E., Peniwati K. (1998): Aggregating individual judgments and priorities with the analytic hierarchy process. *European Journal of Operational Research* 108: 165–169.
68. Frazão B., Martins R., Vasconcelos V. (2010): Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous North Atlantic marine cyanobacteria? *Marine Drugs* 8: 1908–1919.
69. Freile-Pelegrín Y., Robledo D. (2013): Bioactive phenolic compounds from algae. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*, 113–129.
70. Gantar M., Svirčev Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *Journal of Phycology* 44: 260–268.
71. Gantar M., Simović D., Djilas S., Gonzalez W. W., Miksovská J. (2012): Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. *Journal of Biotechnology* 159: 21–26.
72. Glazer A. N. (1988): Phycobilisomes. *Methods in Enzymology* 167: 304–312.
73. Goiris K., Muylaert K., Fraeye I., Foubert I., De Brabanter J., De Cooman L. (2012): Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24: 1477–1486.
74. Gouveia L., Batista A. P., Sousa I., Raymundo A., Bandarra N. M. (2008): Microalgae in novel food products. In K. Papadopoulos, *Food Chemistry Research Developments* (pp. 1–35). New York: Nova Science Publishers.
75. Grossman A. R., Bhaya D., He Q. (2001): Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *Journal of Biological Chemistry* 276: 11449–11452.
76. Grünwald J., Marahiel M. A. (2006): Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 121–146.
77. Gubić J. (2016): Profil proteina i sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije. *Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad*.
78. Guedes A. C., Amaro H. M., Barbosa C. R., Pereira R. D., Malcata F. X. (2011): Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* 44: 2721–2729.
79. Guedes A. C., Barbosa C. R., Amaro H. M., Pereira C. I., Malcata F. X. (2011): Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 862–870.

80. Guedes A., Gião M. S., Seabra R., Ferreira A. C., Tamagnini P., Moradas-Ferreira P., Malcata F. X. (2013): Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine drugs* 11: 1256-1270.
81. Gutierrez R. M. P., Flores A. M., Solis R. V., Jimenez J. C. (2008): Two new antibacterial norbietenone diterpenoids from cyanobacterium *Microcoleus lacustris*. *J. Nat. Med.* 62: 328–331.
82. Hajimahmoodi M., Faramarzi M. A., Mohammadi N., Soltani N., Oveisi M. R., Nafissi-Varcheh N. (2010): Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22: 43–50.
83. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* 186: 1-85.
84. Hasan M. R., Chakrabarti R. (2009): Use of algae and aquatic macrophytes as feed in smallscale aquaculture: a review. In *Bulletin: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, No. 531. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
85. Hemlata, Fatma T. (2009): Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 83: 509-515.
86. Hirata K., Takashina J., Nakagami H., Ueyama S., Murakami K., Kanamori T., Miyamoto K. (1996): Growth inhibition of various organisms by a violet pigment, nostocine A, produced by *Nostoc spongiaeforme*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 1905-1906.
87. Hisem D., Hrouzek P., Tomek P., Tomsíková J., Zapomelová E., Skácelová K., Lukesová A., Kopecký J. (2011): Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon* 57: 76–83.
88. Hoffmann D., Hevel J. M., Moore R. E., Moore B. S. (2003): Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene* 311: 171-180.
89. Hwang C. L., Yoon K. S. (1981): *Multiple attribute decision making: methods and applications*. Springer, Berlin.
90. Ijaz S., Hasnain S. (2016): Antioxidant potential of indigenous cyanobacterial strains in relation with their phenolic and flavonoid contents. *Natural Product Research* 30: 1297-1300.
91. ISO 6341 (1996): Water quality—determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Acute toxicity test. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.
92. Jacob-Lopes E., Scoparo C. H. G., Lacerda L. C. M. F., Franco T. T. (2009): Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing* 48: 306–310.
93. Jaki B., Heilmann J., Sticher O. (2000): New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). *Journal of Natural Products* 63: 1283-1285.
94. Jaki B., Orjala J., Sticher O. (1999): A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Natural Products* 62: 502-503.
95. Jones A. C., Gu L., Sorrels C. M., Sherman D. H., Gerwick W. H. (2009): New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 13: 216-223.
96. 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.
97. Karlović Đ., Andrić N. (1996): *Kontrola kvaliteta semena uljarica*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Savezno ministarstvo za nauku tehnologiju i razvoj, Savezni zavod za standardizaciju, Beograd.
98. Karseno, Harada K., Bamba T., Dwi S., Mahakhant A., Yoshikawa T., Hirata K. (2009): Extracellular phycoerythrin-like protein released by freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* and *Scytonema* sp. *Biotechnology Letters* 31: 999-1003.
99. Kaur S., Das M. (2011): Functional foods: an overview. *Food Science and Biotechnology* 20: 861–875.

100. Kaushik P., Chauhan A. (2008): *In vitro* antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. Indian Journal of Microbiology 48: 348–352.
101. Kepekçi R. A., Saygideger S. D. (2012): Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. Journal of Applied Phycology 24: 897–905.
102. Kerby N. W., Stewart W. D. P. (1987): The biotechnology of microalgae and cyanobacteria. Biochemistry of the algae and cyanobacteria. Oxford: Clarendon Press.
103. Khajepour F., Hosseini S. A., Nasrabadi R. G., Markou G. (2015): Effect of light intensity and photoperiod on growth and biochemical composition of a local isolate of *Nostoc calcicola*. Applied Biochemistry and Biotechnology 176: 2279–2289.
104. Khattar J. I. S., Kaur S., Kaushal S., Singh Y., Singh D. P., Rana S., Gulati A. (2015): Hyperproduction of phycobiliproteins by the cyanobacterium *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5 under optimized culture conditions. Algal Research 12: 463–469.
105. Kirk J. T. O. (1994): Light and photosynthesis in aquatic systems. Cambridge University Press, Cambridge.
106. Kiviranta J., Sivonen K., Niemela S. (1991): Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. Environmental Toxicology 6: 423–436.
107. Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J. R. (2014): Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia 86: 295–335.
108. Kong W. B., Yang H., Cao Y. T., Song H., Hua S. F., Xia C. G. (2013): Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. Food Technology and Biotechnology 51: 62–69.
109. Koreivienė J., Belous O. (2012): Methods for cyanotoxins detection. Botanica Lithuanica 18: 58–65.
110. Kovač D. J., Simeunović J. B., Babić O. B., Mišan A. Č., Milovanović I. L. (2013): Algae in food and feed. Food and Feed Research 40: 21–31.
111. Kovač D., Babić O., Milovanović I., Mišan A., Simeunović J. (2017): The production of biomass and phycobiliprotein pigments in filamentous cyanobacteria: the impact of light and carbon sources. Applied Biochemistry and Microbiology. DOI: 10.1134/S000368381705009X.
112. Kumar V., Bhatnagar A. K., Srivastava J. N. (2011): Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. Journal of Medicinal Plants Research 5: 7043–7048.
113. Kyselkova I., Maršálek B. (2000): Use of *Daphnia pulex*, *Artemia salina* and *Tubifex tubifex* for cyanobacterial microcystins toxicity detection. Biologia 55: 637–643.
114. Lampert W. (2006): *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. Polish Journal of Ecology 54: 607–620.
115. Lawton L. A., Edwards C. (2008): Conventional laboratory methods for cyanotoxins. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs, 513–537. Springer.
116. Leao P. N., Ramos V., Goncalves P. B., Viana F., Lage O. M., Gerwick W. H., Vasconcelos V. M. (2013): Chemoecological screening reveals high bioactivity in diverse culturable portuguese marine cyanobacteria. Marine Drugs 11: 1316–1335.
117. 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: 1–9.
118. Lefort E. C., Blay J. (2013): Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. Molecular Nutrition and Food Research 57: 126–144.
119. Li H., Cheng K., Wong C., Fan K., Chen F., Jiang Y. (2007): Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry 102: 771–776.
120. Li P., Jia J., Zhang D., Xie J., Xu X., Wei D. (2014): In vitro and in vivo antioxidant activities of a flavonoid isolated from celery (*Apium graveolens* L. var. dulce). Food and Function 5: 50–56.

121. Limtrakul P., Khantamat O., Pintha K. (2005): Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *Journal of Chemotherapy* 17: 86–95.
122. Lopes V. R., Fernández N., Martins R. F., Vasconcelos V. (2010): Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine Drugs* 8: 471-482.
123. Luesch H., Yoshida W. Y., Moore R. E., Paul V. J., Corbett T. H. (2001): Total Structure Determination of Apratoxin A, a Potent Novel Cytotoxin from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of the American Chemical Society* 123: 5418-5423.
124. Ma R., Lu F., Bi Y., Hu Z. (2015): Effects of light intensity and quality on phycobiliprotein accumulation in the cyanobacterium *Nostoc sphaeroides* Kützing. *Biotechnology Letters* 37: 1663-1669.
125. Machu L., Misurcova L., Ambrozova J. V., Orsavova J., Mlcek J., Sochor J., Jurikova T. (2015): Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20: 1118–1133.
126. Mackinney G. (1941): Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* 140: 315- 322.
127. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727–747.
128. Mandal S., Rath J. (2015): Secondary metabolites of cyanobacteria and drug development. In *Extremophilic Cyanobacteria For Novel Drug Development* (pp. 23-43). Springer International Publishing.
129. Markou G., Georgakakis D. (2011): Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88: 3389–3401.
130. Maršálek B., Bláha L. (2004): Comparison of 17 biotests for detection of cyanobacterial toxicity. *Environmental Toxicology* 19: 310-317.
131. Martins R., Fernandez N., Beiras R., Vasconcelos V. (2007): Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. *Toxicon* 50: 791–799.
132. McCann J. C., Ames B. N. (2005): Is docosahexaenoic acid, an n3 longchain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *The American Journal of Clinical Nutrition* 82: 281-295.
133. Medina R. A., Goeger D. E., Hills P., Mooberry S. L., Huang N., Romero L. I., McPhail K. L. (2008): Coibamide A, a potent antiproliferative cyclic depsipeptide from the Panamanian marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. *Journal of the American Chemical Society* 130: 6324-6325.
134. 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.
135. Miles C. O., Melanson J. E., Ballot A. (2014): Sulfide oxidations for LC-MS analysis of methionine-containing microcystins in *Dolichospermum flos-aquae* NIVA-CYA 656. *Environmental Science and Technology* 48: 13307–13315.
136. Milovanović I. (2016): Potencijal cijanobakterija u formulaciji prehrambenih proizvoda sa dodatkom vrednošću. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
137. Milovanović I., Mišan A., Simeunović J., Kovač D., Jambrec D., Mandić A. (2015): Determination of volatile organic compounds in selected strains of cyanobacteria. *Journal of Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/969542>
138. Miranda M. S., Cintra R. G., Barros S. B. M., Mancini-Filho J. (1998): Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 1075-1079.
139. Mohamed Z. A., El-Sharouny H. M., Ali W. S. M. (2006): Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon* 47: 584-590.
140. Mohammed M. K., Mohd M. K. (2011): Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in *Spirulina platensis* in response to indole acetic acid (IAA). *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)* 3: 4973-4979.

141. Moreno J., Rodriguez H., Vargas M. A., Rivas J., Guerrero M. G. (1995): Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains. *Journal of Applied Phycology* 7: 17–23.
142. Mostafa S. S.M. (2012): *Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications*. Chapter 12. DOI:10.5772/53694.
143. Mukund S., Sivasubramanian V., Palanisamy M., Chinnu K. (2014): In vitro antioxidant and anti-proliferative activity of *Phormidium fragile*. *Journal of Algal Biomass Utilization* 5: 49–57.
144. Müller L., Fröhlich K., Böhm V. (2011): Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129: 139–148.
145. Nagel R. (2002): DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19: 38–48.
146. Nair V. P., Hunter J. M. (2004): Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*: 4: 164–168.
147. Najdenski H. M., Gigova L. G., Iliev I. I., Pilarski P. S., Lukavský J., Tsvetkova I. V., Ninova M. S., Kussovski V. K. (2013): Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 1533–1540.
148. Novaković A. (2015): *Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika*. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
149. Nunnery J. K., Mevers E., Gerwick W. H. (2010): Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 787–793.
150. Ogawa T., Terui G. (1970): Studies on the growth of *Spirulina platensis*. (I) On the pure culture of *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation Technology* 48: 361–367.
151. Olson J. M. (2006): Photosynthesis in the Archean Era. *Photosynthesis Research* 88: 109–117.
152. Onofrejová L., Vašíčková J., Klejdus B., Stratil P., Mišurcová L., Kráčmar S., Kopecký J., Vacek J. (2010): Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 464–470.
153. Opris S., Sicora C., Rusu T., Miclean M. (2013): Identification and quantification of fatty acids in cyanobacteria cells. *ProEnvironment* 6: 402–406.
154. Orčić D., Francisković M., Bekvalac K., Svirčev E., Beara I., Lesjak M., Mimica-Dukić N. (2014): Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry* 143: 48–53.
155. Ördög V. (2001): Valuable microalgae in the Mosonmagyaróvár algal culture collection (MACC). *International Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil Systems, Mosonmagyaróvár, Hungary*. Book of Abstracts: 10.
156. Ozdemir G., Ulku Karabay N., Dalay M. C., Pazarbasi B. (2004): Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy research* 18: 754–757.
157. Patil V., Kallqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H. (2007): Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International* 15: 1–9.
158. Pero R. W., Lund H. (2009): *In vivo* treatment of humans with quinic acid enhances DNA repair and reduces the influence of lifestyle factors on risk to disease. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 5: 293–305.
159. Pietta P., Simonetti P., Mauri P. (1998): Antioxidant Activity of Selected Medical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4487–4490.
160. Plaza M., Herrero M., Cifuentes A., Ibáñez E. (2009): Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7159–7170.
161. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. (2006): In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6: 39.
162. Prasanna R., Pabby A., Saxena S., Singh P. K. (2004): Modulation of pigment profiles of *Calothrix elenkenii* in response to environmental changes. *Journal of Plant Physiology* 161: 1125–1132.

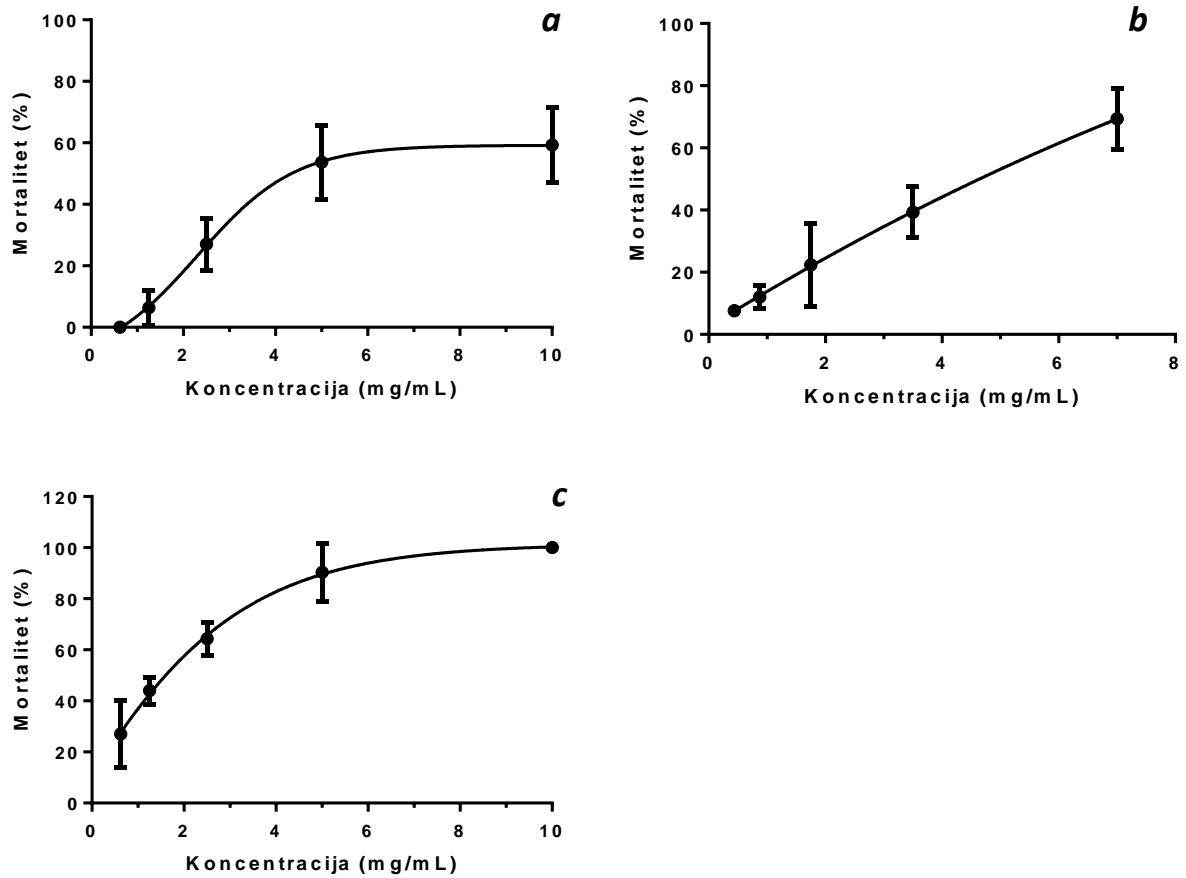
163. Priyadarshani I., Rath B. (2012): Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of algal biomass utilization* 3: 89-100.
164. Pulz O., Gross W. (2004): Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 635-648.
165. Rai A. N. (1990): Cyanobacteria in symbiosis. *Handbook of Symbiotic Cyanobacteria* (ed. Rai, A. N.), CRC Press, Boca Raton.
166. Ramalho S. A., Gualberto N. C., Santos Leite Neta M. T., Batista R. A., Araújo S. M., de Jesus da Silveira Moreira J., Narain N. (2014): Catechin and epicatechin contents in wines obtained from Brazilian exotic tropical fruits. *Food and Nutrition Sciences* 5: 449-457.
167. Ramanathan R., Ganesh L. S. (1994): Group preference aggregation methods employed in AHP: an evaluation and an intrinsic process for deriving members' weightages. *European Journal of Operational Research* 79: 249-265.
168. Rapala J., Lahti K. (2002): Methods for detection of cyanobacterial toxins. In: *Detection methods for algae, protozoa and helminths in fresh and drinking water*, 107-132. J. Wiley and Sons.
169. Raveh A., Carmeli S. (2007): Antimicrobial ambiguines from the cyanobacterium *Fischerella* sp. collected in Israel. *Journal of Natural Products* 70: 196-201.
170. Ravelonandro P. H., Ratianarivo D. H., Joannis-Cassan C., Isambert A., Raherimandimby M. (2008): Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 842-848.
171. Reinert R., Donald E. L., Rosi F. X., Watal C., Dowzicky M. (2007): Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 1018-1029.
172. Richmond A. (1988): *Spirulina*. In: *Micro-algal biotechnology*, 85-121. Cambridge University Press.
173. 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* 111: 1-61.
174. Rodrigues M. S., Ferreira L. S., Converti A., Sato S., Carvalho J. C. M. (2010): Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource technology* 101: 4491-4498.
175. Rodríguez H., Rivas J., Guerrero M. G., Losada M. (1991): Enhancement of phycobiliprotein production in nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of Biotechnology* 20: 263-270.
176. Rodríguez-García I., Guil-Guerrero J. L. (2008): Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry* 108: 1023-1026.
177. Rop O., Mlcek J., Jurikova T., Neugebauerova J., Vabkova J. (2012): Edible flowers - A new promising source of mineral elements in human nutrition. *Molecules* 17: 6672-6683.
178. Saaty T. L. (1980): *The analytic hierarchy process*. McGraw-Hill, New York.
179. Safafar H., Van Wagenen J., Møller P., Jacobsen C. (2015): Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs* 13: 7339-7356.
180. Sakač M. B., Sedej I. J., Mandić A. I., Mišan A. Č. (2015): Antioksidativna svojstva brašna od heljde –doprinos funkcionalnosti pekarskih, testeničarskih i brašneno-konditorskih proizvoda. *Hemijska industrija* 69: 469-483.
181. Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Sauracalixto F. (1999): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Food Agriculture* 76: 270-276.
182. Sarada D. V., Sreenath Kumar C., Rengasamy R. (2011): Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 779-783.
183. Schirrmeister B. E., Antonelli A., Bagheri C. H. (2011): The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology* 11: 45.

184. Schwartz J., Shklar G. (1987): Regression of experimental hamster cancer by beta-carotene and alga extract. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45: 510-515.
185. Shalaby E. A., Shanab S. M. M. (2013): Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 42: 556-564.
186. Shalaby E. A., Shanab S. M. M., Singh V. (2010): Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 2622-2632.
187. Shanab S. M. M., Mostafa S. S. M., Shalaby E. A., Mahmoud G. I. (2012): Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2: 608-615.
188. Sharathchandra K., Rajashekhar M. (2013): Antioxidant activity in the four species of cyanobacteria isolated from a sulfur spring in the western ghats of Karnataka. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4: 275 – 285.
189. Shen S., Zhang P., Lovchik M. A., Li Y., Tang L., Chen Z., Yu Q. (2009): Cyclodepsipeptide toxin promotes the degradation of Hsp90 client proteins through chaperone-mediated autophagy. *The Journal of cell biology* 185: 629-639.
190. Shi H., Noguchi N., Niki E. (2001): Introducing natural antioxidants. In: *Antioxidants in food, Practical applications*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England, 22-70.
191. Shields R. J., Lupatsch I. (2012): Algae for aquaculture and animal feeds. *Technikfolgenabschätzung Theorie und Praxis* 21: 23-37.
192. Sies H. (1985): Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H. (Editor) *Oxidative stress*, Academic Press, London, UK.
193. Silva-Stenico M. E., Silva C. S., Lorenzi A. S., Shishido T. K., Etchegaray A., Lira S. P., Moraes L. A., Fiore M.F. (2011): Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research* 166: 161—175.
194. Simeunović J. (2005): Kolekcija kultura cijanobakterija. Zadužbina Andrejević, Beograd.
195. Simeunović J. (2009): Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
196. Simeunović J. (2010): Cijanobakterije i cijanotoksini u površinskim vodama Vojvodine. Zadužbina Andrejević.
197. Simeunović J. B., Marković S. B., Kovač D. J., Mišan A. Č., Mandić A. I., Svirčev Z. B. (2012): Filamentous cyanobacteria from Vojvodina region as source of phycobiliprotein pigments as potential natural colorants. *Food and Feed Research* 39: 23–31.
198. Simeunović J., Bešlin K., Svirčev Z., Kovač D., Babić O. (2013): Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. *Journal of Applied Phycology* 25: 597–607.
199. Singh R. K., Tiwari S. P., Rai A. K., Mohapatra T. M. (2011): Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *Journal of Antibiotics* 64: 401-4012.
200. Smutná M., Babica P., Jarque S., Hilscherová K., Marsálek B., Haeba M., Bláha L. (2014): Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon* 79: 11–18.
201. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006): Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.
202. Srđević B., Srđević Z., Zoranović T. (2002): PROMETHEE, TOPSIS i CP u višekriterijumskom odlučivanju u poljoprivredi. *Letopis naučnih radova* 1: 5-23.
203. Stadnichuk I. N., Tropin I. V. (2017): Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology* 53: 1-10.
204. Suhail S., Biswas D., Farooqui A., Arif J. M., Zeeshan M. (2011): Antibacterial and free radical scavenging potential of some cyanobacterial strains and their growth characteristics. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3: 472-478.

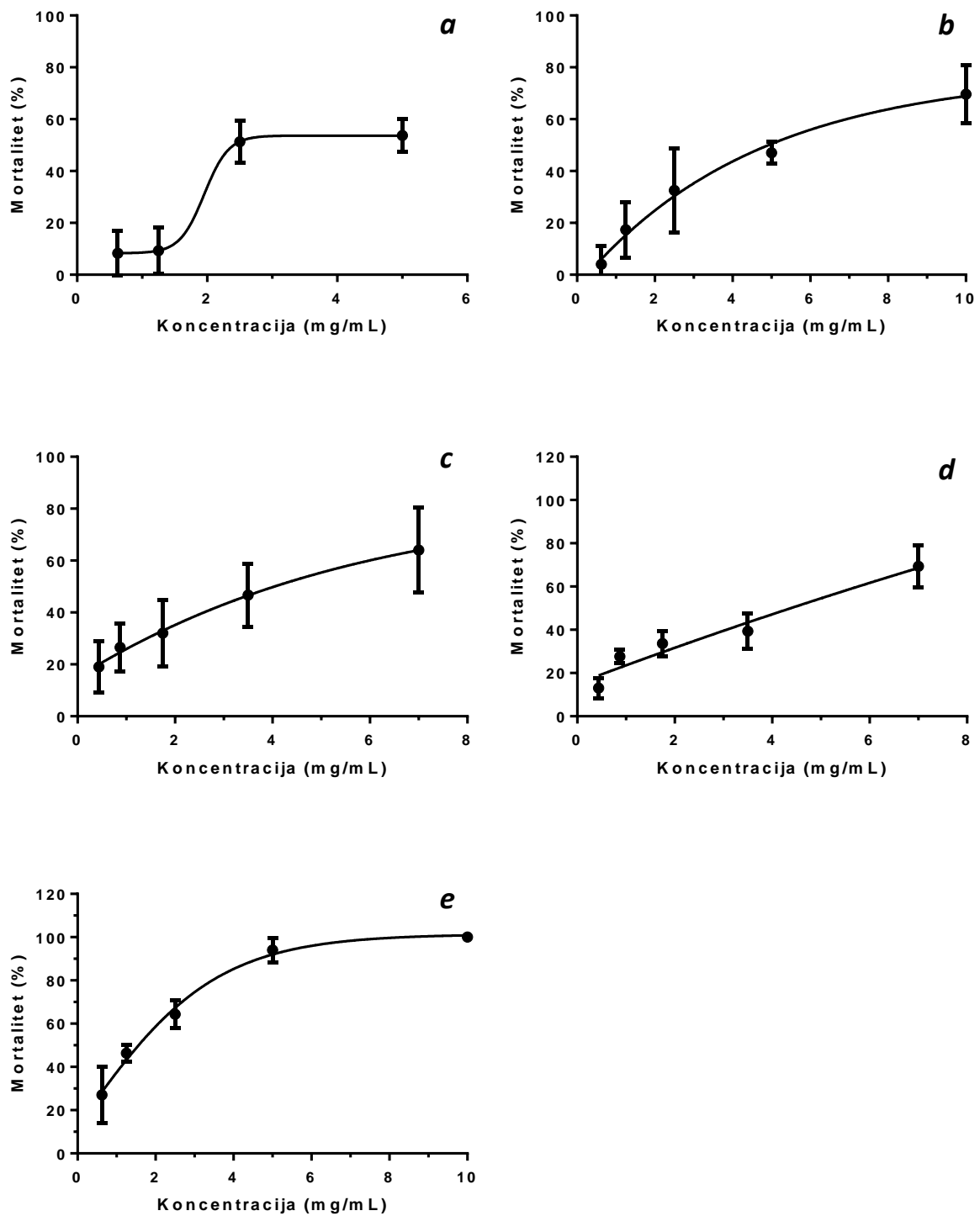
205. Susilaningsih D. (2007): Accelerating of pink pigment excretion from cyanobacterium *Oscillatoria* by co-cultivation with *Anabaena*. HAYATI J Biosci. 14:18-22.
206. Svirčev Z. (2005): Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
207. Svirčev Z., Četojević-Simin D., Simeunović J., Karaman M., Stojanović D. (2008): Antibacterial, antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. Science In China Series C: Life Sciences 51: 941-947.
208. Takaichi S., Mochimaru M. (2007): Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. Cellular and Molecular Life Sciences 64: 2607-2619.
209. Tanwar B., Modgil R. (2012): Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. Spatula DD 2: 59-68.
210. Taori K., Paul V. J., Luesch H. (2008): Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the Floridian marine cyanobacterium *Symploca* sp. Journal of the American Chemical Society 130: 1806-1807.
211. Thajuddin N., Subramanian G. (2005): Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. Current Science 89: 47-57.
212. Thingujam I., Nath T. O., Keithellakpam O. S., Oinam G., Oinam A. S., Kangjam S., Thiyam B., Wangkhem I., Chungkham S., Aribam S., Khangembam R., Angom T., Dutt S. G. (2015): Screening and evaluation of non-heterocystous filamentous cyanobacteria for lipid and commercially viable fatty acids. Journal of Applied Biology and Biotechnology 3: 11-14.
213. Thomas N. V., Kim S. K. (2011): Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. Environmental Toxicology and Pharmacology 32: 325-335.
214. Toepel J., Welsh E., Summerfield T. C., Pakrasi H. B., Sherman L. A. (2008): Differential transcriptional analysis of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 during light-dark and continuous-light growth. Journal of Bacteriology 190: 3904-3913.
215. Tomaselli L., Margheri M. C., Sacchi A. (1995): Effects of light on pigments and photosynthetic activity in a phycoerythrin-rich strain of *Spirulina subsalsa*. Aquatic Microbial Ecology 9: 27-31.
216. Törökné A., Vasdinnyei R., Asztalos B. M. (2007): A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. Environmental Toxicology 22: 64-68.
217. Vaishampayan U., Glode M., Du W., Kraft A., Hudes G., Wright J., Hussain M. (2000): Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. Clinical Cancer Research 6: 4205-4208.
218. Vaz J. A., Heleno S. A., Martins A., Almeida G. M., Vasconcelos M. H., Ferreira I. C. F. R. (2010): Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: *In vitro* antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. Food and Chemical Toxicology 48: 2881-2884.
219. Veličković J. (2013): Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstraktata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Niš.
220. Wang H., Liu Y., Gao X., Carter C. L., Liu Z. R. (2007): The recombinant β subunit of C-phycoyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Cancer letters 247: 150-158.
221. Welker M., Von Döhren H. (2006): Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS microbiology reviews 30: 530-563.
222. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. (2005): A practical note on the use of cytotoxicity assays. International Journal of Pharmaceutics 288: 369-376.
223. Wiegand C., Pflugmacher S. (2005): Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology 203: 201-218.
224. Williams, Cheryll J. (2012): Medicinal plants in Australia. Volume 3, Plants, potions and poisons. Dural Delivery Centre, NSW Rosenberg Publishing Pty Ltd.
225. Wrasidlo W., Mielgo A., Torres V. A., Barbero S., Stoletov K., Suyama T. L., Stupack D. G. (2008): The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8. Proceedings of the National Academy of Sciences 105: 2313-2318.

226. Yang Y., Park Y., Cassada D. A., Snow D. D., Rogers D. G., Lee J. (2011): In vitro and in vivo safety assessment of edible blue-green algae, *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützing and *Spirulina plantensis*.
227. Yeh K.-L., Chang J.-S., Chen W.-M. (2010): Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences* 10: 201–208.
228. Yoshizawa S., Matsushima R., Watanabe M. F., Harada K. I., Ichihara A., Carmichael W. W., Fujiki H. (1990): Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116: 609-614.
229. Yu G., Shi D., Cai Z., Wei C., Fan O. (2011): Growth and physiological features of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in a glucose-mixotrophic culture. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 19: 108-115.
230. Yu H., Jia S., Dai Y. (2009): Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology* 21: 127–133.
231. Zelik P., Lukešova A., Voloshko L. N., Štys D., Kopecky J. (2009): Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 24: 531–536.
232. www.lipidhome.co.uk
233. http://www.igb.fraunhofer.de/content/dam/igb/de/documents/broschueren/Microalgae_a_sustainable_resource_for_valuable_compounds_and_energy.pdf

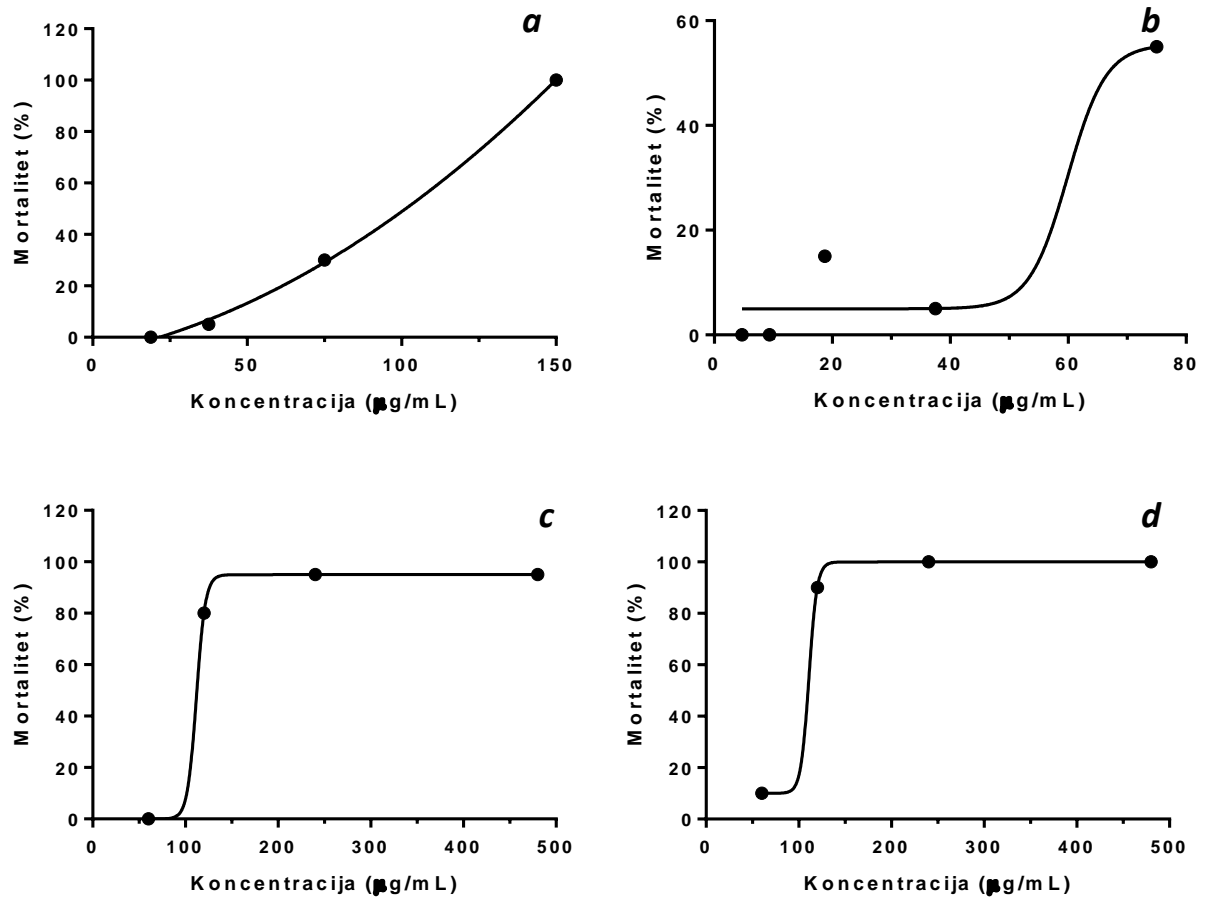
8. PRILOG

Prilog 1 Toksičnost sojeva cijanobakterija detektovana u bioeseju *A. salina*

Slika 36. Toksičnost sojeva nakon 24 h. (a) – *Nostoc* 2S1, (b) - *Nostoc* LC1B, (c) – *Anabaena* Č2.

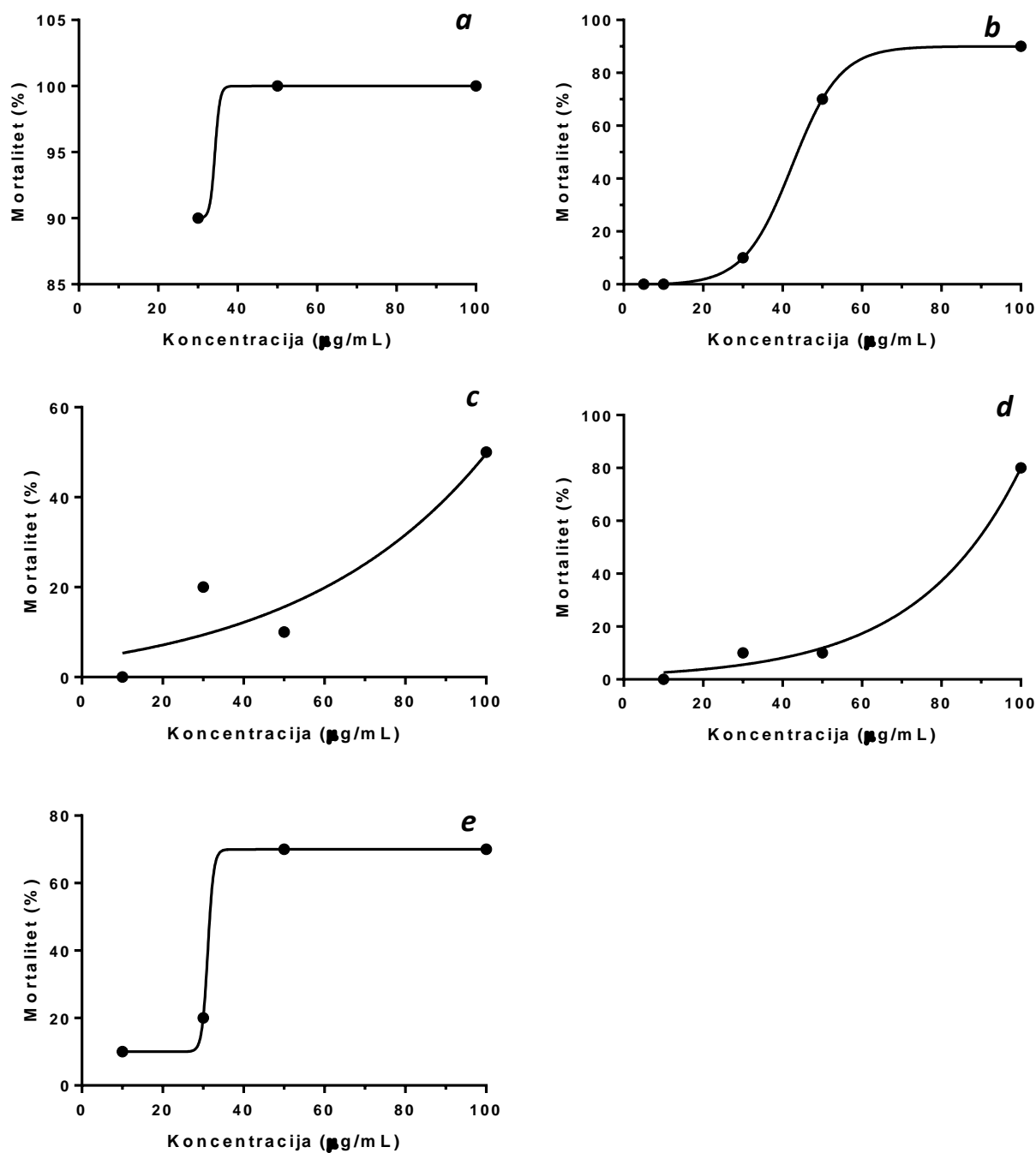


Slika 37. Toksičnost sojeva nakon 48 h. (a) – *Nostoc* 2S3B, (b) – *Nostoc* 2S1, (c) – *Nostoc* S8, (d) – *Nostoc* LC1B, (e) – *Anabaena* Č2.

Prilog 2 Toksičnost sojeva cijanobakterija detektovana u bioeseju *D. magna*

Slika 38. Toksičnost sojeva. (a) – *Nostoc* 2S1 (48 h), (b) - *Nostoc* LC1B (48 h), (c) – *Nostoc* S8 (24 h), (d) - *Nostoc* S8 (48 h).

Prilog 3 Toksičnost sojeva cijanobakterija detektovana u DarT testu



Slika 39. Toksičnost sojeva. (a) – *Nostoc* 2S3B (48 h), (b) - *Nostoc* S8 (48 h), (c) – *Nostoc* LC1B (24 h), (d) - *Nostoc* LC1B (48 h), (e) - *Anabaena* Č5 (48 h).

BIOGRAFIJA



Dajana J. Kovač je rođena 14.02.1984. godine u Novom Sadu, gde je završila Medicinsku školu "7. april". Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog upisala je školske 2003/2004 godine. Diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,33. Školske 2009/2010 upisala je diplomatske akademske studije-master na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, smer master biolog (mikrobiologija), tokom kojih je bila dobitnik stipendije "Dositeja", Fonda za mlade talente Republike Srbije. Master studije završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,41. Školske 2010/2011 upisala je doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,67.

Zaposlena je 2011. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakultetu u Novom Sadu kao istraživač-pripravnik, a od 2014. godine kao asistent u nastavi za užu naučnu oblast Mikrobiologija. Od 2011. godine do sada angažovana je za izvođenje vežbi iz predmeta na Katedri za mikrobiologiju. Učestvovala je na nekoliko domaćih i međunarodnih projekata, uključujući projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije "Funkcionalni proizvodi na bazi žita namenjeni osobama sa metaboličkim poremećajima" (TR 31029), "Novel natural antimicrobial agents for bacterial pathogen control" HUSRB/1203/214/250 realizovan u okviru IPA prekogranične saradnje Mađarska – Srbija i SCOPES projekat "Identification and characterization of cyanobacterial toxins based on their interaction with basic cellular detoxification systems in zebrafish (*Danio rerio*) and zooplankton *Daphnia magna* (IZ73ZO_152274/1)".

U periodu od 14.03. do 30.04.2016. boravila je u Laboratoriji za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, Republika Hrvatska. Koautor i autor je preko 30 naučnih radova, od toga 4 u časopisima sa SCI liste. Tečno govori engleski jezik.

Novi Sad, 27.07.2017.

Dajana Kovač

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Dajana Kovač
Mentor: MN	dr Jelica Simeunović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	“Biotehnološki potencijal filamentoznih sojeva cijanobakterija sa područja Vojvodine”
Jezik publikacije: JP	srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2017
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja (8), strana (126), broj lit. citata (233), tabela (28), slika (39), grafika (-), priloga (3)
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija
Ključne reči: PO	Cijanobakterije, biotehnološki potencijal, biološki aktivni metaboliti
UDK:	

<p>Čuva se: ČU</p>	<p>Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republika Srbija</p>
<p>Važna napomena: VN</p>	
<p>Izvod: IZ</p> <p>S obzirom da su cijanobakterije (modrozelenne alge) identifikovane kao jedna od najperspektivnijih grupa organizama za izolaciju novih i biološki aktivnih prirodnih produkata, cilj ove teze bio je utvrđivanje biotehnološkog potencijala autohtonih filamentoznih sojeva cijanobakterija izolovanih sa područja Vojvodine koji pripadaju azotofiksirajućim rodovima <i>Nostoc</i> i <i>Anabaena</i> i neazotofiksirajućem rodu <i>Spirulina</i>. Biotehnološki potencijal testiranih sojeva je određen u smislu produkcije biomase, fikobiliproteinskih pigmenata, masnih kiselina, fenolnih jedinjenja, antioksidanata, antibakterijskih i antikancerogenih agenasa. Dobijeni rezultati su pokazali da su produkcija biomase i sadržaj fikobiliproteinskih pigmenata kod svih testiranih sojeva zavisili od primenjenih uslova kultivacije, pri čemu je kod sojeva roda <i>Spirulina</i> produkcija biomase bila jače stimulirana primenom kontinualnog osvetljenja, a kod azotofiksirajućih sojeva rodova <i>Nostoc</i> i <i>Anabaena</i> organskim izvorima ugljenika (glicerolom i glukozom). Kao soj sa najvećim potencijalom za proizvodnju biomase izdvaja se soj <i>Spirulina</i> S1, a za produkciju fikobiliproteina sojevi <i>Spirulina</i> S1, <i>Nostoc</i> 2S1, <i>Anabaena</i> Č2 i <i>Spirulina</i> S2. Određivanjem sadržaja masnih kiselina GC-FID metodom utvrđeno je da su kod svih sojeva najzastupljenije bile palmitinska, palmitoleinska, oleinska i linolna kiselina, pri čemu su sojevi roda <i>Spirulina</i> proizveli i γ-linolensku kiselinu, dok su svi sojevi rodova <i>Nostoc</i> i <i>Anabaena</i> proizveli α-linoleinsku kiselinu. Najzastupljenije fenolne komponente testiranih etanolnih ekstrakata određene HPLC-MS/MS metodom bile su hinska kiselina i katehin, pri čemu je najveći sadržaj fenolnih jedinjenja registrovan kod soja <i>Nostoc</i> 2S7B. Hemijskom karakterizacijom ekstrakata kod testiranih sojeva takođe je utvrđen značaj azotnih uslova kultivacije u cilju povećanja produkcije fenolnih jedinjenja, kao i α-linoleinske kiseline. Poređenjem rezultata antioksidantne aktivnosti u korišćenim testovima DPPH i FRAP, kao sojevi sa najvećim antioksidantnim potencijalom izdvajaju se <i>Spirulina</i> S1 i <i>Spirulina</i> S2. Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata registrovana je kod sojeva <i>Nostoc</i> 2S7B, <i>Nostoc</i> 2S1, <i>Anabaena</i> Č2, <i>Anabaena</i> Č5, <i>Spirulina</i> S1 i <i>Spirulina</i> S2, koji su ispoljili efekat na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, pri čemu su sojevi <i>Anabaena</i> Č2, <i>Nostoc</i> 2S7B i <i>Nostoc</i> 2S1 delovali na najviše bakterijskih sojeva. Kod svih testiranih sojeva je primenom MTT testa uočena antikancerogena tj. citotoksična aktivnost dimetil sulfoksidnih (DMSO) ekstrakata prema HepG2 ćelijskoj liniji, među kojima su najveću aktivnost ispoljili sojevi <i>Nostoc</i> LC1B i <i>Nostoc</i> 2S7B. Primenom bioeseja <i>Artemia salina</i>, <i>Daphnia magna</i> i <i>Danio rerio</i> konstatovan je mali broj sojeva koji su ispoljili toksičnost na test organizme, dok na ćelijsku liniju RTL-W1 testirani sojevi nisu ispoljili citotoksičnost <i>in vitro</i>, što sa aspekta potencijalne biotehnološke primene sojeva ima veliki značaj. Kao najtoksičniji izdvojili su se sojevi <i>Nostoc</i> LC1B i <i>Nostoc</i> S8 koji su ispoljili toksičnost u sva tri bioeseja. Ispitivanjem toksičnosti <i>in vitro</i> u enzimskim esejima konstatovano je da je manji broj sojeva inhibirao aktivnost enzima</p>	

<p>protein fosfataze 1 (PP1) u odnosu na aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE). Primenom Analitičkog hijerarhijskog procesa u grupnom kontekstu, najveću težinu su dobili kriterijumi antikancerogena ativnost, produkcija biomase i sadržaj fikocijanina, navedenim redom. Konačno, u višekriterijumskom kontekstu najbolje rangiran soj je <i>Spirulina S1</i>, na drugom mestu je soj <i>Spirulina S2</i>, dok je na trećem soj <i>Nostoc LC1B</i>.</p>	
<p>Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP</p>	<p>29.10.2015.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO</p>	<p>predsednik: dr Zorica Svirčev, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; član: dr Siniša Markov, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; mentor: dr Jelica Simeunović, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph type
Type of record: TR	Textual printed material
Contents Code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Dajana Kovač
Mentor: MN	dr Jelica Simeunović, Associate professor
Title: TI	“Biotechnological potential of filamentous cyanobacterial strains of the area of Vojvodina”
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author's reprint
Publ. place: PP	Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Physical description: PD	chapters (8), pages (126), references (233), tables (28), figures (39), graphs (-), supplemental data (3)
Scientific field: SF	Biology
Scientific discipline: SD	Microbiology
Key words: KW	cyanobacteria, biotechnological potential, biologically active metabolites
Holding data: HD	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg

	Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
--	---

HD Note:

Abstract:

AB

Cyanobacteria (blue-green algae) have been identified as one of the most promising groups of organisms for the isolation of new and biologically active natural products, therefore, the aim of this thesis was to determine the biotechnological potential of autochthonous filamentous cyanobacterial strains isolated from Vojvodina region, which belong to the N₂-fixing genera *Nostoc* and *Anabaena* and non-N₂-fixing genus *Spirulina*. Biotechnological potential of tested strains was determined using the production of biomass, phycobiliprotein pigments, fatty acids, phenolic compounds, antioxidants, antibacterial and anticancer agents. The obtained results showed that the production of biomass and phycobiliprotein pigments, in all tested strains, depended on the cultivation conditions, whereas biomass production was strongly stimulated by continuous light in *Spirulina* strains, and by organic carbon sources (glycerol and glucose) in N₂-fixing strains. The highest potential for biomass production was shown in *Spirulina* S1 strain. On the other hand, the highest potential for the production of phycobiliproteins was shown in strains *Spirulina* S1, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* C2 and *Spirulina* S2. By determination of the content of fatty acids using GC-FID method it was found that in all the tested strains the most common fatty acids were palmitic, palmitoleic, oleic and linoleic acid, whereby the strains of the genus *Spirulina* produced γ -linolenic acid as well, while all strains of the *Nostoc* and *Anabaena* genera produced α -linolenic acid. The most frequent phenolic compounds of tested strains determined by using the HPLC-MS/MS method were quinic acid and catechin, with the highest content of phenolic compounds registered in *Nostoc* strain 2S7B. By chemical characterization of the extracts in the tested strains it was also stated a significance of the nitrogen cultivation conditions in order to increase the production of phenolic compounds, as well as α -linolenic acid. Comparing the results of the antioxidant activity in the DPPH and FRAP tests, it was shown that strains *Spirulina* S1 and *Spirulina* S2 had the highest antioxidant potential. The antibacterial activity of the intracellular methanolic extracts was registered in strains *Nostoc* 2S7B, *Nostoc* 2S1, *Anabaena* C2, *Anabaena* C5, *Spirulina* S1 and *Spirulina* S2, that inhibited the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Using MTT test, anti-cancer ie. cytotoxic activity of dimethyl sulfoxide (DMSO) extracts to the HepG2 cell line was detected in all tested strains, however, the highest activity was exhibited in strains *Nostoc* LC1B and *Nostoc* 2S7B. In bioassays *Artemia salina*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* a small number of strains exhibited toxicity to the test organisms, while in case of cell line RTL-W1 tested strains did not show *in vitro* cytotoxicity, which is of great importance from the aspect of the potential biotechnological application of the

strains. *Nostoc* LC1B and *Nostoc* S8 strains induced toxicity in all three bioassays, and therefore considered as the most toxic strains. By testing *in vitro* toxicity in enzyme assays, it was found that few strains inhibited the activity of protein phosphatase (PP1) enzyme in relation to acetylcholinesterase enzyme (AChE) activity. Using the Analytical hierarchical process in the group context, the highest weight was given to the criteria of anticancer activity, biomass production, and the phycocyanin content, respectively. Finally, in the multi-criteria context, the best-ranked strain is *Spirulina* S1, *Spirulina* strain S2 is on the second place, while *Nostoc* strain LC1B is the third one.

Accepted by the Scientific Board on: ASB	29.10.2015.
Defended: DE	
Thesis defend board: DB	President: Dr. Zorica Svirčev, Full Professor , Faculty of Sciences, University of Novi Sad; Member: Dr. Siniša Markov, Full Professor , Faculty of Technology, University of Novi Sad; Mentor: Dr. Jelica Simeunović, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.