



Univerzitet u Novom Sadu  
Prirodno-matematički fakultet  
Departman za biologiju i ekologiju



MSc Olivera Babić

**Karakterizacija zemljišnih cijanobakterijskih  
sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema  
planinskih područja Republike Srbije**

-Doktorska disertacija-

U Novom Sadu, 2018.

## **PREDGOVOR**

*Zahvaljujem se svima na Departmanu za biologiju i ekologiju i Prirodno-matematičkom fakultetu koji su omogućili izradu ove disertacije u okviru istraživanja na projektu „Biosenzing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima“ (Evidencioni broj projekta: III 43002) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i na projektu “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)” koje finansira Švajcarska.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Jelici Simeunović, za pomoć pri izradi i pisanju ove disertacije, spremnosti da svoje znanje podeli sa mnom kao i da omogući moje usavršavanje u Švajcarskoj. Takođe veliku zahvalnost dugujem predsedniku komisije prof. dr Zorici Svirčev na pomoći i korisnim savetima i doprinosu mog odlaska i usavršavanja u Finskoj.*

*Hvala članovima komisije, prof. dr Draganu Radnoviću i prof. dr Simonidi Đurić na konstruktivnim i stručnim sugestijama.*

*Hvala dr Ivici Tamaš na pomoći i savetima koji su mi pomogli pri pisanju disertacije.*

*Veliku zahvalnost na pomoći u izradi eksperimentalnog dela disertacije dugujem dr Mileni Rašeti i Filipu Šibulu sa Departmana za hemiju kao i dr Tanji Tunić, dr Varji Knežević i Šandoru Šipošu sa Departmana za biologiju i ekologiju. Veliko hvala i dr Ivanu Milovanoviću (FINS) na pomoći prilikom izrade disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Petri Marić sa Instituta Ruđer Bošković iz Zagreba za svu pomoć pruženu tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Iskrenu zahvalnost dugujem svim bivšim i sadašnjim članovima Katedre za mikrobiologiju, svim profesorima i kolegama doktorantima, na pomoći i podršci.*

*Zahvaljujem se prijateljima na bezgraničnom razumevanju i nesebičnoj podršci.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici pre svega svojim roditeljima, Jeleni i Branku, bez čije ljubavi, podrške i razumevanja ovaj rad ne bi bio moguć.*

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opšti deo	1
1.1.1. Morfološke karakteristike cijanobakterija	2
1.1.2. Klasifikacija	6
1.1.3. Fiziologija cijanobakterija	10
1.2. Biološki aktivna jedinjenja cijanobakterija	13
1.2.1. Masne kiseline	15
- Mehanizmi sinteze masnih kiselina	16
1.2.2. Antimikrobna jedinjenja	17
a) Alkaloidi	17
b) Peptidi	18
c) Terpenoidi	18
d) Masne kiseline	18
1.2.3. Antioksidativna jedinjenja	19
a) Fikocijanin	20
b) Karotenoidi	20
c) Fenoli	20
d) Enzimski antioksidansi	20
1.2.4. Toksini	21
1.2.4.1. Funkcionalne grupe cijanotoksina	23
1) Hepatotoksini	23
a) Mikrocistini	24
Biosinteza mikrocistina	25
Unos mikrocistina i mehanizam delovanja u eukariotskim ćelijama	26
b) Nodularin	26
c) Cilindrospermopsin	27
2) Neurotoksini	28
a) Anatoksini	28
b) Saksitoksin	29
Genotoksičnost cijanobakterija	30
1.2.4.2. Sudbina cijanotoksina u terestričnim ekosistemima	30
1.2.4.3. Metode detekcije cijanotoksina	31
1) Analitičke metode	31
2) Bioanalitičke metode	32
3) Molekularne metode	32
4) Biološki eseji	33
a) <i>Artemia salina</i> bioesej	33
b) <i>Daphnia magna</i> bioesej	34
c) <i>Danio rerio</i> bioesej	34
1.3. Rasprostranjenost cijanobakterija	36
1.4. Cijanobakterije terestričnih staništa i njihove adaptivne strategije	38
1.5. Uloga cijanobakterija u funkcionisanju zemljišnih ekosistema	40
1.5.1. Uloga cijanobakterija u kruženju biogenih elemenata	41
1.5.2. Produkcija egzopolisaharida	41
- Sastav i makromolekularne karakteristike egzopolisaharida	42
1.5.3. Naseljavanje „ogoljenih“ zemljišta	43
1.6. Upotreba terestričnih cijanobakterija	45
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	48

3. MATERIJAL I METODE RADA	50
3.1. Uzorkovanje zemljišta	50
3.2. Izolacija i determinacija izolovanih terestričnih cijanobakterija	53
3.3. Identifikacija cijanobakterijskih sojeva korišćenjem dela genske sekvence 16S rRNK gena	55
3.3.1. Izolacija i purifikacija genomske DNK	55
3.4. Sekvencioniranje dela genske sekvence 16S rRNK gena	56
3.4.1. Prečišćavanje PCR proizvoda	57
3.4.2. Određivanje koncentracije DNK	57
3.4.3. Sekvenciranje dela genske sekvence 16S rRNK gena	57
3.5. Metod za utvrđivanje produkcije biomase cijanobakterijskih sojeva	58
3.6. Metod za utvrđivanje produkcije fikobilinskih pigmenata kod cijanobakterija	58
3.7. Ispitivanje miksotrofnog rasta - određivanje uticaja glukoze i saharoze na produkciju biomase i fikobiliproteinskih pigmenata	59
3.8. Određivanje sadržaja ugljenih hidrata (PSA test)	59
3.9. Testiranje biološke aktivnosti cijanobakterija	61
3.9.1. Priprema ekstrakata cijanobakterija za detekciju biološki aktivnih materija (BAM)	61
3.9.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti cijanobakterija	61
3.9.2.1. Disk-difuziona metoda	62
3.9.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) cijanobakterijskih ekstrakata primenom mikrodilucione metode	63
3.9.3. Hemijska karakterizacija i određivanje sastava masnih kiselina nakon transesterifikacije sa bor(III)-fluoridom metodom gasne hromatografije (GC-FID)	64
3.9.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti cijanobakterija <i>in vitro</i>	66
3.9.4.1. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH• radikala	66
3.9.4.2. Određivanje redoks kapaciteta FRAP metodom	67
3.9.5. Hemijska analiza fenolnog sastava cijanobakterija primenom LC/MS-MS analize	68
3.9.6. Određivanje toksičnosti izolovanih cijanobakterija	68
3.9.6.1. <i>Artemia salina</i> bioesej	69
3.9.6.2. <i>Daphnia magna</i> bioesej	69
3.9.6.3. <i>Danio rerio</i> bioesej (DarT test)	71
3.10. qPCR metoda i ispitivanje efekta ekstrakta odabranog cijanobakterijskog soja na ekspresiju 11 gena uključenih u signalne puteve kod model organizma <i>Danio rerio</i>	72
3.10.1. Ekstrakcija RNK	73
3.10.2. Sinteza cDNK	74
3.10.3. qPCR	74
3.11. Utvrđivanje toksiogeničnosti cijanobakterija i detekcija prisutva <i>mcy</i> gena PCR metodom	76
3.12. Statistička obrada podataka	77
4. REZULTATI I DISKUSIJA	78
4.1. Izolacija i determinacija izolovanih terestričnih cijanobakterija	78
4.2. Identifikacija cijanobakterijskih sojeva korišćenjem dela genske sekvence 16S rRNK gena	85
4.3. Uticaj azota na produkciju biomase i sadržaj fikobiliproteinskih pigmenata	91
4.4. Ispitivanje miksotrofnog rasta – određivanje uticaja glukoze i saharoze na produkciju biomase i sadržaj fikobiliproteinskih pigmenata	97
4.5. Određivanje sadržaja ugljenih hidrata – PSA test	111

4.6. Testiranje biološke aktivnosti terestričnih cijanobakterija izolovanih iz šumskih ekosistema	115
4.7. Određivanje antimikrobne aktivnosti cijanobakterija	115
4.8. Hemijska karakterizacija i određivanje sastava masnih kiselina nakon transesterifikacije sa bor(III)-fluoridom metodom gasne hromatografije (CG-FID)	122
4.9. Određivanje antioksidativne aktivnosti cijanobakterija <i>in vitro</i>	131
4.9.1. Rezultati određivanja kapaciteta „hvatanja“ DPPH• radikala	131
4.9.2. Rezultati određivanja redoks kapaciteta FRAP metodom	133
4.10. Hemijska analiza fenolnog sastava cijanobakterija primenom LC/MS-MS analize	136
4.11. Detekcija toksičnosti cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema	141
4.11.1. <i>Artemia salina</i> bioesej	142
4.11.2. <i>Daphnia magna</i> bioesej	145
4.11.3. <i>Danio rerio</i> bioesej	147
4.12. qPCR metoda i ispitivanje efekta ekstrakta odabranog cijanobakterijskog soja na ekspresiju 11 gena uključenih u signalne puteve kod model organizma <i>Danio rerio</i>	154
4.13. Utvrđivanje toksigeničnosti cijanobakterija i detekcija prisutva <i>mcy</i> gena PCR metodom	160
5. ZAKLJUČAK	165
6. LITERATURA	168
7. PRILOZI	201

## SKRAĆENICE

**AChE** - acetilholinesteraza (*acetylcholinesterase*)  
**AhR** - aril-hidrokarbonski receptor (*aryl hydrocarbon receptor*)  
**ahr2** gen- gen koji kodira aril hidrokarbonski receptor 2 (*aryl hydrocarbon receptor 2*)  
**ALA** -  $\alpha$ -linoleinska kiselina  
**APC** – alofikocijanin (*allophycocyanin*)  
**APX** - askorbatna peroksidaza (*ascorbate peroxidase*)  
**AR** – androgeni receptor (*androgene receptors*)  
**Ara** - arabinoza  
**ARA** – arahidonska kiselina (*arachidonic acid*)  
**ASW** – veštačka morska voda (*artificial sea water*)  
**ATP** - adenzin trifosfat (*adenosine triphosphate*)  
**ATCC** – Američka kolekcija kultura (*American type culture collection*)  
**BAM** – biološki aktivne materije  
**bip** gen– gen koji kodira vezujući imunoglobulinski protein (*binding immunoglobulin protein*)  
**bp** – bazni parovi (*base pair*)  
**BLP** – biološke lesne pokorice  
**BMAA** -  $\beta$ -metilamino-L-alanin  
**BZP** - biološke zemljišne pokorice  
**cat** gen– gen koji kodira katalazu (*catalase*)  
**CAT** – katalaza (*catalase*)  
**CG-FID** – gasna hromatografija sa plameno jonizacionim detektorom  
**cry5** gen– gen koji kodira kriptohrom 5 (*cryptochrome*)  
**CYN** – cilindrospermopsin (*cylindrospermopsin*)  
**cyp1a1** gen– gen koji kodira citohrom P450, familija 1, potfamilija 1 (*cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*)  
**DarT test** – *Danio rerio* test (*Danio rerio teratogenic assay*)  
**DHA** - dokozahexaenoinska kiselina  
**D-MeAsp** – D-eritro- $\beta$ -metil asparaginska kiselina  
**DMSO** - dimetil sulfoksid (*dimethyl sulfoxide*)  
**DPPH• radikal** - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal  
**DRE** - dioksin odgovorni elementi (*dioxin responsive elements*)  
**ELISA** – enzimski imuno-vezujući test (*enzyme-linked immunosorbent assay*)  
**EPA** - eikozapentaenoinska kiselina  
**EPS**- ekstracelularne polimerne supstance (*extracellular polymeric substances*)  
**ER** - estrogeni receptor (*estrogen receptors*)  
**FET** – testovi toksičnosti sa embrionima riba (*fish embryo toxicity test*)  
**Gal** - galaktoza  
**GC** – gasna hromatografija (*gas chromatography*)  
**GLA** -  $\gamma$ -linoleinska kiselina  
**Glc** - glukoza  
**GR** – glutation reduktaza (*glutathione reductase*)  
**GST** - glutation S-transferaze (*glutathione s-transferase*)  
**HPLC** - tečna hromatografija visokih performansi (*high performance liquid chromatography*)  
**IARC** – Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*)  
**ICNB** – Međunarodni kodeks nomenklature bakterija (*International Code of Nomenclature of Bacteria*)  
**ICBN** – Međunarodni kodeks botaničke nomenklature (*International Code of Botanical Nomenclature*)  
**LC/MS** - tečna hromatografija-masena spektrometrija (*liquid chromatography–mass spectrometry*)  
**LPS** – lipopolisaharidi (*lipopolysaccharides*)  
**MALDI-TOF-MS** - matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-time of flight-masena spektrometrija (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*)  
**Man** - manoza  
**MBC** – minimalna baktericidna koncentracija (*minimum bactericidal concentration*)  
**MC-LR** - mikrocistin LR (leucin arginin)  
**MC-RR** - mikrocistin RR (arginin arginin)  
**mcy** gen– gen koji kodira mikrocistin (*microcystins*)  
**MC-YR** - mikrocistin YR (tirozin arginin)  
**Mdha** – N-metildehidroalanin  
**MIC** – minimalna inhibitorna koncentracija (*minimum inhibitory concentration*)

**MLST** – multilokusno sekvencioniranje (*multi-locus sequence typing*)  
**M-MLV RT** – enzim reverzna transkriptaza (*moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*)  
**MPB** - mesopeptonski bujon  
**MUFA** - mononezasićene masne kiseline (*monounsaturated fatty acid*)  
**nAChR** – nikotinski acetilholinski receptori (*nicotinic acetylcholine receptors*)  
**NOD** - nodularin  
**nr1d1** gen– gen koji kodira nuklearni receptor, potfamilija 1, grupa d (*nuclear receptor subfamily 1, group d, member 1*)  
**NRPS** - neribozomalna peptid sintetaza (*non ribosomal peptide synthetase*)  
**NSCCC** – Novosadska kolekcija kultura cijanobakterija (*Novi Sad culture collection of cyanobacteria*)  
**OATP** - organski anjonski transportni polipeptidi (*organic anion transporting polypeptides*)  
**OPP** - oksidativni pentoza fosfatni put (*oxidative pentose phosphate pathway*)  
**p53** gen – gen koji kodira tumor supresorski protein p53 (*p53 tumor suppressor*)  
**PC** – fikocijanin (*phycocyanin*)  
**PCC** - Pasterova kolekcija kultura (*Pasteur culture collection*)  
**PCR** – reakcija lančanog umnožavanja (*polymerase chain reaction*)  
**PE** – fikoeritrin (*phycoerythrin*)  
**per1a** gen– gen koji kodira protein cirkadijalnog ritma (*period circadian clock 1a*)  
**PKS** - poliketid sintaza (*polyketide synthases*)  
**PP1 esej** – esej inhibicije enzima protein fosfataze 1  
**PPP** – put pentoza fosfata (*pentose phosphate pathway*)  
**PSP** - paralitičko trovanje školjkama (*paralytic shellfish poisoning*)  
**PUFA** - polinezasićene masne kiseline (*polyunsaturated fatty acids*)  
**qPCR** – kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja (*quantitative PCR*)  
**RA** - retinoinjska kiselina (*retinoic acid*)  
**ROS** - reaktivne kiseonične vrste (*reactive oxygen species*)  
**rpl** gen– gen koji kodira ribozomalni-protein L (*ribosomal protein L*)  
**SFA** - zasićene masne kiseline (*saturated fatty acid*)  
**SOD** - superoksid dismutaza (*superoxide dismutase*)  
**sod** gen– gen koji kodira superoksid dismutazu (*superoxid dismutase*)  
**STX** - saksitoksin (*saxitoxin*)  
**TCA** - ciklus trikarboksilnih kiselina (*tricarboxylic acid cycle*)  
**TLC** – tankoslojna hromatografija (*thin-layer chromatography*)  
**UFA** - ukupne nezasićene masne kiseline (*unsaturated fatty acid*)  
**UV** - ultraljubičasto zračenje  
**USEPA** – Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (*United States Environment Protection Agency*)  
**vtg1** gen– gen koji kodira vitelogenin 1 (*vitellogenin 1*)  
**Xyl** - ksiloza

## 1. UVOD

### 1.1. Opšti deo

Cijanobakterije, poznate još kao i modrozeleni alge, predstavljaju jednu od najstarijih grupa prokariotski mikroorganizama (Golubic i Seong-Joo, 1999). Na osnovu opsežnih analiza molekularnih, fizioloških, paleontoloških, geohemijskih podataka, kao i na osnovu nalaza prvog pojavljivanja specijalizovanih ćelija (heterocista i akineta) karakterističnih za cijanobakterije, procenjuje se da su cijanobakterije stare između 2,54 i 2,1 milijarde godina (Dvořák, 2013). Kao jedna od najstarijih grupa fotoautotrofnih mikroorganizama, cijanobakterije predstavljaju široko rasprostranjene prokariote sa raznovrsnim metaboličkim strategijama u cilju preživljavanja i adaptacije na različite uslove životne sredine. Cijanobakterije, Gram negativne autotrofne bakterije, poseduju širok spektar metaboličkih puteva i adaptivnih mehanizama, uključujući azotofiksaciju, hromatsku adaptaciju kao i sposobnost formiranja simbiotskih odnosa sa eukariotskim domaćinima poput biljaka, gljiva i protista (Bergman i Ran, 2008). Pored sposobnosti vršenja oksigene fotosinteze određene vrste cijanobakterija mogu da vrše i anoksičnu fotosintezu koristeći sulfid kao donor elektrona (Cohen i sar., 1986) dok u anoksičnim uslovima i u mraku cijanobakterije poseduju sposobnost vršenja fermentacije (Stal i Moezelaar, 1997).

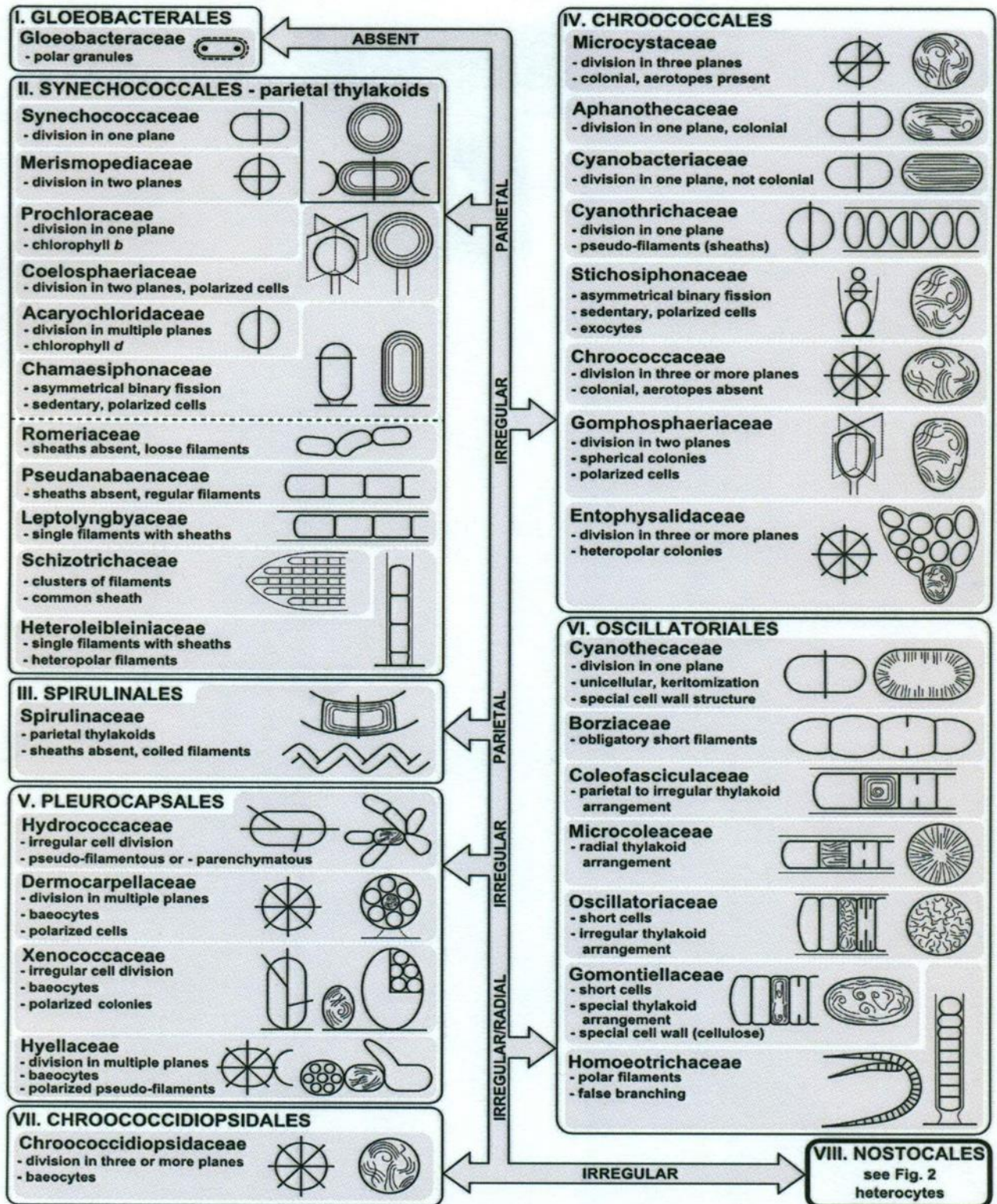
Kao rezultat duge istorije i preživljavanja u raznovrsnim staništima cijanobakterije pokazuju sposobnost produkcije širokog spektra sekundarnih metabolita sa specijalizovanim funkcijama u cilju uspešnog prilagođavanja uslovima životne sredine (Rastogi i Sinha, 2009). Pored primarnog metabolizma, sekundarni metabolizam takođe ima izuzetan značaj kod cijanobakterija (Dos Santos i sar., 2005). Upravo zbog toga, cijanobakterije predstavljaju izuzetno zanimljivu grupu mikroorganizama kao producenta različitih biološki aktivnih metabolita. Sposobnost cijanobakterija da sintetišu mnogobrojne kompleksne sekundarne metabolite različitih hemijskih struktura poput ne-ribozomalnih peptida, depsipeptida, poliketida, alkaloida i dr. sve više predstavlja interesovanje mnogih istraživanja u cilju njihove farmakološke i biotehnološke primene (Thajuddin i Subramanian, 2005; Sielaff i sar., 2006; Spolaore i sar., 2006). Danas, cijanobakterije su poznate kao potencijalni producenti toksina (Simeunović, 2010) kao i neobičnih bioaktivnih jedinjenja sa mogućnošću farmaceutske aplikacije (Raja i sar., 2008; Abed i sar., 2009). Međutim, većina studija o cijanobakterijama uglavnom je vezana za cijanobakterije vodenih ekosistema i studije terestričnih cijanobakterija daleko zaostaju iza istraživanja cijanobakterija slatkovodnih i morskih ekosistema (Neustupa i Škaloud, 2010). Iz tog razloga, istraživanja terestričnih cijanobakterija, naročito izolata ekstremnih staništa od izuzetne je važnosti zbog mogućnosti ispitivanja metaboličkih strategija i sposobnosti produkcije raznovrsnih bioaktivnih jedinjenja.



### 1.1.1. Morfološke karakteristike cijanobakterija

U morfološkom pogledu cijanobakterije se odlikuju relativno jednostavnom građom talusa koji može biti na jednoćelijskom, kolonijalnom i filamentoznom stupnju organizacije (Rippka, 1988a). U slučaju filamentoznih predstavnika, končasti talusi mogu da obrazuju lažnoparenhimske kolonije ili mogu imati hormogonijalnu građu. Kod predstavnika koji imaju hormogonijalnu građu, ćelije raspoređene u jednom nizu grade trihom koji može biti homocitan (izgrađen od istovetnih ćelija) ili heterocitan (osim tipičnih vegetativnih ćelija nalaze se i druge specijalizovane ćelije – akineti, heterociste i hormogonije) (Blaženčić, 2000). Trihom može biti ravan ili spiralan pri čemu filamentozne cijanobakterije pokazuju veliku varijabilnost u odnosu na veličinu i oblik ćelija. Cijanobakterije koje pripadaju redu *Oscillatoriales* imaju linearne ngranate trihome, izgrađene od identičnih vegetativnih ćelija, homocitne trihome koji se sreću kod predstavnika roda *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Phormidium*, *Lyngbya* itd. (Blaženčić, 2000). Međutim, važne morfološke karakteristike značajne za klasifikaciju između različitih familija reda *Oscillatoriales* su organizacija tilakoida, oblik vegetativnih ćelija, sposobnost lažnog grananja itd. (Slika 1) (Komárek i sar., 2014). Na primer, mnoge vrste roda *Lyngbya* poseduju veoma debele, višeslojne i dobro organizovane lepljive omotače koji predstavljaju važan taksonomski karakter (Stal, 2007). Pored roda *Lyngbya*, sara je takođe prisutna i kod predstavnika roda *Phormidium*. U poređenju sa debelom, višeslojnom sarom karakterističnom za rod *Lyngbya*, vrste roda *Phormidium* poseduju mekanu saru koja obezbeđuje povezivanje filamenata i formiranje karakterističnih „kožastih“ prevlaka (Blaženčić, 2000).

Za razliku od predstavnika reda *Oscillatoriales* za koje je karakteristično da imaju trihome izgrađene samo iz jednog tipa ćelija, vegetativnih ćelija, pripadnici reda *Nostocales* i reda *Stigonematales* imaju trihome koji su izgrađeni iz različitih tipova ćelija, heterocitni trihomi. U heterocitnim trihomima pored vegetativnih ćelija nalaze se još i drugi tipovi specijalizovanih ćelija poput: heterocista, akineta i hormogonija (Singh i Montgomery, 2011). Heterociste nastaju diferencijacijom vegetativnih ćelija i imaju ulogu fiksacije azota u uslovima nedostatka azota u okruženju (Kumar i sar., 2010). Takođe, u odnosu na vegetativne ćelije heterociste su krupnije sa zadebljalim ćelijskim zidom izgrađenim iz još tri dodatna sloja. Preko nezadebljalog dela zida koji se naziva pora ili samo kanal pore odvija se komunikacija između heterocista i susednih vegetativnih ćelija (Blaženčić, 2000). Akineti predstavljaju ćelije slične sporama bakterija koje nastaju terminalnom diferencijacijom vegetativnih ćelija (Rippka i sar., 1979; Kaplan-Levy i sar., 2010). Za razliku od heterocista, akineti su daleko krupniji od vegetativnih ćelija (Kaplan-Levy i sar., 2010; Flores i Herrero, 2010), zid akineta je kontinuiran i intracelularni sadržaj akineta je bogat rezervnim hranljivim supstancama, posebno cijanoficinskih zrnica (rezervnim supstancama bogatim lipoproteidima) (Blaženčić, 2000). Uloga akineta ogleda se u obezbeđivanju preživljavanja nepovoljnih uslova spoljašnje sredine ili nepovoljnih uslova u kulturi (Flores i Herrero, 2010). Hormogonije predstavljaju kratke filamente cijanobakterija izgrađene iz ćelija manjih dimenzija koje pokazuju sposobnost kretanja i predstavljaju jedan od najčešćih načina razmnožavanja kod končastih cijanobakterija (Rippka i sar., 1979; Blaženčić, 2000). Pored toga, hormogonije imaju važnu ulogu u rasprostranjenju i u formiranju simbiotskih odnosa sa drugim organizmima (Wong i Meeks, 2002; Adams i Duggan, 2008).

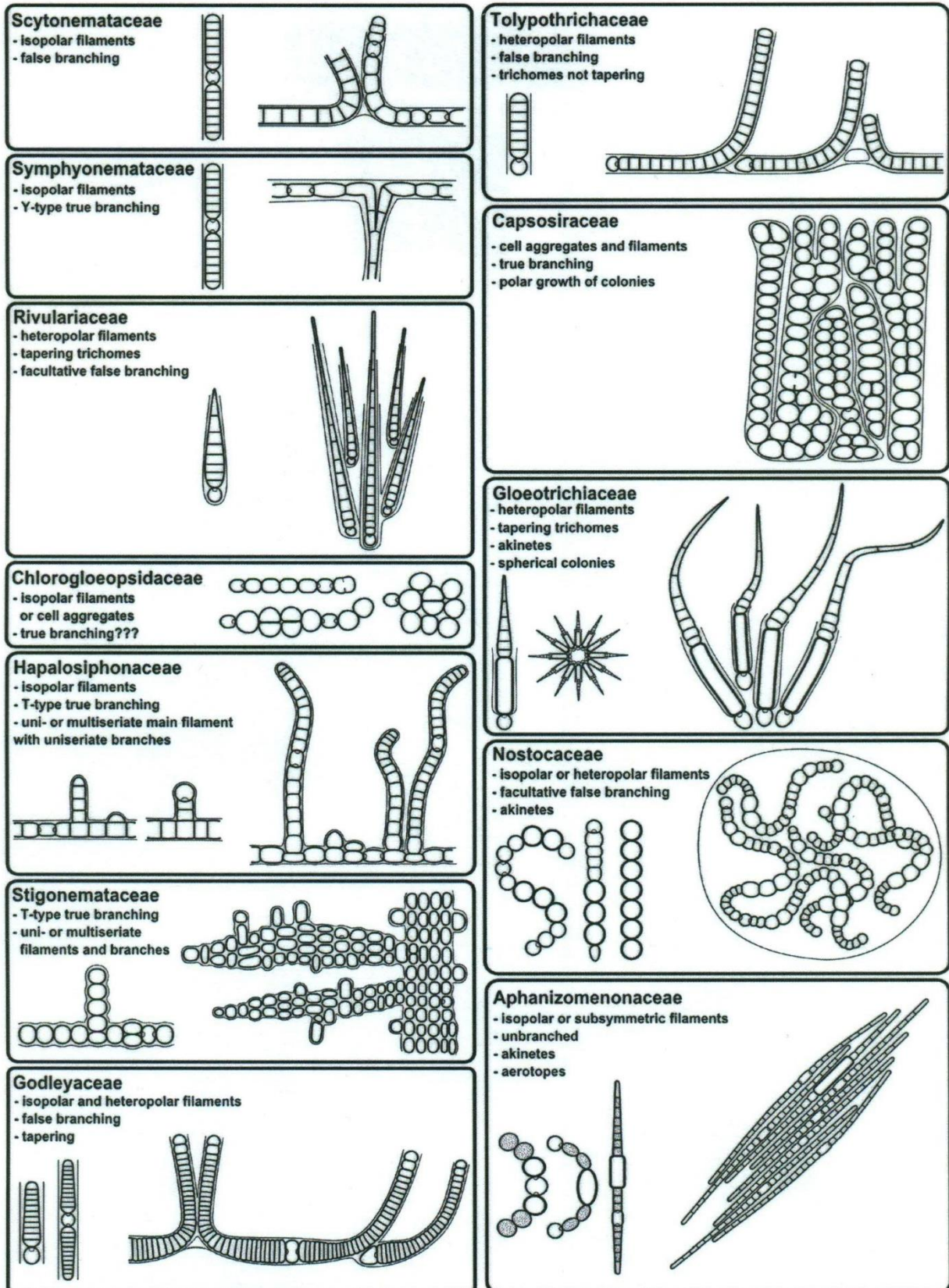


Slika 1. Šematski prikaz cijanobakterijskih redova i familija sa važnim morfološkim taksonomskim karakteristikama koje se koriste za njihovo međusobno razlikovanje (Komárek i sar., 2014)

Prisustvo specijalizovanih ćelija u talusu (heterocista za fiksaciju azota, akineta za preživljavanje u stresnim uslovima i hormogonija za rasprostranjenje i razmnožavanje), karakteristično za pojedine grupe cijanobakterija, spada u taksonomski značajna svojstva cijanobakterija (Rippka, 1988a; Gupta i sar., 2013). U slučaju heterocista, njihov položaj u trihomu specifičan je za određene rodove cijanobakterija. U zavisnosti od mesta na kome se nalaze u trihomu heterociste mogu biti: bazalne (rod *Rivularia*), terminalne (rod *Cylindrospermum*), interkalarne (*Nostoc*, *Anabaena*) i lateralne (neke *Stigonematales*) (Blaženčić, 2000). Pored toga, neke morfološke karakteristike koje se takođe uzimaju u obzir prilikom klasifikacije cijanobakterija u odgovarajuće familije predstavljaju još: izgled filameta (izopolarni ili heteropolarni filamenti); sposobnost grananja filameta (lažno ili pravo grananje); tip grananja u slučaju pravog grananja (T tip ili Y tip); sposobnost formiranja akineta; izgled filameta; izgled kolonija itd. (Slika 2).

U pogledu razmnožavanja, polni način razmnožavanja kod cijanobakterija još uvek nije utvrđen (Palinska i Surosz, 2014). Kod jednoćelijskih predstavnika razmnožavanje se odvija binarnom deobom majke ćelije od koje nastaju ćerke ćelije. Kod filamentoznih predstavnika razmnožavanje se odvija fragmentacijom trihoma, ili formiranjem pokretnih hormogonija koje predstavljaju različite reproduktivne segmente trihoma (Mur i sar., 1999). Obrazovanje hormogonija odvija se na mestima gde se nalaze specijalizovane ćelije - nekridije, odnosno obrazovanje hormogonija nije prosto mehaničko razdeljivanje. Pored toga, kod nekih vrsta filamentoznih predstavnika razmnožavanje se može odvijati: hormocistama (grupe ćelija obavijene zajedničkim debelim zidom); gonidijama i kokama (jednoćelijski fragmenti); planokokama. Takođe, kod nekih predstavnika bespolan način razmnožavanja može se odvijati i formiranjem različitih tipova spora: egzospora (nastaju odvajanjem od vrha talusa) i endospora ili beocita (predstavljaju male mnogobrojne ćelije koje nastaju deobom unutar majke ćelije) (Blaženčić, 2000).





Slika 2. Šematski prikaz familija iz reda *Nostocales* sa važnim morfološkim taksonomskim karakteristikama koje se koriste za njihovo međusobno razlikovanje (Komárek i sar., 2014)

## 1.1.2. Klasifikacija

Cijanobakterije (*Cyanophyta*, *Cyanophyceae*, *Cyanoprokaryota*, *Cyanobacteria*) su prvi put prepoznate kao zasebna grupa organizama tokom 19. veka (Dvořák, 2013). *Cyanophytes* tradicionalno su klasifikovane kao modrozelenne alge s obzirom da se prvobitna klasifikacija cijanobakterija bazirala isključivo na morfološkim karakteristikama izolovanih organizama (Palinska i Surosz, 2014). Najvažnije morfološke karakteristike korišćene pri klasifikaciji cijanobakterija kao modrozelenih algi bile su dimenzija ćelija, morfologija ćelija/filamenata, tip ćelijske deobe i prisustvo/odustvo omotača (Thuret, 1875; Bornet i Flahault 1887-1888, Gomont, 1892). Prva obimna taksonomska monografija modrozelenih algi napisana je 1892. godine od strane Gomont (1892). Ujedno, ova monografija prepoznata od strane fikologa predstavljala je polaznu tačku u taksonomskoj klasifikaciji prema kojoj su modrozelenne alge klasifikovane u 7 redova: *Chroococcales*, *Entophysalidales*, *Pleurocapsales*, *Dermocarpales*, *Siphononematales*, *Nostocales* i *Stigonematales* (Geitler, 1925). Međutim, nakon nekoliko godina Geitler je prihvatio sistem klasifikacije predložen od strane Frey (1929) na osnovu koga je izvršena klasifikacija u 3 reda: *Chroococcales*, *Chamaesiphonales* i *Hormogonales* (Geitler, 1932). Prema sistemu klasifikacije Geitler (1932) u okviru pomenuta tri reda nalazilo se 20 familija, 145 rodova i 1,300 vrsta. Klasifikacioni sistem Geitler (1932) bazirao se na morfologiji vrsta sakupljenih iz prirode i ovaj klasifikacioni sistem označio je ujedno i početak moderne ere sistematike cijanobakterija (Palinska i Surosz, 2014). Nakon 10 godina, izvršena je revizija klasifikacionog sistema Geitler (1932) prema kojoj je urađena podela cijanobakterija na 4 reda: *Chroococcales*, *Dermocarpales*, *Pleurocapsales* i *Hormogonales* (Geitler, 1942). Ovaj sistem klasifikacije korišćen je naredne 24 godine uz vrlo male modifikacije (Elenkin 1938-1949; Starmach, 1966) s obzirom da su se svi predloženi sistemi klasifikacije nakon rada Geitler (1932) bazirali na sistematici *Cyanophytes* na osnovu tradicionalnih botaničkih kriterijuma (Elenkin, 1938-1949; Desikachary, 1959; Fritsch, 1959; Starmach, 1966; Kondrateva, 1968; Golubic, 1976). Savremena klasifikacija cijanobakterija prema botaničkim kriterijumima prikazana je u Tabeli 1.

Tabela 1. Klasifikacija cijanobakterija kao modrozelenih algi zasnovana na botaničkim morfološkim kriterijumima (Blaženčić, 2000)

Klasa	Red	Familija	Rod
<i>Chroococcophyceae</i>	<i>Chroococcales</i>	<i>Coccobactraceae</i>	<i>Synechocystis</i> , <i>Synechococcus</i>
		<i>Merismopediaceae</i>	<i>Merismopedia</i>
		<i>Microcystidaceae</i>	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanotheca</i>
		<i>Gloeocapsaceae</i>	<i>Gloeocapsa</i> , <i>Gloeotheca</i> , <i>Lucapsis</i>
		<i>Coelosphaeriaceae</i>	<i>Coelosphaerum</i>
		<i>Gomphosphaeriaceae</i>	<i>Gomphisphaeria</i>
		<i>Woronichiniaceae</i>	<i>Woronichinia</i>
<i>Chamaesiphonophyceae</i>	<i>Entophysalidales</i>	<i>Entophysalidaceae</i>	<i>Entophysalis</i> , <i>Chlorogoea</i>
		<i>Pleurocapsales</i>	<i>Pleurocapsa</i> , <i>Radaisia</i>
		<i>Dermocarpaceae</i>	<i>Dermocarpa</i>
	<i>Chamaesiphonales</i>	<i>Chamaesiphonaceae</i>	<i>Chamaesiphon</i>

<i>Hormogoniophyceae</i>	<i>Stigonematales</i>	<i>Stigonemataceae</i>	<i>Stigonema, Hapalosiphon</i>
	<i>Mastigocladales</i>	<i>Mastigocladaceae</i>	<i>Mastigocladus</i>
	<i>Nostocales</i>	<i>Nostocaceae</i>	<i>Nostoc</i>
		<i>Anabaenaceae</i>	<i>Anabaena, Anabaenopsis</i>
		<i>Aphanizomenonaceae</i>	<i>Aphanizomenon</i>
		<i>Scytonemataceae</i>	<i>Scytonema, Tolypothrix</i>
		<i>Rivulariaceae</i>	<i>Calothrix, Rivularia, Gloeotrichia</i>
	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Oscillatoria, Spirulina, Lyngbya, Phormidium</i>

Međutim, krajem 70-ih godina prošlog veka druga grupa istraživača predložila je da sistematska klasifikacija cijanobakterija bude bazirana na bakteriološkim kriterijumima s obzirom da modrozelenne alge predstavljaju prokariote (Waterbury i Stanier, 1977; Krumbein, 1979; Rippka i sar., 1979). Detaljne citološke i biohemijske studije bakteriologa rađene na aksemnim kulturama sojeva cijanobakterija dovele su do promene naziva *Cyanophyceae* u cijanobakterije i predložena je njihova klasifikacija u okviru domena Bakterija (Stanier i sar., 1978). Revizija cijanobakterijskih rodova oslanjala se dosta na morfološke karakteristike fikološkog pristupa Geitler-a, ali je takođe uzimala u obzir mnoge opšte bakteriološke kriterijume u saglasnosti sa mogućnostima ekspresovanim u kulturama (Castenholz i Waterbury, 1989). Na primer, sojevi iste vrste tj. „morfovrste“ često se razlikuju jedna od druge i pokazuju visoku varijabilnost u svojoj morfologiji u zavisnosti od uslova gajenja (Gugger i sar., 2002; Gupta i Agrawal 2006, 2008) što dalje može dovesti do velikih grešaka u identifikaciji sojeva u kolekcijama kultura cijanobakterija. Shodno tome, cijanobakterije u kulturama označavane su na osnovu imena roda sa odgovarajućim kodom soja (Palinska i Surosz, 2014). Međutim, korišćenjem ovog pristupa od strane nekih bakteriologa i izbegavanje korišćenja fenotipskih opisa vrsta (fikološki pristup) doveo je do ogromnog potcenjivanja diverziteta cijanobakterija u prirodi (Palinska i Surosz, 2014). Shodno tome, trenutna klasifikacija cijanobakterija prema Bergey priručniku za identifikaciju bakterija, obuhvata informacije iz bakteriološkog i fikološkog pristupa (Castenholz, 2001; Palinska i Surosz, 2014) prema kojoj cijanobakterije čine monofiletičku grupu u okviru domena Bakterija (Castenholz, 2001). Prema ovoj klasifikaciji, cijanobakterija su podeljene na pet pododeljaka umesto redova (I-V). Klasifikacija cijanobakterija u pet sekcija prema Rippka i sar. (1979) predstavlja primarnu osnovu klasifikacije cijanobakterija u Bergey priručniku za identifikaciju bakterija.

Na osnovu modernog bakteriološkog sistema, cijanobakterije su klasifikovane u sledećih pet pododeljaka umesto redova: I (*Chroococcales*), II (*Pleurocapsales*), III (*Oscillatoriales*), IV (*Nostocales*) i V (*Stigonematales*) (Castenholz, 2001). Na osnovu datog sistema, jednoćelijske cijanobakterije klasifikovane su u pododeljak I i II (Tabela 2). Unutar pododeljka I, jednoćelijska vrsta *Gleobacter violaceus* predstavlja izuzetak u odnosu na ostale vrste cijanobakterija zbog nedostatka tilakoida (Rippka i sar., 1974) i stoga se filogenetski nalazi duboko unutar pododeljka I. Cijanobakterije koje pripadaju pododeljku I razmnožavaju se binarnom deobom. Za razliku od pripadnika pododeljka I, cijanobakterije pododeljka II pored binarne deobe mogu se razmnožavati i multiplom deobom. Pored toga, cijanobakterije pododeljka II mogu formirati veliki broj malih ćerki ćelija nazvanih beocite, iz kojih nastaju ćelije normalne veličine. Filamentozne cijanobakterije klasifikovane su u pododeljke III, IV i V. Pododeljak III sastoji se iz filamentoznih cijanobakterija čiji su talusi izgrađeni iz samo jednog tipa ćelija, odnosno iz vegetativnih ćelija (*Oscillatoriales*). Sa druge strane, u okviru



pododeljka IV i V nalaze se filamentozne cijanobakterije koje imaju sposobnost diferencijacije ćelija, što inače predstavlja redak fenomen kod prokariota. Pored toga, sve cijanobakterije koje pripadaju pododeljku IV i V sposobne su da fiksiraju atmosferski N<sub>2</sub>. Proces fiksacije N<sub>2</sub> odvija se u specijalizovanim ćelijama, heterocistama, koje čine 5-10% ćelija prisutnih u trihomu. Za razliku od vegetativnih ćelija, heterociste ne rastu i ne podležu deobi, odnosno njihova uloga je fiksacija atmosferskog azota - azotofiksacija. Pored sposobnosti formiranja heterocista koje nastaju diferencijacijom vegetativnih ćelija, mnoge vrste koje pripadaju pododeljcima IV i V takođe imaju i sposobnost formiranja akineta. Akineti, koji nastaju diferencijacijom vegetativnih ćelija, predstavljaju ćelije sposobne da prežive produžene periode isušivanja, hladnoće, nedostatka nutrijenata i drugih nepovoljnih uslova spoljašnje sredine (Adams i Duggan, 1999). U povoljnim uslovima spoljašnje sredine dolazi do germinacije akineta i proliferacije cijanobakterija pri čemu je pokazano da vijabilnost akineta može biti zadržana i posle nekoliko decenija. Takođe, karakteristika predstavnika pododeljaka IV i V predstavlja i formiranje hormogonija, malih pokretnih neheterocistnih trihoma sačinjenih iz sićušnih ćelija, koje imaju ulogu u rasprostranjenju organizma. Cijanobakterije koje pripadaju pododeljku V razlikuju se od pripadnika pododeljka IV zbog mogućnosti pravog grananja trihoma koje nastaje usled deoba ćelija u više od jedne ravni (Stal, 2007).

Tabela 2. Modifikovana klasifikacija cijanobakterija izvršena nakon klasifikacije Rippka i sar. (1979) (Bay, 2013)

Grupa	Ćelijska organizacija	Reprodukcija	Reprezentativni rodovi	Sposobnost fiksacije azota
I	Jednoćelijski	Binarna deoba	<i>Cyanothece spp.</i> <i>Synechococcus spp.</i> <i>Synechocystis spp.</i>	Da <sup>1</sup> Ne <sup>1,4</sup> Da <sup>1</sup>
II	Jednoćelijski	Multipla deoba	<i>Chroococidiopsis spp.</i> <i>Cyanocystis spp.</i> <i>Dermocarpa spp.</i>	Da <sup>1</sup> Ne <sup>2</sup> Ne <sup>3</sup>
III	Filamentozni bez heterocista	Slučajan prekid filameta i podela u samo jednoj ravni	<i>Oscillatoria spp.</i> <i>Pseudoanabaena spp.</i> <i>Spirulina spp.</i>	Da <sup>1</sup> Da <sup>1</sup> Ne <sup>3</sup>
IV <sup>5</sup>	Filamentozni sa heterocistama	Slučajan prekid filameta i podela u samo jednoj ravni	<i>Calothrix spp.</i> <i>Cylindrospermum spp.</i> <i>Nostoc spp.</i>	Da <sup>3</sup> Da <sup>1</sup> Da <sup>3</sup>
V <sup>5</sup>	Filamentozni sa heterocistama	Slučajan prekid filameta i podela u više od jedne ravni	<i>Chlorogloeopsis spp.</i> <i>Fischerella spp.</i> <i>Stigonema spp.</i>	Da <sup>3</sup> Da <sup>3</sup> Da <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bergman i sar., 1997; <sup>2</sup>Palińska i sar., 2012; <sup>3</sup>Young, 1992; <sup>4</sup>Gugger i Hoffman, 2004; <sup>5</sup>Bay, 2013

Međutim, postojanje dva nezavisna kodeksa klasifikacije, kodeksa botaničke nomenklature na osnovu fikološkog pristupa (od 2012; Međunarodni kodeks nomenklature algi, gljiva i biljaka; Oren, 2014) i kodeksa nomenklature bakterija, za jednu istu grupu organizama doveo je do nastanka ogromnih problema u klasifikaciji cijanobakterija (Oren, 2014; Oren i Garrity, 2014). Pored toga, pravila kodeksa botaničke nomenklature razlikuju se od pravila kodeksa nomenklature bakterija što dovodi do razilaženja ovih sistema nomenklature. Imena cijanobakterija opisana i punovažno publikovana kao modrozelenne alge u Međunarodnom kodeksu botaničke nomenklature (ICBN) nisu prisutna u nomenklaturi bakterija, sem ako date

vrste cijanobakterija nisu ponovo opisane pod pravilima Međunarodnog kodeksa nomenklature bakterija (ICNB) (Palinska i Surosz, 2014).

U cilju prevazilaženja nastalih nesuglasica u sistematici cijanobakterija, dato je nekoliko predloga za kreiranje kompatibilnih sistema klasifikacije korišćenjem oba kodeksa s obzirom da ni ICNB kao i ICBN nisu u potpunosti odgovarajući za fotoautotrofne prokariote (Palinska i Surosz, 2014). Komárek i Anagnostidis (1999, 2005) su razvili formalni sistem klasifikacije koji se nalazi između bakteriološkog i botaničkog pristupa. Ovaj sistem nomenklature bazira se na botaničkim taksonomskim kriterijumima, ali takođe uzima u obzir i bakteriološke i molekularne podatke (Palinska i Surosz, 2014). Komárek i sar. (2014) su istakli da je duga i veoma kompleksna evolutivna istorija cijanobakterija, nastala kao rezultat horizontalnog genskog transfera na šta ukazuje njihova homoplazija (pojavljivanje određenog karaktera kod organizama koji nije postojao kod njihovog zajedničkog pretka), doprinela otežanoj klasifikaciji cijanobakterija samo na osnovu morfoloških karakteristika (Komárek, 2013). Tokom evolucije, veliki broj morfoloških karakteristika korišćenih za definisanje viših taksona bio je izgubljen i/ili se pojavljivao tokom vremena kod današnjih savremenih vrsta i rodova cijanobakterija (Gugger i Hoffmann, 2004; Schirmer i sar., 2011; Komárek, 2013). Sa druge strane, neki fosilni predstavnici imaju morfologiju sličnu sa današnjim vrstama cijanobakterija (Schopf, 1974a,b; Knoll, 2008). Upravo zbog svega pomenutog, cijanobakterije (cijanoprokarioti) predstavljaju jednu od najizazovnijih grupa za klasifikaciju (Komárek, 2013).

Shodno tome, jedina prihvatljiva i preporučena metoda u modernoj taksonomskoj evaluaciji cijanobakterija predstavlja kombinovani pristup klasifikacije korišćenjem fenotipskih karakteristika, ultrastukturnih karakteristika, ekoloških, biohemijskih i molekularnih metoda (Palinska i Surosz, 2014). Odnosno, primena kombinovanog pristupa smatra se jedinstvenim, modernim, nedvosmislenim i potpuno prihvatljivim metodološkim postupkom (Komárek, 2016). Prema Komárek i sar. (2014) koncept više ili manje regularnog cijanobakterijskog roda na osnovu modernih kriterijuma klasifikacije treba da sadrži:

- 1) jedinstvenu filogenetsku poziciju, sa jasnom nepovezanošću (oko 95% ili ispod 95% sličnosti) sa najbližom sestrinskom kladom vrsta u drugom rodu na osnovu 16S rRNK genske sekvence;
- 2) jasnu morfološku odvojenost od drugog najbližeg generičkog entiteta, sa jasnim odsustvom bilo kog važnog citomorfološkog karaktera ili sa posebnim i jedinstvenim biološkim specifičnostima (načinom deobe, načinom formiranja heterocista ili akineta, i dr.);
- 3) povezanost sa ekološkom nišom (marinska/slatkovodna staništa, planktonski/zemljišni ekosistemi, ekstremni termalni ili specifični mineralni izvori, i dr.).

U cilju preciznije taksonomije cijanobakterija, upotreba molekularnih markera i analiza DNK sekvenci postala je ključni metod za razumevanje evolucije organizma (Dvořák, 2013). U saglasnošću sa ICNB, upotreba 16S rRNK gena postala je uobičajena u identifikaciji i klasifikaciji cijanobakterija, bilo kao jedini metod identifikacije ili u kombinaciji sa morfološkim, fenotipskim i ekološkim karakteristikama (Castenholz, 2001). 16S rRNK gen ima univerzalnu distribuciju kod prokariota i njegova funkcionalna konzistentnost u varijabilnim i očuvanim regionima i prilično visok sadržaj informacija čine ga dobrim filogenetskim genskim markerom. Pored toga, 16S rRNK genska sekvenca je relativno laka za poravnavanje i



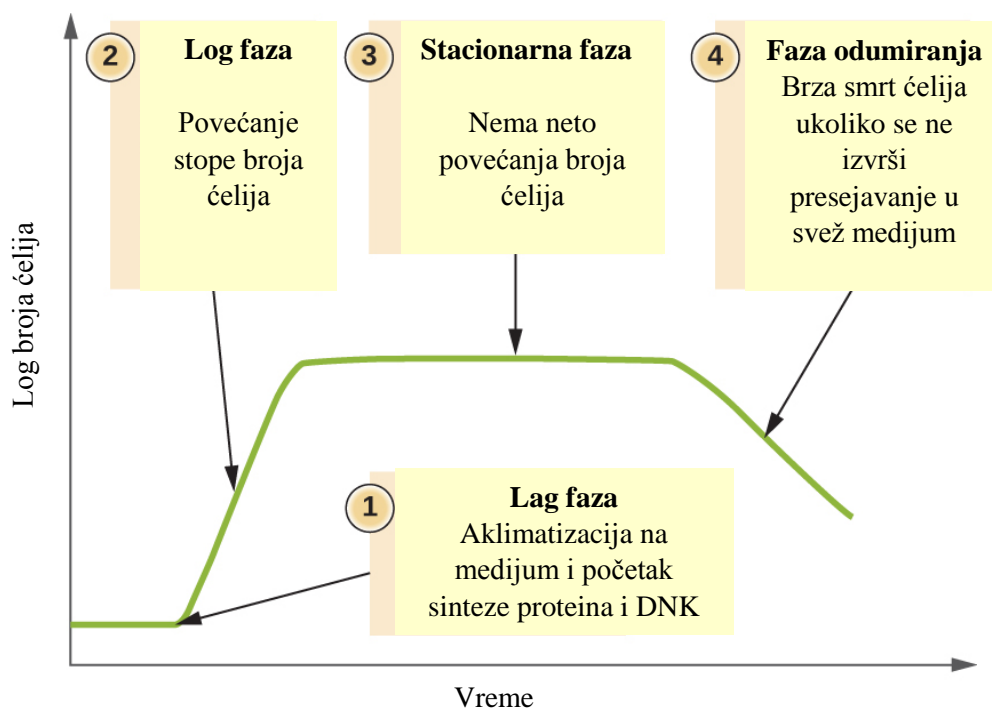
postojanje velike baze podataka omogućava komparativne analize između sekvenci. Iako je 23S rRNK gen duži od 16S rRNK gena, i shodno tome sadrži više informacija i omogućava bolju rezoluciju, postojanje daleko manje baze podataka u poređenju sa bazom podataka 16S rRNK gena predstavlja glavni nedostatak njegove upotrebe kao filogenetskog markera (Ludwig i Klenk, 2001). Pored toga, prisustvo korelacije između 16S rRNK gena i sličnosti celog genoma je doprinelo pouzdanosti upotrebe 16S rRNK gena prilikom određivanja filogenije cijanobakterija (Clarridge, 2004). Na osnovu sekvence 16S rRNK gena, jednoćelijski predstavnici reda *Pleurocapsales* i heterocistne cijanobakterije predstavljaju primere filogenetski i morfološki koherentnih grupa (Wilmotte i Herdman, 2001; Tomitani i sar., 2006). Korelacija između morfologije i 16S rRNK genske sekvence pokazala je dobru primenu u identifikaciji kod predstavnika reda *Oscillatoriales* (Pododeljak III), uključujući sledeće rodove: *Planktothrix* (Komárek, 2006), *Trichodesmium* (Wilmotte i Herdman, 2001), *Blennothrix* (Abed i sar., 2006), *Oscillatoria* (Simmons i sar., 2008), *Tychonema* (Komárek, 2006), *Arthrospira* (Komárek, 2006), *Spirulina* (Abed i sar., 2003).

Krajem 2013. godine korišćenjem kombinovanog pristupa predložena je klasifikacija cijanobakterija prikazana u Prilogu 1 (Komárek, 2013). Ipak, kombinovani pristup još uvek nije uobičajan metod klasifikacije niti je moguć za sve poznate cijanobakterije (Komárek, 2016).

### 1.1.3. Fiziologija cijanobakterija

U genetičkom pogledu cijanobakterije predstavljaju raznoliku grupu mikroorganizama koja često sadrži više kopija hromozoma pri čemu neke vrste sadrže i do 20 kopija hromozoma po ćeliji (Schneider i sar., 2007). U pogledu veličine genoma, najmanja veličina (od 1,6 do 2,4 Mbp) zabeležena je kod pikocijanobakterija (rod *Prochlorococcus*). Međutim, i pored male veličine genoma pikocijanobakterije predstavljaju „specijaliste“ sa sposobnošću preživljavanja nepovoljnih uslova spoljašnje sredine (Stal, 2007). Sa druge strane, najveći genom među cijanobakterijama ima filamentozna vrsta *Scytonema hofmanni* čija veličina genoma iznosi 12,073,012 bp. U genomu *Scytonema hofmanni* nalazi se 12,356 potencijalnih protein-kodirajućih gena. Pored toga, *Scytonema hofmanni* ne samo što ima najveći genom među cijanobakterijama već takođe ima najveći genom u odnosu na sve ostale prokarite (Dagan i sar., 2012). Upravo zbog svog genetičkog diverziteta, cijanobakterije poseduju sposobnost da prirodnim putem produkuju čitav niz različitih supstanci koje mogu imati široku komercijalnu primenu (Simeunović, 2005).

Pored toga, fleksibilnost metaboličkih puteva kod cijanobakterija najbolje se ogleda u njihovoj sposobnosti da pored primarnih metabolita produkuju i čitav niz sekundarnih metabolita. U zavisnosti od faze rasta (lag faza, log faza, stacionarna faza, faza odumiranja), u ćelijama cijanobakterija odigravaju se intezivni biohemijski procesi primarnog odnosno sekundarnog metabolizma. Tokom logaritamske faze koja je optimalna za umožavanje ćelija vrši se sinteza metabolita primarnog metabolizma. Sa druge strane, tokom stacionarne faze vrši se produkcija sekundarnih metabolita odnosno biološki aktivnih materija (Slika 3) (Svirčev, 2005). Stacionarna faza obuhvata period kada se broj ili biomasa ćelija više ne uvećava, zbog čega se ova faza često naziva i faza ravnoteže – dinamičke ravnoteže. U poslednjoj fazi, fazi odumiranja dolazi do poremećaja dinamičke ravnoteže usled postojanja većeg broja ćelija koje odumiru usled pogoršanja uslova sredine. Vreme trajanja odumiranja varira između različitih vrsta i može da se kreće od nekoliko dana pa do nekoliko godina (Petrović i sar., 2007).



Slika 3. Kriva rasta cijanobakterija

(<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/how-microbes-grow/>)

Cijanobakterije su primarno fotoautotrofi i tokom primarnog metabolizma u autotrofnim uslovima dolazi do usvajanja neorganskog ugljenika u formi  $\text{CO}_2$  (Schwarz i sar., 2013). Međutim, veliki broj cijanobakterija može da koristi i organske izvore ugljenika tokom miksotrofne ishrane i poseduje sposobnost usvajanja glukoze kao organskog izvora ugljenika. U miksotrofnim uslovima, cijanobakterije mogu istovremeno da upotrebljavaju neorganski izvor ugljenika ( $\text{CO}_2$  preko Kalvinovog ciklusa), ali takođe i organski izvor ugljenika kao što su glukoza i acetat. Pored toga, mnoge cijanobakterije poseduju puteve za heterotrofno usvajanje organskog ugljenika poput uree (izvor i C i N), šećera i acetata (Wan i sar., 2015). Intermedijerna jedinjenja predstavljaju krajnje produkte primarnog metabolizma i služe za sintezu esencijalnih makromolekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline (Khattar i sar., 2009). Produkti primarnog metabolizma neophodni su za uobičajnu fiziologiju rasta mikroorganizama (Svirčev, 2005).

Pored primarnog metabolizma koji ima osnovnu ulogu u obezbeđivanju intermedijera neophodnih za sintezu esencijalnih makromolekula, sekundarni metabolizam takođe ima izuzetan značaj kod cijanobakterija (Dos Santos i sar., 2005). Kao rezultat genetičkog diverziteta, cijanobakterije pokazuju sposobnost produkcije širokog spektra sekundarnih metabolita sa specijalizovanim funkcijama u cilju uspešnog prilagođavanja uslovima životne sredine (Rastogi i Sinha, 2009). Za razliku od većine prokariota, kod kojih ne dolazi do akumulacije intermedijernih jedinjenja i krajnjih produkata primarnog metabolizma zbog odsustva genetičkog aparata za sintezu sekundarnih metabolita, cijanobakterije poseduju gene za produkciju sekundarnih metabolita. Odnosno, sekundarni metabolizam posledica je odsustva regulacije određenih procesa u primarnom metabolizmu. U uslovima metaboličkog stresa,

rezerve akumuliranih intermedijera mogu indukovati pomoćne puteve za aktivaciju sekundarnog metabolizma (Khattar i sar., 2009). Shodno tome, biosintetski putevi sekundarnog metabolizma predstavljaju visoko regulisane sisteme, odnosno, produkcija sekundarnih metabolita zavisi od aktiviranja odnosno gašenja gena uključenih u enzimske puteve (Skulberg, 2000).

Strukturni hemijski diverzitet prirodnih produkata cijanobakterija rezultat je modifikacija i kombinovanja reakcija primarnih metaboličkih puteva. Shodno tome, pojava potpuno novih reakcija u sekundarnom metabolizmu koje nisu prisutne u primarnom metabolizmu ukazuje na procese evolutivnog razvoja sekundarnog metabolizma (Khattar i sar., 2009). Pored toga, za samu sintezu sekundarnih metabolita pokreće se značajna genetska i energetska mašinerija i smatra se da svaki sintetisani sekundarni metabolit donosi određenu evolutivnu prednost svom producentu, a neki od njih su intermedijeri u biosintezi drugih (Četojević-Simin, 2005).

Sekundarni metaboliti se najintenzivnije proizvode kada kultura ulazi i prolazi kroz stacionarnu fazu rasta. Biološki aktivna jedinjenja se sintetišu u ranoj fazi sekundarnog metabolizma, nakratko nagomilavaju u ćelijama, a zatim oslobađaju u odgajivačku podlogu (Svirčev, 2005). Skoro sva biološki aktivna jedinjenja od interesa predstavljaju upravo sekundarne metabolite produkovane u stacionarnoj fazi rasta ili u sporo rastućim kulturama (Borowitzka, 1995). Biološka jedinjenja kao produkti izmenjenog, sekundarnog metabolizma na specifičan način korisna su za organizam koji ih produkuje u određenoj fazi razvoja kulture (Svirčev, 2005). Sekundarni metaboliti izdvojeni iz cijanobakterija pokazuju širok spektar biološke aktivnosti uključujući antimikrobnu (antibakterijsku, antifungalnu, antialgalnu), antiprotozoalnu, antiviralnu, antioksidativnu, antikancerogenu aktivnost, itd. (Abed i sar., 2009). Pored toga, različite vrste cijanobakterija razlikuju se međusobno po svojoj sposobnosti produkcije biološki aktivnih metabolita (BAM) (Burja i sar., 2001; Ghasemi i sar., 2004). Sekundarni metaboliti cijanobakterija mogu biti ekstracelularni (Hirata i sar., 1996; Jaki i sar., 1999; 2000a) ili intracelularni (Jaki i sar., 2000b; Dey i sar., 2000; Biondi i sar., 2004; Becher i sar., 2005; Asthana i sar., 2006; Raveh i Carmeli, 2007).

## 1.2. Biološki aktivna jedinjenja cijanobakterija

Iako je razvoj novih proizvoda od strane farmaceutske industrije daleko više oslonjen na sintetički pristup, prirodna jedinjenja i dalje predstavljaju glavni izvor biomolekula novih strukturnih karakteristika i svojstava (Harvey i sar., 2010). U cilju sistemskog pretraživanja novih prirodnih bioaktivnih molekula skovan je termin bioistraživanja. Mikroorganizmi su od suštinskog značaja u današnjim bioistraživanjima, pre svega kao producenti sekundarnih metabolita, ali takođe i kao biokatalizatori, pri čemu izuzetno značajnu grupu predstavljaju ekstremofilni mikroorganizmi (de Pascale i sar., 2012).

Imajući u vidu da slabo istražena staništa mogu ponuditi bolje izgleda za otkrivanje novih prirodnih produkata, mikroorganizmi takvih staništa nalaze se u žiži naučnog interesovanja (Pramanik i sar., 2011). Mikroorganizmi predstavljaju prirodno bogat izvor različitih bioaktivnih jedinjenja koja su od naučnog i komercijalnog značaja (Schlegel i sar., 1999). Kao predački evolucioni model sistemi, cijanobakterije poseduju izuzetan potencijal prilagođavanja različitim promenama u životnoj sredini, i shodno tome mogućnost produkcije širokog spektra biološki aktivnih materija (BAM) (Vermaas, 2004). Krajem sedamdesetih godina prošlog veka započet je opsežan skrining program cijanobakterija kao značajnih producenta biološki aktivnih materija koji je doveo do otkrića velikog broja novih jedinjenja sa antineoplastičnim, antimikrobnim, antiviralnim i mnogim drugim efektima (Patterson i sar., 1991, 1993, 1994; Moore, 1996; Falch i sar., 1995; Kulik, 1995).

Izolacija bioaktivnih jedinjenja iz cijanobakterija značajna je iz dva razloga:

- a) otkrivanje novih jedinjenja za farmaceutsku industriju, prehrambenu industriju, poljoprivrednu aplikaciju ili za upotrebu u biokontroli;
- b) bolje razumevanje interakcija individualnih organizama unutar njihovih prirodnih zajednica.

Shodno tome, skrining novih kulturabilnih organizama iz prirodnih staništa neophodan je radi razumevanja frekvencije i distribucije pojavljivanja sojeva sa sposobnošću produkcije bioaktivnih metabolita (Schlegel i sar., 1999). Više od 450 jedinjenja poreklom iz različitih filamentoznih cijanobakterija je identifikovano, naročito iz marinskih vrsta koje pripadaju rodovima *Lyngbya*, *Symploca* i *Oscillatoria* (Gerwick i sar., 2001; Tan, 2007; Tan, 2012). Po svojoj hemijskoj strukturi biološki aktivna jedinjenja cijanobakterija pripadaju raznovrsnim klasama jedinjenja uključujući peptide, alkaloidne, lipide i dr. Sekundarni metaboliti cijanobakterija koji su po svojoj hemijskoj strukturi peptidi pripadaju posebnim familijama ili klasama oligopeptida uključujući mikropeptide, anabeno-peptide, eruginozine, spumigine, ciklamide, mikroginine, mikroviridine i hepatotoksine (mikrocistini i nodularin su najdetaljnije proučeni) (Welker i von Döhren, 2006; Fewer i sar., 2013). Većina ovih jedinjenja sintetisana je hibridnom poliketid sintazom (PKS)/neribozomalnom peptid sintetazom (NRPS), odnosno pomoću genskih klastera koji ispoljavaju specifične mehanizme i enzimske reakcije (Jones i sar., 2010). Iako sekundarni metaboliti izolovani iz cijanobakterija pokazuju širok spektar delovanja mali broj cijanobakterija produkuje jedinjenja koja ispoljavaju višestruke biološke aktivnosti (na primer *Lyngbya majuscula*) (Abed i sar., 2009; Nunnery i sar., 2010). Cijanobakterija *Lyngbya majuscula* (Burja i sar., 2001) produkuje brojna hemijska jedinjenja uključujući poliketide, lipopeptide, ciklične peptide i mnoga druga jedinjenja (Shimizu, 2003). Biološka aktivnost ovih jedinjenja je raznovrsna i uključuje aktivatore protein kinaze C i tumor

promotore, inhibitore agregacije mikrotubulina, antimikrobna i antifungalna jedinjenja kao i blokatore natrijumovih-kanala (Abed i sar., 2009) (Tabela 3, Prilog 2).

Sekundarni metaboliti sa antibakterijskom aktivnošću koji deluju na Gram-pozitivne i/ili Gram-negativne bakterije široko su produkovani od strane cijanobakterija (Dahms i sar., 2006). U slučaju terestričnih vrsta cijanobakterija, predstavnici reda *Nostocales* identifikovani su kao značajni producenti paraciklofana, jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću (Kang i sar., 2012). Iz ove grupe jedinjenja izolovano je nekoliko jedinjenja poput nostociklina A (*Nostoc* sp.), cilindrociklofana i nostociklofana (*Nostoc* sp. i *Cylindrospemum* sp.) (Moore i sar., 1990, 1992; Chen i sar., 1991; Ploutno i Carmeli, 2000; Bui i sar., 2007; Chlipala i sar., 2010). U slučaju antifungalnih jedinjenja poput fišerelina A, hapalindola, karazostatina, fitoaleksina, tolitoksina, scitoficina, tojokamicina, tijipanazola, nostociklamida i nostodiona dokazana je produkcija od strane cijanobakterija iz redova *Stigonematales*, *Nostocales* i *Oscillatoriales* (Abed i sar., 2009). Pored antibakterijskih i antifungalnih jedinjenja, cijanobakterije proizvode širok spektar antialgalnih jedinjenja koja mogu biti korišćena u kontroli cvetanja algi i za cijanobakterije su korisna u cilju nadmašivanja rasta algi (Abed i sar., 2009). Antialgalna jedinjenja inhibiraju rast, fotosintezu, respiraciju, unos ugljenika, enzimsku aktivnost i dovode do indukcije oksidativnog stresa kod algi (Dahms i sar., 2006). Antiviralna jedinjenja obuhvataju acetilovane sulfoglikolipide izolovane iz vrste *Oscillatoria raoi* (Reshef i sar., 1997) i spirulan izolovan iz vrste *Spirulina platensis* (Hayashi i sar., 1991). Pored toga, jedinjenja izolovana iz dve cijanobakterijske vrste, *Lyngbya lagerhaimanii* i *Phormidium tenue*, pokazala su anti-HIV aktivnost (Rajeev i Xu, 2004).

Gama linolenska kiselina (GLA) pronađena kod nekih vrsta cijanobakterija značajna je s obzirom da se u ljudskom telu konvertuje u arahidonsku kiselinu (ARA) i potom u prostaglandin E2 koji dovodi do snižavanja krvnog pritiska i igra važnu ulogu u metabolizmu lipida. Pored sposobnosti sinteze masnih kiselina, neki marinski predstavnici cijanobakterija razmatrani su kao potencijalni izvor za komercijalnu proizvodnju vitamina, poput vitamina B i E (Plavsic i sar., 2004). Cijanobakterije takođe imaju sposobnost produkcije biološki aktivnih jedinjenja koja ispoljavaju citotoksičnu aktivnost. Biološki aktivni sekundarni metaboliti izolovani iz marinskih cijanobakterija sa citotoksičnom ili antiproliferativnom aktivnošću su somocistinamid A, apratoksin A-H, koibamid A, bisebromoamid, largazol itd. (Nunnery i sar., 2010). Sa druge strane, cilindrociklofani i nostociklofani izolovani iz terestričnih cijanobakterija *Nostoc* sp. i *Cylindrospemum* sp. pored antibakterijske i antifungalne aktivnosti pokazali su i citotoksičnu aktivnost (Moore i sar., 1990, 1992; Chen i sar., 1991; Chlipala i sar., 2010). Ciklindrociklofani izolovani iz terestričnog soja *Nostoc* sp. (UIC 10022A) ispoljili su inhibitornu aktivnost protiv 20S proteazoma i pokazano je da imaju citotoksičnu aktivnost protiv ćelijskih linija kancera (HT-29, NCI-H460, SF268 i MCF7 ćelijske linije) (Chlipala i sar., 2010). Merociklofan A i B, izolovani iz terestričnog soja *Nostoc* sp. (UIC 10062) ispoljili su antiproliferativnu aktivnost protiv HT-29 ćelijske linije humanog kancera debelog creva (Kang i sar., 2012).

Cijanobakterije su značajne i kao producenti sekundarnih metabolita sa anti-inflamatornom i anti-infektivnom aktivnošću. Jedinjenja izolovana iz marinskih predstavnika cijanobakterija sa anti-inflamatornom aktivnošću uključuju hoiamid A-B, antilatoksin, palmirolid, malingamid F acetat, malingamid 2. Sa druge strane izolovana jedinjenja sa anti-infektivnom aktivnošću obuhvataju viridamid A-B, galinamid A, simplostatina 4, dragonamid E, almiramid A (Nunnery

i sar., 2010). Neka od dosadašnjih otkrivenih biološki aktivnih jedinjenja marinskih i terestričnih predstavnika cijanobakterija i njihovi mehanizmi delovanja prikazani su u Prilogu 2 (Tabela 3).

Na osnovu svega navedenog, cijanobakterije su identifikovane kao nov i bogat izvor bioaktivnih jedinjenja (Bhadury i Wright, 2004; Dahms i sar., 2006) koja pripadaju različitim grupama hemijskih jedinjenja (poliketidima, amidima, alkaloidima, masnim kiselinama, indolima, lipopeptidima, itd.) (Abarzua i sar., 1999; Burja i sar. 2001). Ekstremno visoki nivoi strukturnih modifikacija jedinjenja, naročito uključivanje ostataka dobijenih iz poliketida i sposobnost produkcije niza bioaktivnih jedinjenja, čini cijanobakterije izuzetnim kandidatima za otkrivanje novih terapeutika (Williams, 2009). Neke od najznačajnijih grupa hemijskih jedinjenja (masne kiseline, alkaloidi, ne-ribozomalni peptidi itd.) opisane su u tekstu koji sledi.

### 1.2.1. Masne kiseline

Cijanobakterije predstavljaju bogat izvor lipida sa različitim aplikativnim potencijalom (Liu i sar., 2005). Procenjuje se da pripadnici reda *Nostocales*, od kojih većina pripada rodovima *Nostoc* i *Anabaena* proizvode više od 200 sekundarnih metabolita (Dembitsky i Rezanka, 2005) uključujući masne kiseline koje ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti (anti-HIV, antikancerogenu, antimalarijsku i antimikrobnu aktivnost) (Burja i sar., 2001; Donia i Hamann, 2003).

Na osnovu masno kiselinskog sastava cijanobakterije su klasifikovane u 4 grupe:

- prva grupa uključuje cijanobakterijske predstavnike koji ne sadrže polinezasićene masne kiseline (PUFA). Pripadnici ove grupe sadrže samo zasićene i mononezasićene masne kiseline (Kenyon, 1972; Kenyon i sar., 1972);
- druga i treća grupa obuhvataju vrste cijanobakterija koje sadrže ili  $\alpha$ -linoleinsku kiselinu (ALA, 18:3 $\omega$ 3) ili  $\gamma$ -linoleinsku kiselinu (GLA, 18:3 $\omega$ 6);
- cijanobakterije koje pripadaju četvrtoj grupi sadrže još i oktadekatetraenoinsku kiselinu (18:4 $\omega$ 3) (Kenyon, 1972; Kenyon i sar., 1972; Murata i sar., 1992).

Pored toga, na osnovu masno kiselinskog sastava vrši se i utvrđivanje taksonomske pozicije cijanobakterija i korelacije sa morfološkim odlikama (Li i Watanabe, 2001; Dembitsky i Rezanka, 2005). Odnosno, masne kiseline su važne i sa aspekta upotrebe kao pogodnih taksonomskih biomarkera. Od posebnog značaja su fosfolipid izvedene masne kiseline koje se koriste kao biomarkeri u studijama heterogenosti mikrobijalnih zajednica (Dijkman i sar., 2010). Nakon ćelijske smrti, većina fosfolipida se brzo degradira u neutralne lipide (Pinkart i sar., 2002; Drenovsky i sar., 2004) koji su daleko stabilniji i mogu ostati prisutni u sedimentu tokom dužeg vremenskog perioda (Dijkman i sar., 2010).

Kod cijanobakterija, masne kiseline su primarno prisutne u vidu lipida za skladištenje (bogatih monozasićenim i nezasićenim kiselinama) i unutar membranskih struktura (bogatih polinezasićenim masnim kiselinama) (Jüttner, 2001). Tokom idealnih uslova rasta, masne kiseline se koriste za građu tilakoidnih membrana (Guschina i Harwood, 2009). Međutim, tokom rasta u stresnim uslovima dolazi do akumulacije lipida (Guschina i Harwood, 2009). Pored toga, dužina ugljeničnog lanca i nivo nezasićenosti može se menjati u cilju stabilizacije

membrane tokom različitih uslova (Jüttner, 2001). Međutim, uloga polinezasićenih masnih kiselina tipa n-3 PUFA nije ograničena samo na održavanje fluidne stabilnosti membrana, već je povezana i sa procesima organizacije membrana i ćelijske deobe kao i eventualne interakcije sa specifičnim proteinima membrane (Kawamoto i sar., 2009).

- Mehanizmi sinteze masnih kiselina

U ćelijama cijanobakterija masne kiseline se sintetišu preko mehanizma sličnog mehanizmu prisutnom u ćelijama viših biljaka (Nishida i Murata, 1996). Od acetyl-CoA kao polaznog jedinjenja nastaje palmitoil-ACP (16:0-ACP) čijim daljim izduživanjem lanca nastaje 18:0-ACP. Stearinska kiselina (18:0) kao i palmitinska kiselina (16:0) predstavljaju zasićene masne kiseline i krajnje produkte enzimskog masno kiselinskog sintaza sistema (Stapleton i Jaworski, 1984).

U slučaju biosinteze nezasićenih masnih kiselina, biosinteza je inicirana sa  $\Delta 9$  acil-lipid desaturazom koja uvodi prvu dvostruku vezu na  $\Delta 9$  poziciju zasićene masne kiseline koja je esterifikovana do glicerolipida (Sato, 1993; Sakamoto i sar., 1994). Dobijeni rezultati ukazuju da je  $\Delta 9$  acil-lipid desaturaza specifična za stearinsku kiselinu (18:0) esterifikovanu na C-1 poziciji glicerolipida, odnosno nespecifična je u odnosu na polarne grupe glicerolipida. Međutim, acil-ACP desaturaza kao i acil-ACP hidrolaza nisu pronađene u ćelijama cijanobakterija. Acil grupe acil-ACP direktno su inkorporisane u glicerolipide pomoću aciltransferaza i zatim konvertovane u nezasićene masne kiseline pomoću acil-lipid desaturaza. Stoga, nivo nezasićenih masnih kiselina prisutnih u ćelijskim membrana determinisan je isključivo sa acil-lipid desaturazom (Temina i sar., 2007).

U slučaju biosinteze polinezasićenih, prehrambeno važnih omega-3 masnih kiselina, biosinteza eikozapentanoinske kiseline (EPA, 20:5  $\omega$ -3) i dokozaheksanoinske kiseline (DHA, 22:6  $\omega$ -3) nije rezultat elongacije i desaturacije intermedijera iz konvencionalnih puteva biosinteze masnih kiselina. Umesto toga, pomenute PUFA se sintetišu u celini od acetata posebnim poliketid sintaza sličnim sistemima (Metz i sar., 2001). Polinezasićene masne kiseline (PUFA) su od izuzetnog značaja s obzirom da se u ovoj grupi nalaze esencijalne masne kiseline: linoleinska kiselina,  $\alpha$ -linoleinska kiselina,  $\gamma$ -linoleinska kiselina, oktadekatetranoinska kiselina i eikozapolienoinska kiselina (Vargas i sar., 1998). Esencijalne masne kiseline predstavljaju prekursore u sintezi prostaglandina i kao takve zauzimaju veoma važno mesto u farmaceutskoj industriji. Zbog toga, PUFA produkujuće bakterije uključujući cijanobakterije mogu predstavljati značajan alternativni izvor masnih kiselina za ljudsku upotrebu. Prednost mikroorganizama kao producenata masnih kiselina ogleda se u činjenici da producenti obično sadrže samo jednu dugu lančanu PUFA (obično eikozapentensku ili dokozaheksensku kiselinu) (de Pascale i sar., 2012).

### 1.2.2. Antimikrobna jedinjenja

Potruga za novim aktivnim antimikrobnim jedinjenjima postaje sve važnija s obzirom na sve veći porast pojave rezistencije bakterija na antibiotike (Trias i Gordon, 1997). U cilju identifikacije aktivnih jedinjenja sa farmakološkom primenom u vidu antibiotika sve veću pažnju istraživača privlače cijanobakterije (Asthana i sar., 2006). Bioaktivni molekuli izolovani iz cijanobakterija pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antibakterijsku aktivnost, kao i fungicidnu i algicidnu aktivnost (Borowitzka, 1995). Značaj cijanobakterija kao potencijanih izvora novih jedinjenja u produkciji lekova doveo je do pokretanja Evropskog projekta „*Cyanomyces*“ u cilju generisanja novih terapeutskih supstanci kombinovanjem gena aktinomiceta i cijanobakterija (<http://www.cyanomyces.com>).

Antimikrobna aktivnost cijanobakterija pripisuje se njihovoj sposobnosti da proizvode veliki broj različitih alelohemijskih supstanci sa širokim opsegom bioloških aktivnosti i hemijskih struktura koje mogu da utiču na mnoge biohemijske procese unutar ćelija (El-Sheekh i sar., 2008). Iako je uloga bioaktivnih molekula za samu cijanobakteriju producenta još uvek nedovoljno objašnjena, imajući u vidu spektar bioloških adaptacija i toleranciju na stresne uslove u okruženju, neka od ovih jedinjenja mogu biti proizvedena u cilju sticanja prednosti za bolji opstanak (Martins i sar., 2008). Takođe, terestrične cijanobakterije mogu proizvoditi jedinjenja tipa antibiotika i druga inhibitorna jedinjenja u cilju zaštite od parazitizma i predatorstva od strane drugih mikroorganizama (Hornby, 1983; Lewis i Papavizas, 1991; Birkemoe i Liengen, 2000; Pajdak-Stos i sar., 2004; Darby i sar., 2007). Kompeticija među mikroorganizmima može biti dodatni faktor koji utiče na produkciju biološki aktivnih jedinjenja (Svirčev i sar., 2008) s obzirom da produkcija antibiotika kod bakterija može biti indukovana i povećana u prisustvu drugih bakterijskih sojeva (Burgess i sar., 1999). Pored toga, cijanobakterije ekskretno različit organska jedinjenja u svoje okruženje, i pokazano je da neka ekstracelularna jedinjenja (bioaktivni egzometaboliti) poseduju antimikrobnu aktivnost (Burja i sar., 2001; El-Sheekh i sar., 2006).

Jedinjenja cijanobakterija sa antimikrobnom aktivnošću obuhvataju širok spektar hemijskih jedinjenja poput: masnih kiselina, akrilik kiselina, halogenovanih alifatičnih jedinjenja, terpena, heterocikličnih jedinjenja sa sumporom, ugljenih hidrata, fenola, i dr. (De Cano i sar., 1990; El-Sheekh i sar., 2006). Do danas je proučeno više od 4000 sojeva cijanobakterija, sa više od 1000 opisanih sekundarnih metabolita (Sielaff i sar., 2006; Gademann i Portmann, 2008; Harvey, 2008; Chlipala i sar., 2011; Kim i sar., 2012). Posebnu pažnju privukli su predstavnici reda *Stigonematales* sa preko 70 izolovanih indol alkaloida (Kim i sar., 2012).

Neke od najznačajnijih klasa jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću kod cijanobakterija su:

#### a) Alkaloidi

Prvi hapalindol alkaloidi, hapalindol A i B, izolovani su iz cijanobakterije *Hapalosiphon fontalis* 1984. godine (Moore i sar., 1984). Od tada, više od 60 alkaloida tipa hapalindola izolovano je iz cijanobakterija familije *Stigonemataceae* (Richter i sar., 2008; Mo i sar., 2009). Ovi indol alkaloidi uključuju:

- hapalindole (Moore i sar., 1987; Moore i sar., 1989; Klein i sar., 1995; Huber i sar., 1998; Doan i sar., 2001; Asthana i sar., 2006; Becher i sar., 2007);
- hapalindolinone (Masuyama i sar., 1987);



- hapaloksindole (Moore i sar., 1987; Moore i sar., 1989);
- fontonamide (Kim i sar., 2012);
- fišerinidole (Park i sar., 1992; Stratmann i sar., 1994; Kim i sar., 2012),
- velvitindolinone (Stratmann i sar., 1994; Jimenez i sar., 1999)
- ambikvin izonitrile (Smitka i sar., 1992; Raveh i Carmeli, 2007; Mo i sar., 2009; Mo i sar., 2010).

Ovi alkaloidi su biosintetički blisko povezani, i policiklični ugljeni skelet se formira kondenzacijom derivata triptofana i geranil pirofosfata (Moore i sar., 1984; Stratmann i sar., 1994; Richter i sar., 2008). Smatra se da pojava nehlorisanih i hlorisanih hapalindol tipova alkaloida kod cijanobakterija nastaje zbog nesavršenosti u putevima biosinteze pri čemu se smatra da nastala jedinjenja daju ekološku prednost producentima (Raveh i Carmeli, 2007).

#### b) Peptidi

Mnogi citotoksični cijanobakterijski peptidi ispoljavaju antifungalnu i/ili antibakterijsku aktivnost kao što su kriptoficin (Hirsch i sar., 1988), nostofungicidin (Kajiyama i sar., 1998) i kaloficin (Moon i sar., 1992). Glikozilovani lipopeptidi izolovani iz vrste *Hassallia* sp. nazvani hasalidin A i B pokazali su se kao dobri antimikrobni i fungicidni agensi (Neuhof i sar., 2005; Neuhof i sar., 2006; Magarvey i sar., 2006). Iz cijanobakterijske vrste *Tychonema* sp. izolovani su brunsvicamidi B i C, anabenopeptini koji su ispoljili antibakterijsku aktivnost inhibiranjem enzima protein tirozin fosfatazu B kod *Mycobacterium tuberculosis* (Muller i sar., 2006).

#### c) Terpenoidi

Postoji nekoliko publikovanih radova o biološki aktivnim terpenoidima cijanobakterija. U hemijskom pogledu, terpenoidi predstavljaju veliku i raznovrsnu klasu organskih jedinjenja klasifikovanu na osnovu broja izoprenskih jedinica. Tolipodiol je bio prvi diterpenoid sa 4 izoprenske jedinice zabeležen kod cijanobakterija (Prinsep i sar., 1996). Nešto kasnije, strukturno sličan antibakterijski meroterpenoid, noskomin izolovan je iz terestrične vrste *Nostoc commune* (Jaki i sar., 1999). Pokazano je da noskomin ispoljava antibakterijsku aktivnost protiv Gram+ bakterije *Staphylococcus epidermidis*, slično kao hloramfenikol, inhibirajući sintezu proteina. Komnostini A-E, antibakterijski meroterpenoidi, takođe su identifikovani u kulturi *Nostoc commune* (Jaki i sar., 2000a). Iz vrste *Microcoleus lacustris* izolovana su dva diterpenoida koja su ispoljila umerenu antibakterijsku aktivnost protiv Gram+ bakterije *Staphylococcus aureus* (Pérez Gutiérrez i sar., 2008). Iz filamentozne cijanobakterije *Scytonema* sp. izolovan je scitoskalarol, antibakterijski i antifungalni terpenoid sa 5 izoprenskih jedinica (Mo i sar., 2009).

#### d) Masne kiseline

Sve veća pažnja posvećena je masnim kiselinama upravo zbog otkrića da izvesne bakterije imaju nizak nivo rezistentnosti na masne kiseline u poređenju sa konvencionalnim antibioticima (Petschow i sar., 1996; Desbois i sar., 2009; Desbois i Smith, 2010). Cijanobakterije se smatraju potencijalnim izvorom masnih kiselina s obzirom na njihovu visoku stopu rasta, visok sadržaj lipida i sposobnosti da rastu u raznovrsnim uslovima spoljašnje sredine (Gong i sar., 2011).

### 1.2.3. Antioksidativna jedinjenja

Kao jedna od najstarijih grupa organizama na planeti Zemlji koja se razvila rano tokom Prekambrijumske ere (između 2,8 i 3,5 x 10<sup>9</sup> godina), odnosno pre postojanja sadašnjeg ozonskog omotača, predačke cijanobakterije su bile izložene izuzetno visokom solarnom ultraljubičastom zračenju (UV zračenju) (Castenholz i Garcia-Pichel, 2000). U cilju preživljavanja negativnih efekata slobodnih kiseoničnih radikala indukovanih od strane UV zračenja (dovode do inhibicije ili oštećenja fotosintetičkih procesa i gubitka enzimske aktivnosti, inhibicije rasta) (Wu i sar., 2005) cijanobakterije su razvile mnogobrojne mehanizme zaštite. Pored toga, UV zračenje takođe utiče na permeabilnost membrana, stabilnost pigmenata, mehanizme unošenja nutrijenata i signalnu transdukciju preko fitohroma ili specifičnih UV fotoreceptora (Cadoret i sar., 2005). Lipidi, proteini i DNK predstavljaju glavne mete UV zračenja koje izaziva direktno ili indirektno oksidativno oštećenje dejstvom slobodnih kiseoničnih radikala (He i Häder, 2002). Aktivirani kiseonik i agensi koji generišu stvaranje radikala bez kiseonika, kao što je jonizujuće zračenje, odgovorni su za stvaranje brojnih lezija u molekulu DNK zbog kojih dolazi do delecija, mutacija i drugih promena genetičkog materijala koje mogu biti letalne. Oksidativni „napad” na proteine rezultira specifičnim aminokiselinskim modifikacijama, fragmentacijom peptidnog lanca, nagomilavanjem unakrsno povezanih proizvoda reakcije, promenom naelektrisanja i povećanjem osetljivosti proteina na proteolizu (Kesheri i sar., 2011).

Prema Schulz i Scherer (1999) cijanobakterije koriste tri različita tipa strategija u cilju suzbijanja negativnog efekta UV zračenja: 1) izbegavanje stresa kližućim mehanizmima, 2) odbranu od stresa sintezom UV-apsorbujućih jedinjenja, antioksidanata i ekstracelularnih polisaharida, 3) mehanizme popravke uključujući popravku DNK i resintezu UV-osetljivih proteina. Uloga zaštitnog sistema je u prevenciji nakupljanja i u sprečavanju delovanja slobodnih radikala i singlet kiseonika, čime se onemogućava oštećenje ćelija i smanjene ćelijske aktivnosti. Interakcija između UV zračenja, kiseonika i određenih organskih komponenti može dovesti do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kao što su superoksidni anjon (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroperoksi radikal (HO<sub>2</sub><sup>-</sup>) i hidrosil radikal (OH<sup>-</sup>) (Cadenas, 1989).

Cijanobakterije su razvile kompleksan sistem odbrane protiv ROS uključujući neenzimske antioksidanse kao što su karotenoidi, tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C), redukovani glutation i fikocijanin (Guedes i sar., 2013). Enzimski antioksidansi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza kao i enzimi uključeni u askorbat-glutation ciklus, kao što su askorbatna peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat reduktaza, dehidroaskorbat reduktaza i glutation reduktaza (GR) (Pattanaik i sar., 2007). Međutim, neenzimski antioksidansi se ne smatraju efikasnim u detoksifikaciji svih agensa (Wolfe-Simon i sar., 2005). Potencijal antioksidanata pripisuje se njihovom odbrambenom mehanizmu stečenom protiv toksičnih materija ili prevenciji fotodinamičkih i DNK oštećenja, usled različitih intenziteta svetlosti i visokih koncentracija kiseonika (Babu i Wu, 2008).

Neka od jedinjenja cijanobakterija sa antioksidativnom aktivnošću su:

a) Fikocijanin

Fikocijanin spada u grupu fikobiliproteinskih pigmenata, antenna pigmenata uključenih u proces fotosinteze, koji predstavljaju konstituente makromolekularnih kompleksa (fikobilizoma) smeštenih na površini tilakoidnih membrana. Energija apsorbirana od strane fikobiliproteinskih pigmenata (fikocijanina, alofikocijanina, fikoeritrina) prenosi se unutar i iz fikobilizoma do hlorofila *a* u tilakoidnim membrana (Sinha i sar., 2005). Međutim, za razliku od nekih fikobiliproteina (fikoeritrina - crvenog pigmenta), fikocijanin (plavi pigment) ima univerzalnu distribuciju i prisutan je kod svih rodova cijanobakterija (Gantar i sar., 2012; Simeunović i sar., 2013). Zbog prisustva linearne tetrapirrol prostetičke grupe, često nazvane bilin, fikocijanin ima sposobnost „hvatanja“ reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i može da deluje kao antioksidant. Različite biološke aktivnosti pripisane fikocijaninu (kao što su anti-inflamatorna, anti-hepatotoksična, anti-kancerogena aktivnost) rezultat su upravo sposobnosti fikocijanina da „hvata“ slobodne radikale (Soni i sar., 2008).

b) Karotenoidi

Karotenoidi predstavljaju prirodne pigmente koji obično sadrže oko 40 C-atoma u molekulu. Kao polieni, karotenoidi su najčešće sastavljeni iz 8 izoprenskih ostataka (Pejin, 2003). Kod cijanobakterija, karotenoidi se javljaju u spoljašnjem delu ćelijske membrane kao i u tilakoidima. Tokom duže izloženosti visokom intenzitetu prirodnog ili veštačkog zračenja dolazi do porasta nivoa karotenoida u odnosu na hlorofil *a*, što predstavlja preduslov za graničnu toleranciju protiv prejakog zračenja (Ehling-Schulz i Scherer, 1999). Karotenoidi pokazuju višestruke fiziološke uloge, poput uloge pigmenata u fotosintezi, kao i uloge generalnih antioksidanata za „hvatanje“ radikala u cilju prevencije lipidne peroksidacije, suzbijanja trostrukog stanja hlorofila i formiranja singlet kiseonika (Kerfeld, 2004).

c) Fenoli

Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najznačajnijih klasa prirodnih jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću (Machu i sar., 2015) zbog posedovanja strukturnih karakteristika „hvatača“ slobodnih radikala (Kepekçi i Saygideger, 2012). Hemijski, polifenoli mogu biti podeljeni u nekoliko klasa: fenolne kiseline, flavonoide, izoflavonoide, stilbene, lignane i fenolne polimere (Manach i sar., 2004). Fenoli predstavljaju sveprisutnu i rasprostranjenu klasu sekundarnih metabolita produkovanih iz šikimatnog, acetatnog i potencijalno prolin-povezanog pentozno fosfatnog puta kod biljaka (Kepekçi i Saygideger, 2012). S obzirom da se cijanobakterije smatraju prvim evolutivnim fotoautotrofnim organizmima, cijanobakterije poseduju mnoge fundamentalne biohemijske procese za produkciju fenolnih jedinjenja koji mogu biti pronađeni i kod viših biljaka (Duval i sar., 1999). Međutim, u poređenju sa višim biljkama prisustvo fenolnih jedinjenja slabije je dokumentovano kod cijanobakterija (Santoyo i sar., 2006; Colla i sar., 2007; Babić i sar., 2016).

d) Enzimski antioksidansi

Pored neenzimskih antioksidanasa (fikocijanin, karotenoidi, fenoli i dr.), enzimski antioksidansi takođe su deo kompleksnog sistema odbrane cijanobakterija protiv ROS. Superoksid dismutaza (SOD) je možda jedno od prvih antioksidativnih jedinjenja usmereno protiv nascentnih kiseoničnih radikala. SOD katališe dismutaciju superoksida do vodonik peroksida i kiseonika. Postoje različite metaloforme SOD (Fe, Mn, CuZn i Ni) pri čemu

prokarioti (uključujući cijanobakterije) i mnoge eukariotske alge sadrže samo Mn-SOD i Fe-SOD izozime zbog čega se veruje da su to stariji oblici (Kesheri i sar., 2011). Pored SOD, u enzimске antioksidanse spadaju i katalaze (CAT). Katalaze su tetramerni enzimi koji sadrže hem i odgovorni su za dismutaciju vodonik peroksida u vodu i kiseonik. Terestrične cijanobakterije tolerantne na sušu implementiraju strukturalne, fiziološke i molekularne mehanizme opstanka pri akutnom deficitu vode. Citoplazmatične katalaze igraju ključnu ulogu u održavanju intraćelijske redoks ravnoteže tokom dehidratacije. Katalaze sprečavaju oksidativno oštećenje nastalo dehidratacijom u membranama i takođe pomažu potpunom oporavku ćelija (Wai i sar., 2000).

U ćelijama nekih cijanobakterija nalazi se i enzim askorbatna peroksidaza (APX). Na osnovu prisustva, odnosno odsustva askorbatne peroksidaze, cijanobakterije su podeljene na cijanobakterije koje „hvataju“ vodonik peroksid sa peroksidazom, odnosno cijanobakterije koje „hvataju“ vodonik peroksid samo sa katalazom (Kesheri i sar., 2011). Još jedan od prisutnih enzima uključen u antioksidativni odgovor je i glutation reduktaza (GR). Glutation reduktaza je ključni enzim u askorbat-glutation ciklusu koji učestuje u „hvatanju“ peroksida i zaštiti u odnosu na druge oksidativne procese. Interesantno je da cijanobakterijski enzim glutation reduktaza pokazuje izuzetnu termostabilnost, zadržavajući sekundarnu strukturu i na temperaturama višim od 80°C (Dominguez i sar., 1997).

#### 1.2.4. Toksini

Pored produkcije biološki aktivnih materija i značaja cijanobakterija kao bogatog izvora bioaktivnih jedinjenja koja poseduju raznovrsne biološke funkcije, cijanobakterije poseduju i sposobnost produkcije toksina. Cijanobakterije sa sposobnošću produkcije cijanotoksina pronađene su širom sveta i pokazano je da više od 50 vrsta identifikovanih cijanobakterija ima sposobnost sinteze cijanotoksina (Svirčev i sar., 2013). Generalno, cijanotoksini predstavljaju veoma heterogenu grupu jedinjenja uzimajući u obzir njihovu hemijsku strukturu i mehanizme delovanja (Hrouzek i sar., 2011). Aktiviranje oksidativnog stresa (Ding i Ong, 2003; Botha i sar., 2004), depolimerizacija aktina (Patterson i sar., 1993; Smith i sar., 1994), ili interferencija sa procesom replikacije DNK (Patterson i Carmeli, 1992; Teneva i sar., 2003) jedni su od najčešće opisanih efekata cijanotoksina.

Kao klasa sekundarnih metabolita, mnogi toksini cijanobakterija su ne-ribozomalni peptidi (Moore, 1996; Gerwick i sar., 2001; Shimizu, 2003). Poliketid sintaze (PKSs) i neribozomalne peptid sintetaze (NRPSs) predstavljaju velike molekule (od 200 do 2000 kDa) uključene isključivo u biosintezu biološki aktivnih jedinjenja odnosno sekundarnih metabolita velike strukturne raznovrsnosti (Silva-Stenico i sar., 2011). Sposobnost sinteze toksina je soj specifično svojstvo povezano sa prisustvom odgovarajućih gena (Sielaff i sar., 2006).

Poznato je da među otprilike 150 opisanih rodova cijanobakterija 40 rodova pretežno vodenih sojeva poseduje sposobnost produkcije toksičnih jedinjenja koja mogu da utiču na druge organizme (van Apeldoorn i sar., 2007). Cijanobakterijski toksini kategorisani su u pet funkcionalnih grupa: hepatotoksini, neurotoksini, citotoksini, dermatotoksini i toksini koji izazivaju iritacije (Jonas i sar., 2015) (Tabela 4). Na osnovu hemijske strukture cijanotoksini su podeljeni u tri grupe: ciklični peptidi (mikrocistini i nodularini), alkaloidi (neurotoksini i cilindrospermopsin) i lipopolisaharidi (Msagati i sar., 2006).

Tabela 4. Glavne grupe cijanobakterijskih toksina (Bláha i sar., 2009)

Toksini (LD <sub>50</sub> -akutna toksičnost <sup>A</sup> )	Hemijska struktura (br. varijanti)	Aktivnost	Toksični rodovi
<b>Hepatotoksini</b>			
Mikrocistini (25 do ~ 1000)	Ciklični heptapeptidi (71)	Hepatotoksičnost, inhibicija protein fosfataza, dovode do poremećaja integriteta i provodljivosti membrana, promoteri tumora	<i>Microcystis</i> <sup>BCD</sup> , <i>Anabaena</i> <sup>BCD</sup> , <i>Nostoc</i> <sup>BC</sup> , <i>Planktothrix</i> <sup>BCD</sup> , <i>Anabaenopsis</i> <sup>B</sup> , <i>Hapalosiphon</i> <sup>BC</sup>
Nodularini (30 do 50)	Ciklični pentapeptidi (9)	Hepatotoksičnost, inhibicija protein fosfataza, dovode do poremećaja integriteta i provodljivosti membrana, promoteri tumora, karconogeni	<i>Nodularia</i> <sup>BCD</sup>
Cilindrospermopsini (200 do 2100)	Guanidni alkaloidi (3)	Izazivaju nekrotične povrede jetre, bubrega, slezine, pluća, creva, inhibitori sinteze proteina, genotoksičnost	<i>Cylindrospermopsis</i> <sup>BC</sup> , <i>Aphanizomenon</i> <sup>BC</sup> , <i>Anabaena</i> <sup>C</sup> , <i>Raphidiopsis</i> <sup>BC</sup> , <i>Umezakia</i> <sup>B</sup>
<b>Neurotoksini</b>			
Anatoksin-a (250)	Tropan-povezani alkaloidi (5)	Postsinaptički, depolarizirajući neuromuskulatorni blokatori	<i>Aphanizomenon</i> <sup>B</sup> , <i>Anabaena</i> <sup>BCD</sup> , <i>Raphidiopsis</i> <sup>BC</sup> , <i>Oscillatoria</i> <sup>BC</sup> , <i>Planktothrix</i> <sup>BC</sup> , <i>Cylindrospermum</i> <sup>B</sup>
Anatoksina-a(S)	Estar guanidin metil fosfata (1)	Inhibitori enzima acetilholinesterze	<i>Anabaena</i> <sup>BC</sup>
Saksitoksini (10 do 30)	Karbamat alkaloidi (20)	Blokatori natrijumovih kanala	<i>Aphanizomenon</i> <sup>BC</sup> , <i>Anabaena</i> <sup>BC</sup> , <i>Planktothrix</i> <sup>BC</sup> , <i>Cylindrospermopsis</i> <sup>BC</sup> , <i>Lyngbya</i> <sup>BC</sup>
<b>Dermatotoksini i citotoksini</b>			
Lingbiatoksin-a	Alkaloid (1)	Inflamatorni agens, aktivator protein kinaze C	<i>Lyngbya</i> <sup>B</sup> , <i>Schizotrix</i> <sup>B</sup> , <i>Oscillatoria</i> <sup>B</sup>
Aplaziatoksini	Alkaloid (2)	Inflamatorni agensi, aktivatori protein kminaze C	<i>Lyngbya</i> <sup>B</sup> , <i>Schizotrix</i> <sup>B</sup> , <i>Oscillatoria</i> <sup>B</sup>
<b>Endotoksini</b>			
Lipopolisaharidi	Lipopolisaharidi	Inflamatorni agensi, gastrointestinalni iritanti	Sve cijanobakterije?

<sup>A</sup> akutna toksičnost u bioeseju sa miševima (LD<sub>50</sub> - µg/kg telesne težine);

<sup>B</sup> toksin identifikovan u prirodnim populacijama sa dominantnim rodovima;

<sup>C</sup> toksin identifikovan u neaksnim monocijanobakterijskim kulturama (sa prisustvom bakterija);

<sup>D</sup> toksini identifikovani u aksnim monocijanobakterijskim kulturama (bez prisustva bakterija).

Biološka funkcija i ekološka uloga ovih toksina za same cijanobakterije još uvek nije u potpunosti razjašnjena (Chorus i Bartrum, 1999). Neke od mogućih hipoteza su da:

- a. toksini imaju ekofiziološku funkciju, uključujući njihovu ulogu u bazičnom metabolizmu cijanobakterija (npr. imaju ulogu helatora metalnih jona) (Utkilen i Gjølme, 1995; Humble i sar., 1997);
- b. imaju funkciju intraspecifičnih signalnih molekula (Dittmann i sar., 2001);
- c. imaju ulogu u interspecifičnim ekološkim interakcijama uključujući protektivne efekte protiv predatora (npr. zooplanktona) (DeMott i Moxter, 1991; Rorhlack i sar., 2001);
- d. imaju zaštitnu ulogu protiv kompetitivnih fotoautotrofnih organizama, mehanizam poznatiji pod terminom alelopatija (Pflugmacher, 2002). Međutim, s obzirom da se sinteza toksina (npr. mikrocistina) smatra drevnim procesom koji se razvio mnogo vremena pre evolucije eukariotskih fotoautotrofa alelopatska aktivnost čini se manje verovatnom kao primarna uloga cijanotoksina (Babica i sar., 2006);
- e. cijanotoksini (npr. mikrocistini) bi mogli da imaju protektivnu ulogu i od reaktivnih kiseoničnih vrsta (Borges i sar., 2015).

#### 1.2.4.1. Funkcionalne grupe cijanotoksina

Cijanotoksini predstavljaju raznovrsnu grupu hemijskih jedinjenja različitih molekulskih struktura i toksikoloških osobina. U zavisnosti od ciljnih meta u organizmu (jetra, nervni sistem, koža i ćelije u kojima dolazi do promocije tumora) (Szlak i sar., 2015) cijanotoksini su podeljeni u nekoliko funkcionalnih grupa: hepatotoksini, neurotoksini, citotoksini, dermatotoksini i toksini koji izazivaju iritacije (Jonas i sar., 2015). Neke od najznačajnijih i najviše istraženih funkcionalnih grupa cijanotoksina su:

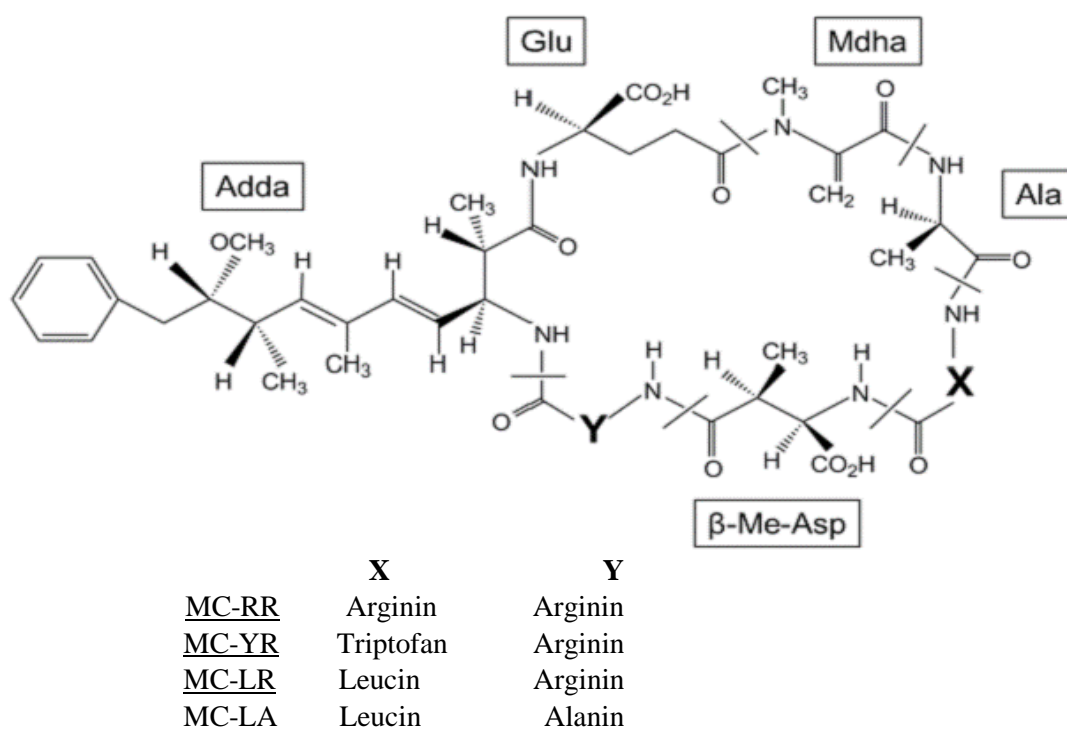
##### 1) Hepatotoksini

U grupu hepatotoksina ulaze mikrocistini (molekulska masa 900-1200) koji se smatraju najzastupljenijim i najrasprostranjenijim cijanotoksinima s obzirom da mikrocistini čine 50-70% detektovanih toksina tokom pojave cvetanja cijanobakterija u vodenim ekosistemima (Ettoumi i sar., 2011). Pored mikrocistina, u hepatotoksine spadaju i nodularin (molekulska masa 800-900) koji se sastoje iz pet amino kiselina i ima 9 prirodnih okarakterisanih analoga (Codd i sar., 2005), i hidrofilni alkaloid cilindrospermopsin (molekulska masa 415) sa samo dva identifikovana analoga (7-epicilindrospermopsin i 7-deoksicilindrospermopsin) (Corbel i sar., 2014).

## a) Mikrocistini

Mikrocistini su ciklični heptapeptidi produkovani od strane cijanobakterijskih rodova kao što su *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaenopsis*, *Nostoc* i *Hapalosiphon*. U slučaju vodenih planktonskih cijanobakterija, toksični sojevi uglavnom pripadaju rodovima *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) i *Anabaena* dok su u slučaju terestričnih cijanobakterija rodovi *Nostoc* i *Hapalosiphon* najčešći producenti ove grupe cijanotoksina (Sivonen i Jones, 1999; Babica i sar., 2006).

Familija mikrocistina je hemijski veoma raznovrsna, i ona uključuje preko 200 strukturnih varijanti mikrocistina koje se razlikuju u tipu aminokiselina inkorporiranih u molekul ili u modifikacijama peptidne veze (Sivonen, 2009; Kaasalainen i sar., 2012; Fewer i sar., 2013; Spooft i Catherine, 2016). Glavne izoforme mikrocistina su mikrocistin-LR (leucin arginin) (MC-LR), mikrocistin-RR (arginin arginin) (MC-RR) i mikrocistin-YR (tirozin arginin) (MC-YR) (Li i sar., 2009). Većina identifikovanih varijanti mikrocistina ima sedam amino kiselina generalne strukturne formule [ciklo(-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-)], u kojoj X i Z predstavljaju dve varijabilne L-amino kiseline, D-MeAsp je D-eritro- $\beta$ -metil asparaginska kiselina i Mdha je N-metildehidroalanin (Rouhiainen i sar., 2004). Iako strukturne varijante mogu da se pojave kod svih sedam amino kiselina, varijante mikrocistina se najčešće razlikuju u obrazcu metilacije i L-amino kiselinama koje se nalaze na pozicijama X i Y u strukturi (Slika 4) (McElhiney i Lawton, 2005).



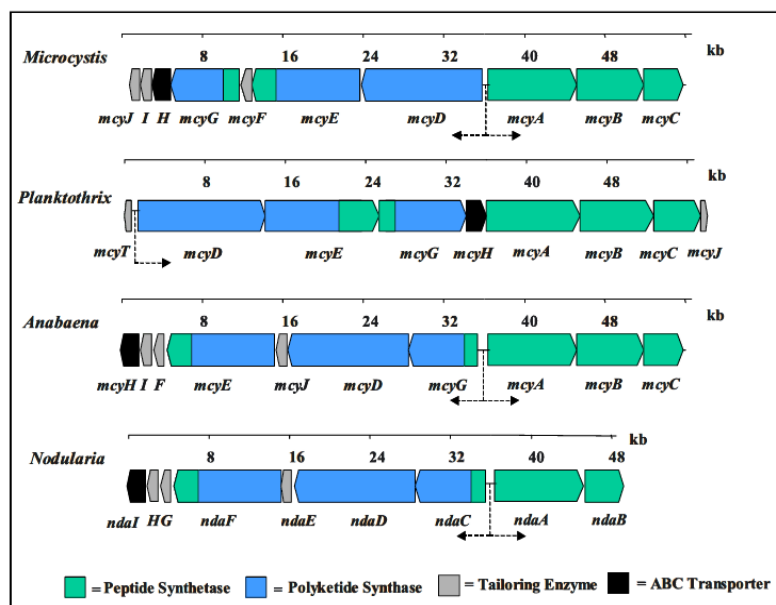
Slika 4. Opšta struktura mikrocistina sa nekim od zabeleženih strukturnih varijacija na određenim pozicijama u molekulu (Harada i sar., 1996)

Veliki broj strukturnih varijanti mikrocistina, koje se razlikuju u modifikacijama peptidne veze ili u tipu amino kiseline inkorporirane u molekul mikrocistina, rezultat su genetičkih promena koje utiču na funkcionisanje enzima kodiranih od strane *mcy* genskog klastera (Fewer i sar., 2013). Genetičke promene mogu nastati usled delecija ili insercija u *mcy* genskom klasteru, (Kurmayer i Christiansen, 2009; Fewer i sar., 2011a, 2011b) ili usled serije genetičkih rekombinacija i tačkastih mutacija koje utiču na funkcionisanje mikrocistin peptid sintetaze i dovode do pojave uočene hemijske raznovrsnosti u prirodi (Fewer i sar., 2007, 2008; Tooming-Klunderud i sar., 2008).

- Biosinteza mikrocistina

Biosinteza mikrocistina ostvaruje se preko gena koji kodiraju ne-ribozomalne peptid sintetaze (NRPS), poliketid sintaze (PKS) i preko hibridnih NRPS-PKS sistema (Christiansen i sar., 2003; Rouhiainen i sar., 2004). Veličina kompletnog operona odgovornog za biosintezu mikrocistina varira između rodova cijanobakterija (Slika 5). Kod *M. aeruginosa*, 55 kb mikrocistin genski klaster aranžiran je u dva bi-direktno organizovana operona koji se sastoje iz: peptid sintetaze gena (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*), poliketid sintaze gena (*mcyD*), hibridnih enzimskih gena (*mcyE-mcyG*), metilacionog gena (*mcyJ*), epimerizacionog gena (*mcyF*), dehidratacionog gena (*mcyI*) i gena za transport (*mcyH*). U slučaju roda *Planktothrix*, genski klaster za mikrocistin je veličine 55,8 kb i sastoji se iz gena za peptid sintetazu (*mcyA-mcyB-mcyC*), poliketid sintaze gena (*mcyD*), hibridnih enzimskih gena (*mcyE-mcyG*), putativnog tioesteraznog gena (*mcyT*), putativnog ABC transportnog gena (*mcyH*) i putativnog gena za peptid-modifikujući enzim (*mcyJ*) (Christiansen i sar., 2003). Kod roda *Anabaena*, genski klaster za mikrocistin se sastoji iz tri operona. U okviru ovog genskog klastera veličine 55,4 kb, prvi operon (*mcyA-mcyB-mcyC*) se transkribuje u suprotnom pravcu od drugog (*mcyG-mcyD-mcyJ-mcyE-mcyF-mcyI*) i trećeg operona (*mcyH*).

U drugom operonu, nalaze se PKS geni (*mcyD*, *mcyJ*, *mcyF* i *mcyI*) i hibridni geni (*mcyG* i *mcyE*) (Rouhiainen i sar., 2004). Varijacije u strukturi mikrocistina delom su rezultat rekombinacije između *mcyC* i *mcyB* gena (Rantala i sar., 2004). Amplifikacija *mcyB* se smatra brzom alatom za identifikaciju toksičnih i netoksičnih cijanobakterija (Nonneman i Paul, 2002).



Slika 5. Veličina kompletnog operona odgovornog za biosintezu mikrocistina kod različitih rodova cijanobakterija (Börner i Dittmann, 2005)



- Unos mikrocistina i mehanizam delovanja u eukariotskim ćelijama

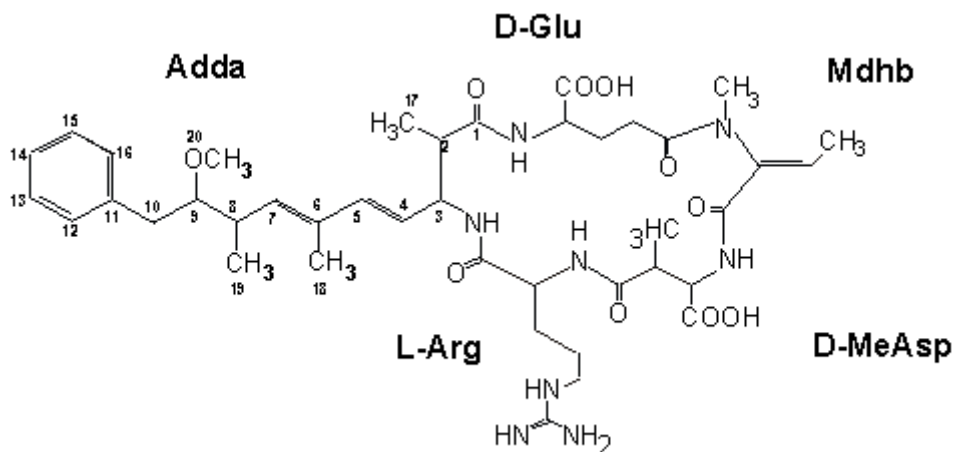
Cijanobakterijski hepatotoksini tipa mikrocistin-LR generalno nisu sposobni da prodru kroz ćelijsku membranu vertebrata i stoga zahtevaju unos preko transportnog sistema žučne kiseline koji je prisutan u hepatocitima i ćelijama koje oblažu tanko crevo (Runnegar i sar., 1991). Zbog svog molekularnog volumena, strukture i hidrofилnosti mikrocistini ne prodiru direktno kroz ćelijske membrane (Štěpánková i sar., 2011). Njihov unos odvija se preko multispecifičnih organskih anjon transportnih polipeptida (OATP) koji su detektovani u jetri, bubrezima, moždano-krvnim barijerama, plućima, gastrointestinalnim ćelijama, ćelijama jetre i u ćelijama kancera dojke (Fischer i sar., 2010). Shodno tome, njihova toksičnost ograničena je na organe koji ekspresuju organske anjon transportere na svojim ćelijskim membranama (Fischer i sar., 2005). Kod biljaka, još uvek nije u potpunosti definisan mehanizam unosa, ali se smatra da mikrocistini mogu proći kroz membrane putem difuzije ili apsorpcije preko korena (Corbel i sar., 2014).

Glavni mehanizam toksičnog efekta mikrocistina predstavlja irreverzibilnu inhibiciju protein fosfataze 1 i 2A, ključnih regulatornih enzima uključenih u katalitičke procese defosforilacije serin/treonin rezidua različitih fosfoproteina (strukturnih proteina, enzima itd.). Inhibicija protein fosfataza praćena je gubitkom integriteta citoskeleta hepatocita nakon čega sledi citoliza ili apoptoza ćelije (Dietrich i Hoeger, 2005). Mikrocistini blokiraju katalitički deo protein fosfataza preko interakcije glutamil karboksilata i hidrofobne Adda nespecifične amino kiseline sa aktivnim delom enzima (Gulledge i sar., 2003; Xing i sar., 2006). Međutim, izomerizacijom Adda dela molekula u 6Z-Adda položaj molekul mikrocistina gubi svoju toksičnost (Harada i sar., 1990). Mikrocistini koji u svom sastavu imaju acetil grupu umesto metil grupe u Adda delu nazivaju se ADMAdda varijante. Na primer, O-acetilovane Adda mikrocistin varijante zastupljene su u slučaju terestričnog simbiotskog roda *Nostoc* izolovanog iz lišaja, ali i slobodno živećih zemljišnih predstavnika roda *Nostoc*, dok se O-metilovane varijante ređe sreću (Oksanen i sar., 2004; Kaasalainen i sar., 2009; 2012). U poređenju sa najtoksičnijim varijantama mikrocistina, poput mikrocistina LR, O-acetilovane varijante ispoljavaju sličan nivo toksičnosti (Sivonen i sar., 1990, 1992; Beattie i sar., 1998; Laub i sar., 2002). Pored toga, mikrocistini takođe dovode do inhibicije enzima protein fosfataza koji su uključeni u nekoliko fizioloških i molekularnih procesa kod viših biljaka (Sheen, 1993; Takeda i sar., 1994). Pored inhibicije protein fosfataza, mikrocistini indukuju formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta koje mogu da prouzrokuju ozbiljna oštećenja ćelija poput peroksidacije lipidnih membrana, genotoksičnosti i modulacije apoptoze (Ding i Ong, 2003).

#### b) Nodularin

Hepatotoksin nodularin prvi put je izolovan iz filamentozne, planktonske vrste *Nodularia spumigena* zbog čega se rod *Nodularia* smatrao veoma dugo jedinim producentom ovog toksina. Međutim, terestrični predstavnici roda *Nostoc* koji žive u simbiozi sa lišajima i biljkama takođe imaju sposobnost produkcije ovog hepatotoksina (Kaasalainen i sar., 2012; Gehringer i sar., 2012).

Po svojoj hemijskoj prirodi, nodularin predstavlja ciklični pentapeptid koji je strukturno sličan mikrocistinu. Međutim, za razliku od mikrocistina kod nodularina nedostaju dve aminokiseline, D-alanin i varijabilna X amino kiselina (Slika 6). Pored toga, Mdha prisutna kod mikrocistina u molekulu nodularina zamenjena je sa Mdhb (Börner i Dittmann, 2005).



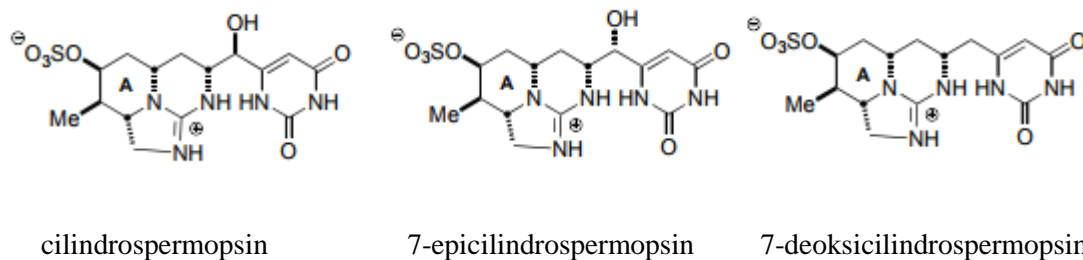
Slika 6. Molekularna struktura nodularina  
(<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/lehtimaki/ch1.htm>)

Slično mikrocistinu, toksičnost nodularina povezana je sa prisustvom neobične amino kiseline Adda koja dovodi do inhibicije nekoliko eukariotskih protein fosfataza koje su esencijalne za mnoge ćelijske regulatorne procese kao što su rast, sinteza proteina, metabolizam glikogena i mišićna kontrakcija (Ohta i sar., 1994; Edward i sar., 1996; Falconer, 2005). Preko Adda amino kiseline toksin se vezuje za protein fosfataze formiranjem visoko specifičnih kovalentnih veza (Msagati i sar., 2006).

### c) Cilindrospermopsin

Iako je prvobitno identifikovan kod cijanobakterijskih vrsta tropskih predela, pokazano je da se cilindrospermopsin javlja u mnogim klimatskim područjima, uključujući i Centralnu Evropu (Bláhová i sar., 2009). Do sada je identifikovano osam vrsta cijanobakterija (*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos aquae*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata*, *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica* i *Lyngbya wollei*) koje imaju sposobnost produkcije cilindrospermopsina (Seifert i sar., 2007).

Za razliku od mikrocistina i nodularina, cilindrospermopsin po svojoj hemijskoj građi spada u ciklične guanidin alkaloide (McElhiney i Lawton, 2005). Struktura cilindrospermopsina i njegova dva poznata analoga, 7-epicilindrospermopsina i 7-deoksicilindrospermopsina, prikazana je na Slici broj 7.



Slika 7. Struktura cijanotoksina cilindrospermopsina i njegovih prirodnih analoga (<http://www.orgsyn.org/Content/pdfs/procedures/v89p0394.pdf>)

Cilindrospermopsin ispoljava mutagena i citotoksična svojstva na ćelije jetre, bubrega ali takođe i na ćelije krvi (Sukenik i sar., 2006; Rastogi i Sinha, 2009). Cilindrospermopsin se smatra hepatotoksičnim, citotoksičnim, neurotoksičnim agensom (Kiss i sar., 2002) i potencijalan je karcinogen (Humpage i sar., 2000). Cilindrospermopsin dovodi do blokiranja sinteze proteina u ćelijama sisara, ali takođe i u biljnim ćelijama (Corbel i sar., 2014). Toksičnost cilindrospermopsina pripisuje se sposobnošću toksina da inhibira glutation, citohrom P450 i sintezu proteina. Veliki problem u održavanju kvaliteta vode širom sveta predstavlja upravo prisustvo vrste *C. raciborskii*, značajnog producenta ovog toksina (Neilan i sar., 2003).

## 2) Neurotoksini

Cijanobakterijski neurotoksini su podjeljeni u tri grupe: anatoksini (anatoksin-a, homoanatoksin-a, i anatoksin-a(s)), saksitoksini i neurotoksična amino kiselina BMAA ( $\beta$ -metilamino-L-alanin) (Corbel i sar., 2014). Anatoksini i BMAA su specifični produkti cijanobakterija za razliku od saksitoksina koji takođe mogu biti sintetisani od strane nekih marinskih dinoflagelata i povezani su sa paralitičkim trovanjem školjkama (PSP) (Falconer, 1991; Carmichael, 1994; Kaebnick i Neilan, 2001).

### a) Anatoksini

Anatoksini po svojoj hemijskoj strukturi pripadaju grupi alkaloida i pokazano je da su anatoksini veoma toksični za ptice i sisare. Anatoksine proizvode brojne vrste i rodovi cijanobakterija poput *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermum*, *Raphidiopsis* i *Planktothrix* sp. (prethodno *Oscillatoria* sp.) (Carmichael, 1992). Do sada je opisano dva analoga anatoksina, anatoksin-a i homoanatoksin-a, koji pripadaju grupi sekundarnih amina i predstavljaju potentne agoniste nikotinskih acetilholinskih receptora (nAChR) (Namikoshi sar., 2003).

Sposobnost produkcije anatoksina-a poseduje veliki broj različitih vrsta i rodova cijanobakterija uključujući *Chrysoosporum* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Anabaena flos-aquae*, *A. lemmermannii*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Tychonema* i *Woronichinia* (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-06/documents/anatoin-a-report-2015.pdf>).

Po svojoj hemijskoj strukturi, anatoksin-a predstavlja fosfatni ester cikličnog N-hidroksiguanina (Sivonen i Jones, 1999) čiji mehanizam delovanja je sličan sintetičkim organofosfatnim insekticidima (Carmichael, 1994). Anatoksin-a predstavlja potentan postsinaptički depolarišući neuromuskularni blokirajući agens koji deluje kao agonista acetilholina (Corbel i sar., 2014). Za razliku od acetilholina, anatoksin-a se ne degradira od strane enzima acetilholinesteraze i shodno tome izaziva neprekidnu stimulaciju mišićnih ćelija (Carmichael, 1994; Lilleheil i sar., 1997). U slučaju respiratornih mišića, paraliza mišićnih ćelija uslovljava nedovoljnu oksigenacija mozga i nastanak konvulzija (Carmichael, 1994; Humpage i sar., 1994). Poput anatoksin-a, homoanatoksin-a predstavlja nikotinski (holinergički) agonist koji se vezuje za neuronske nikotinske acetilholinske receptore. Iako ovi toksini podražavaju acetilholin, oni ne podležu razgradnji acetilholinesterazom dovodeći do prekomerne stimulacije mišićnih ćelija (McElhiney i Lawton, 2005).

#### b) Saksitoksin

Saksitoksin (STX), visoko potentan neurotoksin, produkuje se od strane nekoliko slatkovodnih vrsta cijanobakterija uključujući *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon sp.*, *Aphanizomenon gracile*, *Cylindrospermopsis raciborskii* i *Lyngbya wollei* (Ballot i sar., 2010). Većina podataka vezanih za STX zabeleženi su za marinske organizme i samo mali broj podataka dostupan je za STX produkovane od strane slatkovodnih cijanobakterija. Do danas je otkriveno preko 20 analoga saksitoksina cijanobakterija i dinoflagelata (Oshima, 1995; Chorus i Bartrum, 1999) koji po svojoj hemijskoj strukturi pripadaju grupi karbamat alkaloida (McElhiney i Lawton, 2005).

Saksitoksini predstavljaju potentne paralitičke agense, koji blokiraju influks  $\text{Na}^+$  jona kroz ekscitirane membrane ometajući formiranje akcionog potencijala (Levin, 1991; Kao, 1993; Cestèle i Catterall, 2000). Usled selektivnog blokiranja voltažno-zavisnih  $\text{Na}^+$  kanala i zadržavanja propagacije impulsa između neurona, mišićne ćelije ostaju nestimulisane što dovodi do njihove paralize (Kao, 1993). Pored toga, blokiranje  $\text{Na}^+$  kanala može izmeniti selektivnu permeabilnost membrane i promeniti protok jona dovodeći do poremećaja homeostaze ćelije (Jablonski i sar., 2007). Saksitoksini se takođe mogu vezati i za kalcijumove i kalijumove kanale, utičući na brzinu njihovog otvaranja i zatvaranja, što može dovesti do izmene u influksu jona u ćeliji (Wang i sar., 2003; Su i sar., 2004). Krajnji rezultat dejstva saksitoksina je brza paraliza mišića koja dovodi do zaustavljanja respiracije i smrti kod sisara (Carmichael, 1992; Kao, 1993) odnosno poremećaja koordinacije i motorike kod riba (Lefebvre i sar., 2005).

- Genotoksičnost cijanobakterija

Cijanobakterijski toksini značajni su sa aspekta genotoksičnosti i kancerogenog efekta koji imaju na ćelije sisara. Glavni mehanizam delovanja mikrocistina i nodularina (NOD) predstavlja inhibiciju enzima serin/treonin protein fosfataza koja dovodi do hiperfosforilacije ćelijskih proteina što vodi promovisanju nastanka tumora. Osim toga, mikrocistini i nodularin dovode do nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta, oksidativnog oštećenja DNK, oštećenja mikronukleusa i utiču na puteve popravke oštećenja DNK. Takođe, u eukariotskim ćelijama pomenuti cijanotoksini dovode do povećanja ekspresije velikog broja gena (TNF- $\alpha$ , proto-onkogen, gena uključenih u odgovor na oštećenje DNK, gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptozu). Pored toga, pokazano je da NOD dovodi i do nastanka aneuploidije (Žegura i sar., 2011).

U slučaju cilindrospermopsina, glavni mehanizam toksičnosti predstavlja irreverzibilnu inhibiciju sinteze proteina i mehanizam njegove toksičnosti posredovan je uracilskim ostacima u molekulu (Žegura, 2017). CYN je progenotoksičan i metabolička aktivacija pomoću enzima citohrom P-450 neophodna je za njegovu genotoksičnu aktivnost. U metabolički aktivnim ćelijama CYN izaziva prekide DNK i ispoljava klastogenu aktivnost i uzrokuje aneuploidiju. Takođe, poznato je da CYN povećava ekspresiju p53 regulisanih gena uključenih u zaustavljanje ćelijskog ciklusa, popravku oštećenja DNA i apoptozu. Preliminarne studije sa glodarima ukazale su da CYN može dovesti do nastanka tumora i da poseduje sposobnost transformacije ćelija (Žegura i sar., 2011).

Međutim, iako su pomenuti cijanotoksini genotoksični mehanizam njihov delovanja se dosta razlikuje. MC-LR indukuje indirektno oštećenje DNK preko povećanja oksidativnog stresa koji dovodi do oksidacije baza u molekulu DNK i negativno utiče na mehanizam popravke DNK što sve zajedno doprinosi genetičkoj nestabilnosti (Žegura, 2017). Upravo zbog toga, 2010. godine Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstala je MC-LR kao mogući karcinogen za ljude (grupa 2B). Iako nema dovoljno dostupnih informacija za klasifikaciju drugih cijanobakterijskih toksina, postojeći podaci *in vitro* i *in vivo* studija ukazuju na to da NOD i posebno CYN mogu predstavljati daleko ozbiljniju pretnju za zdravlje ljudi i životinja u odnosu na MC-LR (Žegura i sar., 2011). Za razliku od mikrocistina, CYN je pro-genotoksičan i smatra se da poseduje nekoliko potencijalnih reaktivnih mesta koja mu omogućavaju direktnu interakciju sa DNK (Žegura, 2017). Imajući u vidu da se cijanobakterijski toksini javljaju u kompleksnim smešama, kao i da su brojne studije pokazale da je toksični/genotoksični potencijal ekstrakata cijanobakterijskih smeša daleko veći od prečišćenih toksina, miksture toksina mogu predstavljati daleko ozbiljniji zdravstveni rizik (Žegura i sar., 2011).

#### 1.2.4.2. Sudbina cijanotoksina u terestričnim ekosistemima

Stabilnost cijanotoksina u spoljašnjoj sredini zavisi prvenstveno od efikasnosti različitih procesa degradacije (fotolize, hidrolize i bakterijske degradacije). Pored toga, različite grupe cijanotoksina ispoljavaju različitu hemijsku stabilnost u zemljištu (Corbel i sar., 2014). Mikrocistini mogu biti prisutni u poljoprivrednim zemljištima tokom veoma dugog vremenskog perioda, sa polu životom između 6 i 17,8 dana (Chen i sar., 2006). Međutim, čak i nakon 170 godina mikrocistini su detektovani u herbarskim vrstama cijanobakterija izolovanih iz

terestričnih i vodenih ekosistema (Metcalf i Codd., 2012). Istrajnost ovih toksina u osušenim ćelijama cijanobakterija tokom dužeg perioda ukazuje na mogućnost njihovog ponovnog oslobađanja u zemljište nakon hidratacije ćelija u uslovima spoljašnje sredine (Chen i sar., 2006).

U zemljišnim ekosistemima uklanjanje cijanotoksina se uglavnom odvija preko mikrobnog degradacije (Miller i Fallowfield, 2001; Chen i sar., 2006). Zemljišne bakterije kao što su *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp. imaju sposobnost degradacije mikrocistina (Manage i sar., 2009). Degradacija MC-LR rezultat je prisustva mikrocistin-degradirajućeg genskog klastera *mlrA*, *B*, *C* i *D* koji je sekvencioniran kod vrste *Sphingomonas* sp. (Bourne i sar., 2001).

Imajući u vidu da terestrične biljke, uključujući poljoprivredne važne biljke, mogu da bioakumuliraju cijanotoksine i stoga da predstavljaju potencijalan zdravstveni rizik za ljude i životinje, od sve većeg značaja postaje proučavanje sudbine mikrocistina u zemljišnim ekosistemima (Corbel i sar., 2014). Međutim, u poređenju sa vodenim ekosistemima, informacije o efektima cijanotoksina na netargetne organizme u terestričnim sredinama su izuzetno retke i sudbina toksina u zemljišnim ekosistemima i fitotoksičnost su još uvek nedovoljno proučene (Corbel i sar., 2014) kao i sama produkcija toksina kod zemljišnih cijanobakterija. Shodno tome, prilikom procene ekotoksikološkog značaja cijanotoksina u terestričnim sredinama usled nedovoljne proučenosti vrši se ekstrapolacija na osnovu ekotoksikoloških rezultata dobijenih za cijanotoksine vodenih ekosistemima (Dulić i sar., 2017). Upravo zbog toga, detaljnije i opsežnije analize produkcije cijanotoksina od strane zemljišnih cijanobakterija od vitalnog su značaja u cilju boljeg razumevanja sudbine cijanotoksina u zemljišnim ekosistemima i njihovog uticaja na živi svet.

#### 1.2.4.3. Metode detekcije cijanotoksina

Pojavljivanje toksičnih cijanobakterija širom sveta, kontaminacija životne sredine cijanotoksinima i potencijalno izlaganje ljudi cijanotoksinima preko vode za piće i rekreaciju dovelo je do nastanka velikog broja metoda za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju cijanotoksina i njihovih producenata (Kurmayer i Christiansen, 2009; Lawton i sar., 2010). S obzirom da je korišćenjem mikroskopa nemoguće razlikovati toksične sojeve cijanobakterija od netoksičnih sojeva razvijene su senzitivne analitičke metode i bioeseji u cilju determinacije koncentracije cijanotoksina u spoljašnjoj sredini kao i u kulturama cijanobakterija (Ouellette i Wilhelm, 2003; Oehrle i sar., 2010; Joung i sar., 2011). Metode za detekciju cijanotoksina podeljene su u nekoliko grupa i uključuju: analitičke metode, bioanalitičke metode, molekularne metode i biološke eseje (Koreivieni i Belous, 2012).

#### 1. Analitičke metode

Jedna od najsenzitivnijih metoda za detekciju cijanotoksina je tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) koja omogućava utvrđivanje različitih tipova toksina i njihovih varijanti (Poon i sar., 2001; Spooft i sar., 2001). Za brzu detekciju različitih cijanotoksina, HPLC-MS/MS metoda je veoma korisna zbog toga što omogućava direktno injektovanje uzorka u sistem bez prethodnog „čišćenja“ uzorka (Hedman i sar., 2008). U slučaju malih količina uzorka,

preimućstvo u analitičim metodama ima matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija-time of flight-masena spektrometrija (MALDI-TOF-MS). Pored toga, MALDI-TOF-MS metoda ne uključuje proces purifikacije uzorka u poređenju sa HPLC metodom i bioesejima (Fastner i sar., 2001; Welker i sar., 2002). U slučaju gasne hromatografije (GC), koja se bazira na oksidaciji toksina, nedostatak metode predstavlja nemogućnost determinacije individualnih toksina zbog čega ova metoda ne može da se primenjuje u monitoringu vodenih ekosistema prema propisanim regulativama (Sano i sar., 1992; Kaya i Sano, 1998). Sa druge strane, primenom tankoslojne hromatografije (TLC) dobijaju se kvantitativni rezultati za toksine i TLC se smatra pogodnom u skrining analizama (Koreiviene i Belous, 2012).

## 2. Bioanalitičke metode

U bioanalitičke metode detekcije cijanotoksina spadaju enzimski imuno-vezujuć test (ELISA) i esej inhibicije enzima protein fosfataze 1 (PP1 esej). Ove dve metode našle su široku primenu u skriningu i evaluaciji toksičnosti cijanotoksina u mnogim laboratorijama (Dörr i sar., 2010). ELISA, koja se bazira na vezivanju mikrocistina za monoklonalna ili poliklonalna antitela, spada u brze i relativno jeftine metode i omogućava detekciju veoma malih koncentracija cijanotoksina (ng/L) u uzorcima vode i tkiva (Lawton i Edwards, 2008; Sivonen, 2008). Međutim, glavni nedostaci ELISA metode su sledeći: primenom ELISA procenjuje se samo totalna vrednost cijanotoksina u uzorku, ne identifikuju se individualne izoforme toksina, ne dobija se procena toksičnosti, zbog unakrsne reaktivnosti mogu se dobiti lažno pozitivni rezultati (Nicholson i Burch, 2001; Lawton i sar., 2010). Sa druge strane, PP1 esej se koristi za evaluaciju toksičnog efekta mikrocistina i nodularina, jer se PP1 esej bazira na specifičnoj inhibiciji enzima serin/treonin fosfataza (tip 1 (PP-1) i 2A (PP-2A) protein fosfataza) odgovornih za defosforilaciju intracelularnih fosfoproteina (Figueiredo i sar., 2004; Msagati i sar., 2006). Za detekciju neurotoksina koristi se bioesej baziran na inhibiciji enzima acetilholinesteraze (AChE) (Mahmood and Carmichael, 1987). Međutim, glavni nedostatak predstavlja odsustvo selektivnosti jer esej može da detektuje prisustvo i drugih toksičnih jedinjenja poput organofosfatnih pesticida (Chorus i Bartrum, 1999).

## 3. Molekularne metode

Molekularne metode koriste se za indirektno determinisanje toksigeničnosti cijanobakterija, odnosno toksičnih genotipova cijanobakterija. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR metoda) predložena je kao brza metoda determinacije prisustva potencijalno toksičnih vrsta cijanobakterija i kvantifikacije toksičnih cijanobakterija sa sposobnošću sinteze mikrocistina dizajniranjem prajmera baziranih na *mcy* genima (Tillett i sar., 2000; Pan i sar., 2002). Zbog visoke senzitivnosti PCR metode, toksični genotipovi mogu biti determinisani što je od posebnog značaja za vodene ekosisteme u cilju efikasnijeg monitoringa i detekcije prisustva potencijalno toksičnih vrsta cijanobakterija. Pored PCR, qPCR se takođe može koristiti za direktnu kvantifikaciju toksičnih gena (Koreiviene i Belous, 2012).

#### 4. Biološki eseji

Za procenu toksičnosti cijanotoksina koristi se širok spektar različitih bioeseja uključujući: bioeseje sa bakterijama (*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*), biljkama (*Spirodela oligorrhiza*, *Solanum tuberosum*, *Sinapis alba*, *Lemna minor*), artropodama (*Daphnia* spp., *Artemia salina*, larvama *Thamnocephalus platyurus*), insektima (*Locusta migratoria*), embrionima riba (*Danio rerio*) i bioeseje sa sisarima (miševima, pacovima i u nekim slučajevima svinjama) (Nicholson i Burch, 2001; Figueiredo i sar., 2004). Međutim, iz etičkih razloga *in vitro* bioeseji sa ćelijskim linijama imaju daleko veću upotrebu u odnosu na biotestove sa sisarima. Pored toga, *in vitro* bioeseji takođe pokazuju dobru korelaciju sa HPLC analizama (Heinze i sar., 2001).

*In vitro* bioeseji za detekciju toksičnosti od izuzetnog su značaja za utvrđivanje toksičnog efekta pojedinačnih hemikalija ili mikstura jedinjenja iz spoljašnje sredine. Ovi testovi koriste se za procenu totalnog specifičnog toksičnog potencijala i uključuju interakcije između različitih jedinjenja (Hilscherova i sar., 2000). Bioeseji sa akvatičnim organizmima dugo su bili zanemarivani iako su neke studije ukazale na mogućnost upotrebe vodenih organizama za detekciju cijanotoksina sa fokusom na mikrocistine (Törökné i sar., 2000; Tarczinska i sar., 2001; Sabour i sar., 2002; Drobniewska i sar., 2004). Danas, bioeseji koji se koristi u rutinskim ispitivanjima toksičnog efekta različitih cijanobakterijskih sojeva uključuju:

##### a) *Artemia salina* bioesej

Bioesej *A. salina* koristi se kao generalni model za toksičnost (Berry i sar., 2004) i predstavlja jedan od najčešće korišćenih bioeseja sa invertibratima tokom poslednjih 30 godina (Hamidi i sar., 2014). Među različitim vrstama roda *Artemia*, *A. salina* se uglavnom koristi kao eksperimentalni test organizam (Campbell i sar., 1994; Hamidi i sar., 2014). Iako bioesej ne pruža adekvatne informacije u pogledu mehanizma delovanja toksičnih jedinjenja, bioesej sa *A. salina* je veoma koristan za procenu toksičnog potencijala različitih tipova ekstrakata. Rezultati dobijeni u ovom bioeseju obezbeđuju preliminarne podatke koji su veoma značajni za dalju primenu sofisticiranih metoda u cilju identifikacije biološki aktivnih jedinjenja sa toksičnim potencijalom (Hamidi i sar., 2014).

Glavne prednosti upotrebe bioeseja sa *A. salina* su (Hamidi i sar., 2014):

- 1) brzo dobijanje rezultata (relevantni podaci za izračunavanje LC<sub>50</sub> vrednosti se dobijaju nakon 24h izlaganja);
- 2) jednostavnost izvođenja (nije neophodna skupa i posebna oprema);
- 3) niski zahtevi (nisu potrebni aseptični uslovi, mogućnost dobijanja velikog broja test organizama istog uzrasta i fiziološkog stanja);
- 4) robusnost (jaja su komercijalno dostupna);
- 5) niski troškovi izvođenja (količina jaja neophodna za jedan test je veoma mala);
- 6) reproducibilnost (visok stepen ponovljivosti dobijenih rezultata).

Pored toga, bioesej *A. salina* smatra se i dobrom alternativnom metodom umesto bioeseja sa miševima (Kiviranta i sar., 1991; Lawton i sar., 1994, McElhiney i Lawton, 2005). U pogledu cijanotoksina, račići vrste *A. salina* osetljivi su na efekat mikrocistina (MC-LR) (Delaney i



Wilkins, 1995) pri čijem izlaganju dolazi do povećanja aktivnosti detoksifikacionog sistema glutation S-transferaze (GST).

b) *Daphnia magna* bioesej

*Daphnia magna* jedna je od najčešće korišćenih vrsta invertebrata koja je našla široku primenu u ekotoksikologiji (OECD, 2006) zbog svoje relativno visoke senzitivnosti za toksine, brze reprodukcije i kratkog životnog veka (Smutná i sar., 2014). U odnosu na bioeseje sa miševima, bioesej sa vrstom *Daphnia magna* predstavlja senzitivnu metodu za detekciju brzo-delujućih neurotoksina u prirodnim uzorcima (Ferrão-Filho i sar., 2010) zbog čega je veoma dobar za ispitivanje toksičnosti efekta ne samo hepatotoksina (npr. mikrocistina) već i neurotoksina poput saksitoksina (Ferrão-Filho i sar., 2008, 2009).

Efekti cijanobakterijskih toksina na zooplankton, naročito na predstavnike iz reda *Cladocera*, su raznoliki i pokazano je da utiču na preživljavanje, rast i plodnost (DeMott i sar., 1991; Rohrlack i sar., 1999a,b; Ferrão-Filho i sar., 2000; Lürling, 2003; Wilson i Hay, 2007) ali takođe i na proces ishrane i pokretljivost (DeMott i Moxter, 1991; Haney i sar., 1995; Rohrlack i sar., 2005; Ferrão-Filho i sar., 2008).

Glavne prednosti upotrebe bioeseja sa *Daphnia magna* su:

- 1) mala količina uzorka koja je potrebna (svega nekoliko mililitara sirove vode);
- 2) metoda nije skupa i ne zahteva puno materijala;
- 3) brzo dobijanje rezultata (od 24h do 48h);
- 4) metoda je u saglasnosti sa direktivom o dobrobiti životinja;
- 5) eliminisan je uticaj pola i starosti s obzirom da standardni test koristi samo novorođene jednike i partenogenetske ženke;
- 6) bioesej pokazuje visoku senzitivnost;
- 7) metoda je takođe specifična i za detekciju reverzibilnog delovanja neurotoksina. Za razliku od bioeseja sa miševima gde krajnji efekat predstavlja smrt jedinke zbog paralize dijafragme i respiratornog zastoja, u ovom bioeseju životinje ostaju žive, imobilisane za dno suda pri čemu se potpuni oporavak postiže prebacivanjem jedinki u čist medijum (Ferrão-Filho i sar., 2010).

c) *Danio rerio* bioesej

U konvencionalnim ekotoksikološkim strategijama testiranje riba predstavlja neophodnu komponentu integriranih strategija utvrđivanja prisustva toksina u vodenim ekosistemima (Lammer i sar., 2009). Vrsta *Danio rerio*, poznatija kao zebrića, pripada grupi malih ciprinida iz familije *Cyprinidae* čije prirodno stanište predstavlja reka Gang u Aziji (Eaton i Farley, 1974). Zebrice žive u slatkovodnim tropskim ekosistemima i u zreлом adultnom stupnju dostižu veličinu od 3-5 cm, odnosno 1 cm u larvalnom stupnju razvoja. Zebrice su uvedene kasnih 1980-ih i ranih 1990-ih godina kao model organizam u neurobiologiji i za proučavanje procesa koji se odigravaju tokom razvoja (Kimmel i sar., 1995). S obzirom da zebrice pripadaju vertebratima kodirajuće sekvence mnogih gena i njihove regulatorne sekvence konzervirane su između zebrica i ljudi (Muller i sar., 2002; Kikuta i sar., 2007).

Embrioni *Danio rerio* predstavljaju izuzetan model za proučavanje fundamentalnih procesa koji se dešavaju tokom embrionalnog razvoja posebno zbog činjenice da je razvoj zebrića veoma sličan embriogenezi kod viših vertebrata, uključujući i ljude. Embrioni zebrića razvijaju se izvan tela ženke i potpuna transparentnost omotača (horiona) koji se nalazi oko jajeta omogućava veoma lako i detaljno posmatranje razvoja embriona (Busquet i sar., 2008). Pored toga, razvoj embriona je veoma brz, 24 h nakon postfertilizacije svi glavni organi su formirani dok 72 h nakon postfertilizacije dolazi do „izlaska“ jedinke iz jajeta (Dahm i Geisler, 2006).

Karakteristike ove vrste kao što su visoka reproduktivna stopa (r-strategisti - jedna odrasla ženka može da produkuje 50-200 jaja dnevno) (Nagel, 1993), lako posmatranje embriogeneze i razvoja organa učinili su da zebriće postanu glavni model organizam u razvojnoj i generalnoj molekularnoj biologiji. Pored toga, i druge karakteristike (mala veličina, brz i spoljašnji razvoj embriona, postojanje genomske baze podataka, dostupnost molekularnih metoda i relativno visoka ontologija sa humanim genima) doprinele su uspostavljanju zebrića kao model organizma za proučavanje humanih bolesti i za skrining lekova (Briggs, 2002; Grunwald i Eisen, 2002; Ackermann i Paw, 2003; Scholz i sar., 2008; Liu i Leach, 2011;).

*Danio rerio* test (DarT test) uveden je od strane Nagel (2002) kao zamena za tradicionalni akutni test toksičnosti sa ribama (Braunbeck i Lammer, 2005, 2006; OECD, 2006; ISO 15088:2007, 2007). Test sa *Danio rerio* embrionima standardizovan je na internacionalnom nivou (ISO; 2007) i embrioni i eleuteroembrioni (životni interval između „izlaska“ jedinke iz jajeta i početka egzogenog hranjenja) smatraju se alternativnom metodom u kontekstu Evropske legislative (EFSA, 2005) kao najpouzdanija zamena za klasičan akutni test toksičnosti sa ribama koji traje do 96h (Voelker i sar., 2007). S obzirom da tokom trajanja DarT testa (48h) embrioni ne „izlaze“ iz jajeta, studije sa embrionima klasifikovane su kao neživotinjski testovi (Nagel, 2002). DarT test se smatra bezbolnim *in vitro* testom i prihvaćen je kao zamena za eksperimente sa životinjama (Voelker i sar., 2007). Od 2005 godine test toksičnosti sa embrionima riba (FET) predstavlja obaveznu komponentu u rutinskim toksikološkim testiranjima u Nemačkoj (DIN, 2001). Na osnovu svega navedenog, zebriće se smatraju generalnim modelom za utvrđivanje embriotoksičnosti i teratogenosti (Weigt i sar., 2010). DarT test se bazira na ispitivanju letalnih i sub-letalnih krajnjih tačaka razvoja embriona zebrića gajenih tokom 48h (Bichara i sar., 2013).

U odnosu na tipove toksičnosti, zebriće se koriste za ispitivanje uticaja različitih jedinjenja na (Hill i sar., 2005):

- 1) reproduktivnu toksičnost;
- 2) razvojnu toksičnost;
- 3) akutnu toksičnost;
- 4) neurotoksičnost;
- 5) kardiotoksičnost;
- 6) okularnu toksičnost;
- 7) endokrinu disrupciju;
- 8) neurobiheviornalnu toksičnost;
- 9) vaskularnu toksičnost;
- 10) karcinogenost.

Zbog svega navedenog, embrioni zebrića postaju sve značajniji model organizama u farmakološkim studijama (Parng i sar., 2002), toksikološkim studijama (Teraoka i sar., 2003), u molekularnoj biologiji (Malicki i sar., 2002) i proizvodnji lekova (Moon i sar., 2002). Od posebnog značaja predstavlja ispitivanje promene transkripcije gena s obzirom da se efekti prirodnih i sintetičkih jedinjenja na nivo ekspresije gena mogu javiti čak i pre nego što se fiziološke posledice uoče. Na taj način, praćenje obrasca ekspresije gena (smanjenje ili povećanje) može obezbediti uvid u molekularne mehanizme uključene u odgovor na toksine. U tom pogledu, efekti toksina na ekspresiju gena kod zebrića mogu poslužiti kao surogat za efekte kod sisara (Faltermann i sar., 2014).

### 1.3. Rasprostranjenost cijanobakterija

Izuzetan uspeh cijanobakterija na prilagođavanje širokom spektru različitih spoljašnjih i ekoloških uslova u velikoj meri pripisuje se upravo prisustvu izuzetno fleksibilnog repertoara metaboličkih puteva (Vermaas, 2001). Metabolička raznovrsnost cijanobakterija oslikava diverzitet rasprostranjena cijanobakterija (Ruffing, 2011). Cijanobakterije poseduju efikasne celularne mehanizme koji mogu da funkcionišu u aneobnim uslovima (koji su postojali tokom ere Arhea), i njihove metaboličke aktivnosti zaslužne su za stvaranje današnjeg kiseonikom bogatog okruženja na Zemlji (Kasting, 2001). Zapravo, mnoga arhaična metabolička svojstva zadržana su kod današnjih cijanobakterijskih vrsta, omogućavajući im da prežive u različitim ekološkim nišama (Bandyopadhyay i sar., 2011). Pored toga, zahtevajući samo svetlost, vodu, ugljen-dioksid i neorganske soli, cijanobakterije imaju veoma jednostavne i skromne zahteve prema nutrijentima što im dozvoljava da naseljavaju različite ekosisteme (Arima i sar., 2011). Za razliku od drugih fotosintetičkih organizama, cijanobakterije naseljavaju najširi spektar ekoloških staništa. Cijanobakterije žive u slatkovodnim, slanim, brakičnim vodama, terestričnim ekosistemima, polarnom snegu ili ledu (Blaženčić, 2000; Svirčev i sar., 2011). Pored toga, temperaturni opseg koji cijanobakterije mogu da prežive je izuzetno velik obuhvatajući temperature od  $-83^{\circ}\text{C}$  na Antarktiku do  $+70^{\circ}\text{C}$  u termalnim vodama (Blaženčić, 2000). Zbog prisustva PSII reakcionog centra koji može da preuzima elektrone iz vode, cijanobakterije nisu ograničene na okruženja sa ređim donorima elektrona, što je slučaj sa drugim neoksigenskim fotosintetičkim prokariotima. U suštini, cijanobakterije su sposobne da uspostave kompetitivan rast u bilo kom okruženju čak i sa privremenim izvorom vode i svetlosti (Gupta i sar., 2013). Vremenske i prostorne varijacije koje su se dešavale tokom evolucije i sticanje mnogih gena i fizioloških osobina doprinele su uspešnom rastu cijanobakterija u najrazličitijim životnim sredinama (Prasanna i sar., 2009; Ahmed i sar., 2010). Pored toga, cijanobakterije su poznate još i kao ekstremofili i pionirski organizmi (Whitton i Pots, 2000). Kao primarni kolonizatori u različitim vodenim i terestričnim staništima, cijanobakterije imaju ključnu ulogu i predstavljaju osnovu u lancima ishrane (Gupta i sar., 2013).

Međutim, većina studija rasprostranjenosti cijanobakterija su bila fokusirana na izučavanje cijanobakterija vodenih ekosistema u kojima cijanobakterije predstavljaju veoma raznovrsnu i brojnu grupu mikroorganizama (Sant'Anna, 1984). Istraživanja diverziteta i funkcije zemljišnih ekosistema su i dalje nedovoljna iako je zemljište nesumnjivo najveći „depo“ mikroorganizama na planeti Zemlji (Fitter i sar., 2005). Zemljišni mikroorganizmi predstavljaju problem za

istraživanja funkcije biodiverziteta, s obzirom na činjenicu da često nije poznat njihov identitet i funkcija u samom zemljištu. Pored toga, procena biodiverziteta zemljišnih mikroorganizama nije laka i kultivacija mnogih mikroorganizama je veoma teška onemogućavajući njihovu dalju karakterizaciju (Bowker i sar., 2010). Upravo zbog toga, podaci o diverzitetu i distribuciji cijanobakterija u ovim staništima i dalje zaostaju daleko iza istraživanja slatkovodnih i morskih sredina (Neustupa i Škaloud, 2010).

U terestričnim sredinama, cijanobakterije se mogu javiti na različitim podlogama kao što su stene (Büdel i sar., 2002), zemljište (Jaag, 1945; Evans i Johansen, 1999), kora drveta (Desikachary, 1959; Hoffmann, 1989). Prema Hoffmann-u (1989), terestrične cijanobakterije mogu biti klasifikovane na osnovu njihovog mesta pojavljivanja kao: edafske (naseljavaju zemljište), litofilne (naseljavaju kamen), epifitne (rastu na biljkama) ili epizoične (rastu na životinjama). U odnosu na litofilnu, epifitnu i epizoičnu floru, cijanobakterijska flora edafskih staništa je relativno dobro proučena (Hoffmann, 1989). Međutim, taksonomske studije terestričnih cijanobakterija su i dalje retke u svetu i većina studija fokusirana je uglavnom samo na edafske organizme (Johansen, 1993; Flechtner i sar., 1998; Tirkey i Adhikary 2006; Lemes-da-Silva i sar., 2012).

Zahvaljajući svojoj genetskoj i fiziološkoj raznovrsnosti, kao i dugom evolucionom istorijom, cijanobakterije su od izuzetnog značaja za proučavanje funkcionisanja i održavanja kompleksnih ekosistema poput šumskih ekosistema (Alvarenga i sar., 2015). U ovakvim kompleksnim biomima, cijanobakterije su tradicionalno zanemarivane u većini studija biodiverziteta i još više u studijama njihove konzervacije (Rejmánková i sar., 2004). Procene zasnovane na postojećim opisima cijanobakterija ukazuju na postojanje velikog broja i dalje nepoznatih vrsta (Nabout i sar., 2013) pri čemu se procenjuje da taj broj može biti daleko veći od očekivanog. Takođe, imajući u vidu i mali broj dostupnih istraživanja i ograničenja tradicionalnih pristupa identifikacije, smatra se da je sadašnji poznat diverzitet cijanobakterija znatno potcenjen (Hoffmann i sar., 2005; Engene i sar., 2011; Alvarenga i sar., 2015). Moderne analize mikroflore cijanobakterija iz još uvek nepoznatih i slabo okarakterisanih staništa, naročito sa ekstremnim uslovima ili u tropskim oblastima, ukazuju da je broj različitih morfo i ekotipova sa takvih lokaliteta daleko raznovrsniji (Taton i sar., 2003; Gugger i sar., 2005; Komárek i sar., 2005; Fiore i sar., 2007; Turricchia i sar., 2009; Sant` Anna i sar., 2010). Shodno tome, izolacija i karakterizacija zemljišnih cijanobakterija iz šumskih ekosistema, kao još uvek veoma slabo okarakterisanih područja, od izuzetnog je značaja. Pored toga, na teritoriji Republike Srbije većina studija o cijanobakterijama uglavnom je vezana za cijanobakterije vodenih ekosistema (Simeunović, 2004; Svirčev i sar., 2006; Svirčev i sar., 2007; Svirčev i sar., 2009; Simeunović, 2009; Svirčev i sar., 2013; Svirčev i sar., 2014; Drobac, 2016; Tokodi, 2016) iako su rezultati Simeunović (2005) i Svirčev (1992) pokazali da terestrične cijanobakterije izolovane iz različitih tipova zemljišta sa teritorije Vojvodine predstavljaju bitne konstituente zemljišnih ekosistema sa raznovrsnim metaboličkim putevima. Sa druge strane, studije terestričnih cijanobakterija šumskih ekosistema sa teritorije Republike Srbije su i dalje retke i do sada višegodišnji monitoring i karakterizacija cijanobakterijskih sojeva šumskih ekosistema nisu rađeni.

#### 1.4. Cijanobakterije terestričnih staništa i njihove adaptivne strategije

Terestrične cijanobakterije predstavljaju važne primarne producente unutar površinskih slojeva zemljišta (Whitton i Potts, 2000). Zemljišne zajednice cijanobakterija uglavnom su sačinjene iz filamentoznih heterocistnih i neheterocistnih cijanobakterija koje često imaju sposobnost kretanja. Među najčešće prisutnim vrstama i rodovima cijanobakterija spadaju *Microcoleus vaginatus*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Calothrix*, *Leptolyngbya* (Whitton i Potts, 2000; Garcia-Pichel i sar., 2001; Boyer i sar., 2002; Komárek i Anagnostidis, 2005). Na zastupljenost određenih rodova cijanobakterija i vrsta cijanobakterija u zemljištu utiču brojni faktori poput: svetlosti, vlažnosti, pH vrednosti, dostupnosti mineralnih nutrijenata i azota (Granhall, 1975). U cilju preživljavanja nepovoljnih uslova (UV-B zračenja, perioda suše i dr.) koji se javljaju u terestričnim staništima cijanobakterije su razvile raznolike strategije u cilju adaptacije i prilagođavanja (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991; Karsten i Garcia-Pichel, 1996; Bowker i sar., 2002; Xie i sar., 2009) poput:

1) Izbegavanja: u prirodi mnoge vrste filamentoznih cijanobakterija imaju sposobnost kretanja (npr. *Microcoleus*) što im obezbeđuje neometane pokrete kroz zemljište u zavisnosti od dostupnosti vode i svetlosti čime se „obezbeđuju“ povoljniji uslovi životne sredine;

2) Rezistencije: mnoge cijanobakterije proizvode UV zaštitne komponente poput pigmenata scitonemina, mikosporina i nekih karotenoida. Poznato je da različiti rodovi cijanobakterija imaju sposobnost produkcije datih jedinjenja (*Microcoleus*, *Nostoc*, *Scytonema* itd.). Scitonemin, pigment nerastvorljiv u vodi, lokalizovan je u ekstracelularnom polisaharidnom omotaču cijanobakterija i specifično je povezan sa vodenim „stresnim“ proteinom. Glikan koji čini osnovni matriks ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) obezbeđuje milje unutar koga su centralne komponente (vodeni „stresni“ protein, fotoprotektivni pigmenti - mikosporini i scitonemin) raspoređene na kompleksan način (Wright i sar., 2005);

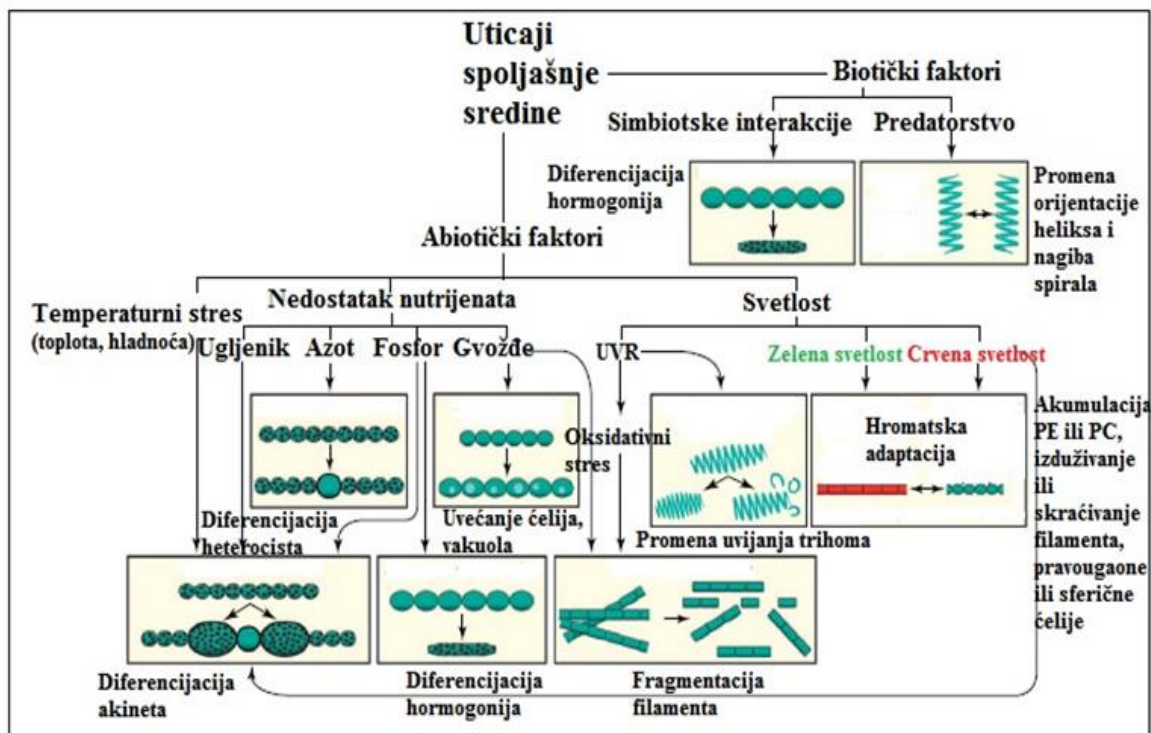
3) Fleksibilnosti i aktiviranja mehanizama popravke: ukoliko gore pomenuta dva mehanizma nisu dovoljna da se izbegnu oštećenja nastala reaktivnim kiseoničnim vrstama (ROS), cijanobakterije mogu angažovati mehanizme za popravku nastalih oštećenja u cilju preživljavanja;

4) Regulacije metaboličke aktivnosti tokom perioda isušivanja: proces isušivanja predstavlja složen mehanizam koji izrazito mali broj organizama može da preživi (Potts, 1994; Potts, 2001). Jedan od molekularnih mehanizama oštećenja koji dovodi do smrti nakon isušivanja kod ćelija osetljivih na sušu je „napad“ slobodnih radikala na molekul DNK, proteine i fosfolipide (Oliver i sar., 2001). S obzirom da u ćelijama cijanobakterija, fotosintetički elektron transportni lanac predstavlja izvor generisanja ROS-a (Nishiyama i sar., 2006), regulacija metaboličke aktivnosti (respiracije i fotosinteze) izuzetno je bitna tokom rehidracije kao i tokom isušivanja (Higo i sar., 2008). Upravo zbog toga, u cilju suzbijanja potencijalnog negativnog efekta ROS-a u isušanim kolonijama dolazi do inhibicije fotosintetičke aktivnosti (Sakamoto i sar., 2009). Kontrolisanje respiratorne aktivnosti na adekvatnom nivou tokom rehidracije važno je za pravilno uspostavljanje celularnog metabolizma (Higo i sar., 2008). Rehidracija predstavlja složen proces u kome je ekspresija određenih gena, naročito gena uključenih u metaboličke procese dramatično indukovana (Higo i sar., 2007). Takođe, rehidracija nije jednostavan proces oporavka s obzirom da se nakon rehidracije mogu uočiti oštećenja DNK molekula i membrana

(Potts, 1994). „Ahidrobioza“ predstavlja sposobnost određenih organizama otpornih na sušu da iz stanja bez metaboličke aktivnosti brzo povrate metaboličku aktivnost nakon rehidracije (Billi i Potts, 2000; Clegg, 2001; Crowe i sar., 1998; Crowe, 2002; Potts, 2001). Neke vrste terestričnih cijanobakterija poput *Nostoc commune* smatraju se ahidrobiotičkim mikroorganizmima sa oksigenim fotosintetičkim sposobnostima bez diferenciranja u akinete (Potts, 1994; Potts, 1999; Potts, 2000). Mehanizam ekstremne tolerancije na isušivanje kod ove vrste smatra se da uključuje više procesa poput produkcije ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS), akumulacije kompatibilnih rastvora, regulacije fotosinteze i zaštite od UV zračenja (Matsui i sar., 2011). EPS imaju zaštitnu ulogu redukovanjem razmene vode sa okruženjem čime se sprečava gubitak vode i omogućava apsorbovanje vlage direktno iz atmosfere (Caiola i sar., 1996; Chen i sar., 2006). Pored toga, kod vrste *Nostoc commune* egzopolisaharidi takođe doprinose zaštiti ćelijskih zidova i tilakoidnih membrana da ostanu intaktne i sprečavaju fuziju membranskih vezikula i time nastanak oštećenja ćelija prouzrokovan isušivanjem i ponovnim hidriranjem (Hill i sar., 1997; De Philippis i Vincenzini, 1998; Pereira i sar., 2009). Na kraju važno je napomenuti da se mogućnost preživljavanja nepovoljnih uslova razlikuje između različitih vrsta cijanobakterija (Katoh i sar., 2004; Higo i sar., 2006).

5) Posedovanje osmoprotektivnih jedinjenja i održavanje niskog intracelularnog sadržaja neorganiskih jona: čak i pri visokim koncentracijama osmoprotektivna jedinjenja kompatibilna su sa ćelijskim metabolizmom i sposobna su da štite makromolekule od denaturacije i time da unaprede svoju funkciju odbrane od stresa u ćelijskom okruženju (Nagasathya i Thajuddin, 2008). Kod ahidrobiotičkih organizama dolazi do akumulacije trehaloze ( $\alpha$ -D-glukopiranozil-[1,1]- $\alpha$ -D-glukopiranozide) kao kompatibilnog rastvora (Matsui i sar., 2011). Trehaloza štiti biološke membrane i proteine od štetnih efekata uklanjanja vode tako što zamenjuje molekule vode i formira amorfne strukture (proces poznat kao vitifikacija) (Crowe i sar., 1998; Clegg, 2001; Crowe, 2002). Kod vrste *N. commune*, akumulacija trehaloze javlja se kao odgovor na gubitak vode tokom isušivanja (Sakamoto i sar., 2009). Akumulacija trehaloze nalazi se pod kontrolom povratne sprege regulacije enzima trehalaze (Yoshida i Sakamoto, 2009). Kapacitet akumulacije trehaloze kod *N. commune* sličan je sa kapacitetom drugih cijanobakterija rezistentnih na sušu poput vrsta *Phormidium autumnale* i *Chroococciopsis* sp. (Hershkovitz i sar., 1991; Sakamoto i sar., 2009).

Upravo zbog svoje sposobnosti da prežive ekstremne uslove spoljašnje sredine, cijanobakterije terestričnih staništa predstavljaju ekstremofilne organizme za koje je karakteristično preživljavanje u uslovima na „ivici života“ (Drobac-Čik i sar., 2007). Adaptivne strategije regulacije morfogeneze cijanobakterija u zavisnosti od abiotičkih faktora (temperaturnog stresa, nedostatka nutrijenata, prekomernog zračenja) i biotičkih faktora (simbiotskih interakcija, predatorstva) prikazani su na Slici 8. Zbog adaptacije na surovije uslove spoljašnje sredine terestrične cijanobakterije poseduju specifične mehanizme preživljavanja i adaptacije koji nisu pronađeni kod vodenih vrsta cijanobakterija. Upravo zbog toga, oštriji i ekstremniji uslovi dovode do šire amplitude metaboličkih mogućnosti i shodno tome do sposobnosti produkcije najrazličitijeg spektra specifičnih metabolita (Svirčev, 2005)



Slika 8. Neke od adaptivnih strategija preživljavanja cijanobakterija u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine (Singh i Montgomery, 2011)

### 1.5. Uloga cijanobakterija u funkcionisanju zemljišnih ekosistema

Cijanobakterije igraju važnu ulogu u različitim terestričnim staništima. U nekim staništima, cijanobakterije predstavljaju jedine primarne producente, i stoga dati ekosistem zavisi od zaliha biomase cijanobakterija (Lukešová, 1993; Dodds i sar., 1995) kao što su terestrične sredine polarnih regiona (Vincet, 2000; Jungblut i sar., 2010). Pored uloge primarnih producenata, u terestričnim staništima cijanobakterije su takođe značajni producenti različitih sekundarnih metabolita poput peptida, alkaloida, makrolaktona i dr. (Carmichael, 1992; Namikoshi i Rinehart, 1996; Sivonen, 1996). Najzastupljenija jedinjenja pripadaju različitim tipovima linearnih i cikličnih peptida koji ispoljavaju jedinstven amino kiselinski sastav (Welker i von Döhren, 2006). Data jedinjenja se sintetišu preko neribozomalnog sintetičkog puta (Welker i von Döhren, 2006) koji predstavlja arhaični biohemijski proces (Rantala i sar., 2004).

Neke od najznačajnijih funkcija i uloga koje cijanobakterije imaju u funkcionisanju zemljišnih ekosistema su uloga cijanobakterija u kruženju biogenih elemenata, produkcija egzopolisaharida kao i kolonizacija „ogoljenih“ površina.

### 1.5.1. Uloga cijanobakterija u kruženju biogenih elemenata

Cijanobakterije predstavljaju važnu grupu mikroorganizama uključenu u kruženje biogenih elemenata. Prisustvo cijanobakterija u zemljištu doprinosi povećanju organske materije i nutrijenata u zemljištu. U površinskim slojevima zemljišta, u prisustvu cijanobakterija dolazi do porasta koncentracije važnih biogenih elemenata poput C i N što značajno doprinosi povećanju proliferacije drugih grupa mikroorganizama. Pored C i N, u prisustvu cijanobakterija dolazi i do povećanja Ca, Mg, K, Na i P (Acea i sar., 2003). Mogućnost vršenja azotofiksacije odnosno sposobnost usvajanja atmosferskog azota predstavlja važnu karakteristiku određenih rodova cijanobakterija (Capone i sar., 2005). Mnoge filamentozne cijanobakterije poseduju specijalizovane ćelije, heterociste, koje vrše fiksaciju atmosferskog azota. Biološka azotofiksacija katalisana je enzimskim kompleksom nitrogenazom kodiranim od strane *nif* gena (Johnston i sar., 2005).

Sposobnost azotofiksacije je takođe i od velikog ekološkog značaja. Biološka fiksacija atmosferskog azota predstavlja glavni put ulaska slobodnog azota u ekosistem (Rousk i sar., 2013) i transfera jednog dela fiksiranog azota do biljaka (Bentley i Carpenter 1984; Bashan i sar., 1998). Pokazano je da azotofiksirajuće cijanobakterije koje žive u simbiozi sa mahovinama predstavljaju glavne unosioce azota u borealnim šumskim ekosistemima (DeLuca i sar., 2002; Markham, 2009), naročito ekosistemima sa kasnim sukcesivnim statusom (Zackrisson i sar., 2004; Lagerström i sar., 2007). Pored toga, fiksacija azota od strane cijanobakterija koje žive u asocijaciji sa mahovinama je od velike važnosti za globalni ciklus kruženja azota imajući u vidu činjenicu da borealne šume zauzimaju 17% Zemljine kopnene površine (DeLuca i Boisvenue, 2012) i da skladište više organske materije od bilo kog drugog terestričnog bioma (Ininbergs i sar., 2011). Pored unosa azota, cijanobakterijske pokorice značajno povećavaju i unos mnogih drugih elemenata poput esencijalnih elemenata kao što su Cu, K, Mg i Zn u biljke (Harper i Belnap, 2001).

### 1.5.2. Produkcija egzopolisaharida

Cijanobakterije doprinose agregaciji zemljiša kako hemijski tako i fizički (Bowker i sar., 2008). Produkcija egzopolisaharida predstavlja ključni hemijski mehanizam, s obzirom da naelektrisana površina egzopolisaharida ima afinitet vezivanja za čestice gline/ilovače kao i za kalcijumova jedinjenja poput gipsa i kalcijum karbonata (Belnap i Gardner, 1993). U fizičkom smislu, egzopolisaharidi doprinose stvaranju mikroagregata sa korenjem biljaka, hifama gljiva i doprinose stabilizaciji zemljišta (Tisdale i Oades, 1982; Barthès i Roose, 2002). Pored toga, apsorbovanjem vode EPS povećaju vlažnost zemljišta i omogućavaju apsorpciju vode tokom padavina (Issa i sar., 2009).

Pored doprinosa agregaciji zemljišta, EPS cijanobakterija imaju izuzetan značaj i u formiranju cijanobakterijskih pokorica koje su od velikog ekološkog značaja (Svirčev i sar., 2013). Prisustvo ekstracelularnih polimernih supstanci omogućava povezivanje ćelija u želatinozni matriks, doprinoseći formiranju međusobno povezanih struktura cijanobakterijskih konzorcijuma (Stal, 2000). Ovakvi agregati predstavljaju kohezivne konzorcije nekoliko grupa mikroorganizama uključujući cijanobakterije, sulfat-redukujuće bakterije, bezbojne sumpor



bakterije i anoksiogene fototrofne bakterije (Klock i sar., 2007). Prisustvo cijanobakterijskih pokorica je od velikog ekološkog značaja iz više razloga:

- 1) polisaharidni omotači cijanobakterija povezuju partikule peska zajedno, stabilizirajući površinu zemljišta i sprečavaju eroziju (Pluis, 1994; Rogers i Burns, 1994);
- 2) „bubrenje“ polisaharida nakon apsorpcije vode smanjuje veličinu i broj pora u zemljištu i redukuje infiltraciju vode (Warren, 2001);
- 3) helati sekretovani od strane cijanobakterija povećavaju dostupnost nutrijenata i negativno naelektrisani cijanobakterijski polisaharidi štite katjone od ispiranja (Belnap i sar., 2001);
- 4) isprana asimilirana jedinjenja iz pokorica su važan izvor ugljenika za zemljišne mikroorganizme, što dovodi do povećanja biološke aktivnosti i stope mineralizacije zemljišta (Rao i Burns, 1990; Rogers i Burns, 1994). EPS mogu imati stimulativan efekat na aktivnost mikrobnih zemljišnih enzima zato što obezbeđuju organske nutrijente (De Caire i sar., 2000). Zbog prisustva tamno obojenih pokorica, temperatura gornjeg zemljišnjog sloja je povišena što dovodi do povećanja unošenja hranljivih materija kod biljaka (Belnap, 2003; Belnap i sar., 2003);
- 5) metabolička aktivnost cijanobakterija važna je i za formiranje lesa s obzirom da na proces stvaranja lesa u velikoj meri utiče metabolička aktivnost mikroorganizama bioloških lesnih pokorica (BLP). U ovakvim kozorcijumima, polisaharidi sekretovani od strane cijanobakterija vezuju čestice prašine unutar BLP zona i dovode do formiranja kohezivnih pokorica. Tokom sušnih perioda, BLP postaju veoma stabilne strukture otporne na uticaje vode i vetra sprečavajući eroziju zemljišta na taj način (Svirčev i sar., 2013; Dulić i sar., 2017).

- Sastav i makromolekularne karakteristike egzopolisaharida

Ekstracelularne polimerne supstance, tipično su sačinjene iz polisaharida, lipida, proteina i DNK u formi heteropolimera (lipopolisaharida ili glikoproteina) (Decho, 1990). Cijanobakterijski polisaharidi karakterišu se velikom varijabilnošću u broju ali i u tipu konstitutivnih monosaharida, koji variraju u zavisnosti od dostupnosti nutrijenata, faze rasta i uslova spoljašnje sredine (De Philippis i Vincenzini, 1998; Helm i sar., 2000; Morsy i sar., 2008; Pereira i sar., 2009). U pogledu hemijskog sastava, ekstracelularni matriks cijanobakterija uglavnom je sačinjen od heteropolisaharida velike molekulske mase koji su izgrađeni od različitih šećera poput glukoze, galaktoze, ksiloze i uronske kiseline (Pereira i sar., 2009). Heteropolisaharidi velike molekulske mase sastoje se iz linearnih ili razgranatih ponavljajućih jedinica sačinjenih iz 2-10 monosaharida. Tipični monomeri su heksoze, pentoze, uronska kiselina i deoksi-šećeri pri čemu glukoza predstavlja najčešći i najzastupljeniji monosaharid kod cijanobakterija (Parikh i Madamwar, 2006). Pored glukoze (Glc), ksiloza (Xyl) i fruktoza predstavljaju značajnije monosaharidne jedinice egzopolisaharida (De Philippis i sar., 2001; Otero i Vincenzini, 2003; Pereira i sar., 2009). Fosfati, sulfat, acetat i piruvat su karakteristični supstituenti, dok proteini i lipidi formiraju bočne lance (Klock i sar., 2007).

U zavisnosti od sastava, EPS imaju različite ćelijske funkcije:

- 1) služe za akumulaciju nutrijenata;
- 2) imaju ulogu difuzione barijere za toksine i teške metale;
- 3) utiču na pokretljivost ćelije;
- 4) obezbeđuju vezivanje ćelije za površinu supstrata;
- 5) štite ćelije od isušivanja;
- 6) formiraju okosnicu za formiranje biofilma i mikrobnih „prevlaka“ (Decho, 1990; Krumbein i sar., 1994; Decho, 2000; Stal, 2000; Decho i sar., 2005; Klock i sar., 2007);
- 7) mogu služiti kao antibakterijski agensi koji deluju na protozoe (Chen i sar., 2003).

Sve ove karakteristike EPS važne su za cijanobakterijske „prevlake“ u prirodnim staništima (Decho, 1990; Mancuso Nichols i sar., 2005; Klock i sar., 2007). Međutim, glavna funkcija EPS je da služe kao granica između bakterijskog ćelijskog zida i njegove neposredne sredine i od izuzetnog su značaja u obezbeđivanju veze između cijanobakterije i organizma sa kojima žive u simbiozi (više biljke, gljive) ponašajući se kao adhezivi za ćelije cijanobakterija (De Philippis i Vincenzini, 1998; Morsy i sar., 2008). Struktura i fizičko-hemijske karakteristike EPS adaptirane su za potrebe cijanobakterija u njihovim specifičnim staništima (Jensen i sar., 2013). U zavisnosti od lokalizacije, cijanobakterijski EPS mogu biti podeljeni u dve osnovne grupe: EPS povezani sa površinom ćelije i egzopolisaharidi oslobođeni u spoljašnju sredinu. U zavisnosti od njihove debljine, konzistencije i izgleda EPS povezani sa površinom ćelije mogu biti u vidu omotača, kapsula i sluzavih supstanci (De Philippis i Vincenzini, 1998, 2003). Egzopolisaharidi oslobođeni u spoljašnju sredinu predstavljaju rastvorljiv polisaharidni materijal oslobođen u medijum, bilo iz spoljašnjih slojeva ili iz biosintetskog procesa indirektno povezanog sa sintezom EPS. Uprkos nekim dokazima, ova poslednja pretpostavka je i dalje kontroverzna (Pereira i sar., 2009). Razlike u monosaharidnom sastavu i sadržaju sumpora između omotača i egzopolisaharida oslobođenih u spoljašnju sredinu podržavaju hipotezu različitih biosintetskih puteva (Micheletti i sar., 2008). Zbog lakog izdvajanja iz tečnih kultura i zbog svojih fizičko-hemijskih svojstava, egzopolisaharidi oslobođeni u spoljašnju sredinu su pogodni za razne primene u industriji, što čini cijanobakterije jednim od najatraktivnijih izvora novih polimera (De Philippis i Vincenzini, 1998, 2003).

Imajući u vidu činjenicu na značaj egzopolisaharida u funkcionisanju zemljišnih ekosistema i njihovu mogućnost primene u industriji, utvrđivanje sposobnosti produkcije najzastupljenijih monosaharida (glukoza, ksiloza, fruktoza) EPS važno je u cilju utvrđivanja metaboličkog kapaciteta terestričnih cijanobakterijskih sojeva šumskih ekosistema i identifikacije sojeva sa biotehnoškim potencijalom.

### 1.5.3. Naseljavanje „ogoljenih“ zemljišta

U aridnim i semi-aridnim staništima cijanobakterije imaju fundamentalnu ulogu primarnih kolonizatora obogaćujući geološki supstrat enzimima koji omogućavaju degradaciju organskih ostataka i uspostavljanje bioloških zemljišnih pokorica (BZP) (Miralles i sar., 2012). Organizmi koji formiraju BZP su poikilohidrični organizmi odnosno organizmi koji imaju sposobnost preživljavanja isušivanja. Upravo zbog toga, dominantni organizmi BZP pustinja

su cijanobakterije (<100 mm padavina godišnje), dok lišaji i mahovine dominiraju u BZP umereno vlažnih staništa (200-300 mm padavina godišnje) (Burgheimer i sar., 2006). BZP imaju vitalnu ulogu u funkcionisanju ekosistema s obzirom da obogaćuju „golu“ površinu organskim jedinjenjima, iniciraju biogeohemijski ciklus elemenata, modifikuju hidrološki ciklus, omogućavajući dalju kolonizaciju zemljišta vaskularnim biljkama (Miralles i sar., 2012). Primarnu ulogu u procesu kolonizacije imaju cijanobakterije dok pokorice formirane od strane lišaja predstavljaju zreli stupanj u formaciji BZP (Belnap i Lange, 2001; Lázaro i sar., 2008).

Kao pionirski organizmi, cijanobakterije imaju izuzetnu sposobnost degradacije supstrata koji nisu kompleksni poput polipeptida malih molekulskih masa i ugljenih hidrata, supstrati BAA-proteaza i beta-glukozidaza. Za razliku od pionirskih zajednica, zajednice zrelih ili umerenih ekosistema (k strategisti), pretežno imaju sposobnost da hidrolizuju kompleksne supstrate, kao što su proteini i celuloza (Miralles i sar., 2012). Upravo zbog toga, merenje enzimske aktivnosti važno je za ispitivanje nutritivnog statusa zemljišta (Nannipieri i sar., 1990; Tabatabai i Dick, 2002). Najčešće analizirani enzimi uključuju različite hidrolaze uključene u ciklus elemenata (C, N, P i S) i neke oksidoreduktaze (Shaw i Burns, 2006). Kao primarni kolonizatori, cijanobakterije dovode do povećanja aktivnosti hidrolitičkih enzima nakon čega dolazi do njihove sukcesivne zamene sa vrstama lišaja *Diploschistes diacapsis* i potom sa *Lachnosterna crassissima* (Lázaro i sar., 2008). Na ovaj način u siromašnim supstratima bez biohemijske aktivnosti dolazi do iniciranja biogeohemijskih ciklusa esencijalnih elemenata (C, N i P) (Miralles i sar., 2012).

Visoki enzimatski potencijal koji odražava sadržaj ribozoma predstavlja još jednu tipičnu odliku pionirskih organizama. U odnosu na lišaje, cijanobakterije imaju veći ribozomalni sadržaj što dalje svedoči da zajednice cijanobakterija predstavljaju primarne kolonizatore (proto-pionire). Kao proto-pioniri, cijanobakterije zahtevaju prisutvo velikih količina enzima sposobnih da hidrolizuju jednostavne supstrate malih molekulskih masa (npr. saharozu) (Panikov, 1999). Pored toga, cijanobakterije produkciju i ekskretuju različite tipove polisaharida u spoljašnju sredinu. Oslobođanje polisaharida između ostalog predstavlja i zaštitni mehanizam cijanobakterija protiv isušivanja nastalog promenama u relativnoj vlažnosti vazduha (Mager i Thomas, 2011; Chen i sar., 2012). Ekskrecija monosaharida značajna je i zbog omogućavanja preživljavanja cijanobakterija koje žive u dubljim slojevima BZP i koje ne mogu da sintetišu ugljene hidrate zbog nedostatka svetlosti (Terauchi i Kondo, 2008). Takođe, cijanobakterije izlučuju jednostavne ugljene hidrate u cilju obezbeđivanja simbioze sa gljivama u formiranju lišaja (Mager i Thomas, 2011). Stoga, cijanobakterije predstavljaju organizme koje kolonizuju „gola“ zemljišta (npr. vulkanske depozite i zemljišta različitog porekla) omogućavajući uspostavljanje zajednica viših biljaka (Starks i sar., 1981; Zancan i sar., 2006). Takođe, biološke lesne pokorice (BLP) polu-sušnih staništima u kojima cijanobakterije čine važne konstituente, čine prvi stepen u sukcesiji vegetacija (Svirčev i sar., 2013).

## 1.6. Upotreba terestričnih cijanobakterija

Od davnina, terestrične cijanobakterije koristile su se u medicinske svrhe, ali takođe i u ishrani mnogih naroda širom sveta. Prva naučna potvrda upotrebe terestrične vrste *Nostoc commune* od strane Švedskog botaničara Nils Gustaf Lagerheim datira još iz 1892. godine. Isti autor zabeležio je da se *Nostoc commune* upotrebljava u Ekvadoru i Boliviji kao sastavni deo ishrane Indijanaca. Pored upotrebe u ishrani, *Nostoc commune* je takođe zauzimao i značajno medicinsko mesto kod nativnih stanovnika Južne Amerike (Lagerheim, 1892). Mannheim (1986) je ukazao na značaj upotrebe roda *Nostoc* u Andima. U Peruu, kolonije *Nostoc commune*, poznatije u narodu kao *llullucha*, izuzetno su cenjene kao bogat izvor kalcijuma zbog čega se i danas koriste kao zamena mleka za decu. Najintezivniji periodi upotrebe *Nostoc commune* u Peruu poklapaju se sa kišnim periodima, odnosno uslovima kada se kolonije nalaze u hidratisanom stanju (od novembra do aprila) (Johnson i sar., 2008).

Pored Južne Amerike (Slika 9), terestrične vrste roda *Nostoc* koriste se i u drugim delovima sveta. Vrsta *Nostoc flagelliforme* predstavlja jestivu filamentoznu terestričnu cijanobakteriju sa istorijom korišćenja u ishrani dugom više od 2000 godina, dok njegova upotreba u medicinske svrhe datira još iz vremena drevne Kine (Gao, 1998; Tseng, 2001). Pored *Nostoc flagelliforme*, *N. commune* je bio jedan od 1892 medikamenata pronađenih u zapisima Li Shizhen (1518-



Slika 9. Upotreba kolonija *Nostoc commune* u Peruu (Johnson i sar., 2008)

1593) koji datiraju iz vremena Dinastije Ming (Li i sar., 2011). Pored medicinskog značaja, u kineskoj oblasti Chengdu *Nostoc flagelliforme* redovno se upotrebljava i u ishrani za pravljenje supa (Takenaka i sar., 1998). Međutim, intenzivno i obimno sakupljanje *N. flagelliforme* u Kini (u narodu poznatijeg kao *Fat Choi*) doprinelo je nastanku erozije zemljišta i dezertifikaciji, što je prouzrokovalo da ova vrsta postane ugrožena. Upravo zbog toga, 1999. godine Ministarstvo za Šumarstvo Kine svrstalo je *N. flagelliforme* u Drugu kategoriju zaštićenih biljaka sa ciljem zaštite ovog dragocenog prirodnog izvora, ali takođe i sa ciljem očuvanja staništa. Od 2000. godine, usled protektivnog režima, sakupljanje i prodaja divljeg *Fat Choi* postala je striktno zabranjena u Kini (Liu i Chen, 2003).

Pored Američkog kontinenta i Azije, terestrične cijanobakterije bile su veoma važne i u Evropi. Na osnovu etnobioloških studija, kolonije *N. commune* koje su se javljale na površini stena korišćene su i u ishrani kod Skandinavskih plemena (Brull i sar., 2000). Međutim, iako je i sa istorijske perspektive poznato da terestrične cijanobakterije poput *N. commune* imaju različite beneficije za zdravlje (smanjuju nivo holesterola; imaju antiinflamatorni efekat; ispoljavaju antikancerogenu i antiviralnu aktivnost; koriste se za tretiranje različitih medicinskih stanja poput opekotina, anksioznosti, lošeg varenja, hroničnog umora, noćnog slepila, itd.) istraživanja tačnih molekularnih mehanizama odgovornih za sve date funkcije su i dalje dosta limitirana (Park i sar., 2008).

Pored upotrebe u ishrani i medicinske svrhe, terestrične cijanobakterije su važne i kao biofertilizatori. Kao biofertilizatori, preko bioloških procesa cijanobakterije mobilizuju nutritivno nedostupne važne elemente poput P i N prevodeći ih u forme dostupne za druge organizme

(Hegde i sar., 1999). Kao rezultat sinergističkog efekta između zemljišnih mikroba i cijanobakterija, dolazi do ekskrecije organskih kiselina u cilju povećanja dostupnosti P i smanjenja nivoa sulfida preko povećanja količine O<sub>2</sub> u zemljištu (Ordog, 1999). Upravo zbog sposobnosti unosa C i N u zemljište, cijanobakterije zauzimaju izuzetno važno mesto u ekosistemima pustinja i uklanjanje cijanobakterija iz aridnih staništa redukuje produktivnost i povećava eroziju zemljišta izlažući nezaštićenu površinu zemljišta nepovoljnim uticajima vetra i vode (Belnap i Gillette, 1997). Cijanobakterije takođe sprečavaju nastanak poroziteta zemljišta (Falchini i sar., 1996). Pored toga, kao što je pomenuto u ranijem tekstu, EPS produkovani od strane cijanobakterija poboljšavaju aktivnost zemljišne mikroflore i povećavaju enzimsku aktivnost zemljišta koja dalje favorizuje produkciju EPS amplifikujući efekat.

Upotreba prirodnih zemljišnih sojeva cijanobakterija kao biofertilizatora ne samo da poboljšava fizičko-hemijska i biološka svojstva zemljišta već takođe pospešuje prinos različitih agrikulturalnih biljaka kao što su pirinač, žito i proso u uslovima povišenog nivoa soli, suše i kontaminacije zemljišta (Hegde i sar., 1999). Predstavljajući kontinualan obnovljiv izvor biomase, cijanobakterije oslobađaju u spoljašnju sredinu organske ekstracelularne produkte, sekundarne metabolite, koji mogu biti mineralizovani od strane mikroflore i kao takvi važni za agrikulturalne biljke. Date supstance mogu promovisati rast biljaka ili inhibisati druge organizme poput biljnih patogenih mikroorganizama, uključujući *Rhizotocnia solanii*, patogene gljive, *Sclerotinia sclerotiorum* (DeCaire i sar., 1990; Zulpa i sar., 2003; Tassara i sar., 2008).

Pored toga, zbog sve većih problema koji se javljaju u modernoj poljoprivredi (salinizacija zemljišta, prekomerna upotreba pesticida), cijanobakterije postaju sve važnije za aspekta njihove buduće upotrebe u održivoj poljoprivredi. Smatra se da će salinizacija zemljišta dovesti do gubitka 30% plodnih zemljišta u narednih 25 godina odnosno čak 50% zemljišta do 2050. godine. Pored toga, sve veća upotreba pesticida u modernoj poljoprivredi dovela je do povećanja koncentracije hemijskih polutanata, teških metala i drugih kontaminanata u zemljištu (Singh i sar., 2011). Pokazano je da se cijanobakterije mogu koristiti za rehabilitaciju zaslanjenih zemljišta, ali takođe i za bioremedijaciju zemljišta kontaminiranih teškim metalima. U zaslanjenim zemljištima, metaboliti cijanobakterija mogu doprineti očuvanju organskog C, N i P kao i vlažnosti zemljišta i dovesti do konverzije Na<sup>+</sup> kompleksa gline u Ca<sup>2+</sup> komplekse gline i time pospešiti karakteristike zemljišta (Singh i Singh, 1989; Venkataraman, 1993; Vaishampayan i sar., 2001). U slučaju zemljišta kontaminiranih teškim metalima (Cu, Zn, Ni, Co, Pb, Cr, Cd itd.) utvrđeno je da cijanobakterije poput *Spirulina platensis*, *Oscillatoria anguistissima*, *Mycrocystis* sp., *Synechococcus* sp. imaju izuzetno visoku remedijacionu sposobnost i tolerantnost na teške metale (Verma i Singh, 1995; Rai i sar., 1998; Pradhan i Rai, 2000; Yee i sar., 2004). Značaj upotrebe zemljišnih cijanobakterija u održivoj poljoprivredi ogleđa se u njihovoj sposobnosti poboljšanja stabilnosti zemljišta, nutritivnog statusa, aktivnosti zemljišne mikrobne populacije, mineralizacije zemljišta i rasta biljaka u ekološki održivom maniru.

Na osnovu svega navedenog, zemljišne cijanobakterije imaju višestruki značaj i brojne mogućnosti primene u različitim oblastima ljudske delatnosti. Pored toga, u cilju sve veće potrebe karakterizacije i proučavanja još uvek nedovoljno istraženih ekosistema, uključujući

šumske ekosisteme, u cilju identifikacije mikroorganizama sa širokim opsegom metaboličkih mogućnosti i produkcije raznovrsnih biološki aktivnih supstanci, cijanobakterije šumskih ekosistema predstavljaju interesantne i važne kandidate za dalja istraživanja.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Glavni postavljeni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrđivanje diverziteta autohtonih cijanobakterija šumskih ekosistema planinskih područja Srbije (Fruška gora, Kopaonik, Tara, Stara planina);
2. Karakterizacija odabranih terestričnih cijanobakterijskih predstavnika izolovanih tokom trogodišnjeg monitoringa kroz utvrđivanje njihovih osnovnih morfoloških, ekofizioloških, biohemijskih i genetičkih karakteristika;
3. Formiranje kolekcije kultura cijanobakterija poreklom iz šumskih ekosistema kao potencijala njihove buduće biotehnoške primene.

U okviru ispitivanja biće testirane sledeće hipoteze:

- a) Cijanobakterije šumskih ekosistema predstavljaju izuzetno raznovrsnu grupu mikroorganizama koju odlikuje veliki diverzitet;
- b) Cijanobakterije šumskih staništa se odlikuju značajnim potencijalom produkcije različitih metabolita – metabolički diverzitet;
- c) Zemljišne cijanobakterije šumskih područja su potencijalni producenti toksičnih jedinjenja (metabolita).

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

1. Tokom trogodišnjeg monitoringa vršiti uzorkovanje zemljišta (cijanobakterijskog rasta na supstratima – zemljište, kamen) iz planinskih ekosistema (Fruška gora, Tara, Kopaonik, Stara planina) na području Srbije u cilju identifikacije i izolacije novih terestričnih sojeva;
2. Izvršiti izolaciju sojeva cijanobakterija iz zemljišnih uzoraka šumskih ekosistema, iskultivisati ih u laboratorijskim uslovima i priključiti izolovane terestrične sojeve šumskih staništa postojećoj Novosadskoj kolekciji kultura cijanobakterija (NSCCC) novim specifičnim genotipovima;
3. Pored identifikacije izolovanih cijanobakterijskih sojeva na osnovu morfoloških karakteristika uraditi identifikaciju cijanobakterijskih sojeva korišćenjem dela genske sekvence 16S rRНК gena;
4. Ispitati ekofiziološka svojstva kod izolovanih zemljišnih sojeva cijanobakterija i determinisati:
  - a) osnovne ekofiziološke karakteristike (produkciju specifičnih tipova pigmenata i produkciju biomase);
  - b) sposobnost rasta u miksotrofnim uslovima (produkciju biomase i specifičnih tipova pigmenata) u prisustvu ugljenih hidrata (glukoze i saharoze);
  - c) sposobnost produkcije određenih tipova ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze i ksiloze), komponenata egzopolisaharida;
  - d) biohemijske karakteristike (produkciju bioaktivnih metabolita kao što su antimikrobni i antioksidativni agensi);
  - e) u cilju utvrđivanja prirode antibakterijskih jedinjenja i antioksidativnih jedinjenja izvršiti hemijsku karakterizaciju ekstrakata primenom analitičkih metoda:

- HPLC-MS/MS metodom biće okarakterisan sadržaj fenola koji su poznati po svojim antioksidativnim sposobnostima;
  - gasnom hromatografijom sa plameno jonizacionim detektorom (GC-FID) biće okarakterisan masno kiselinski sastav s obzirom da masne kiseline mogu da ispolje antibakterijsku aktivnost;
  - f) ispitati toksičnost odabranih sojeva primenom tri različita bioeseja (*Artemia salina*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*) i utvrditi prisustvo odabranih gena *mcy* genskog klastera odgovornih za produkciju mikrocistina;
  - g) za odabran toksični soj primenom qPCR metode ispitati efekat ekstrakta cijanobakterijskog soja na regulaciju gena koji pripadaju različitim signalnim putevima kod model organizma *Danio rerio*.
5. Na osnovu diverziteta autohtone populacije cijanobakterija četiri planinska područja na teritoriji Republike Srbije, kao i na osnovu njihovih ekofizioloških svojstava, krajnji cilj je i predavljanje sojeva cijanobakterija sa značajnim ekofiziološkim karakteristikama kao osnov za buduća dalja istraživanja diverziteta i metaboličkih strategija adaptacija cijanobakterija u staništima sa ekstremnim uslovima spoljašnje sredine i njihova potencijalna biotehnoška primena.

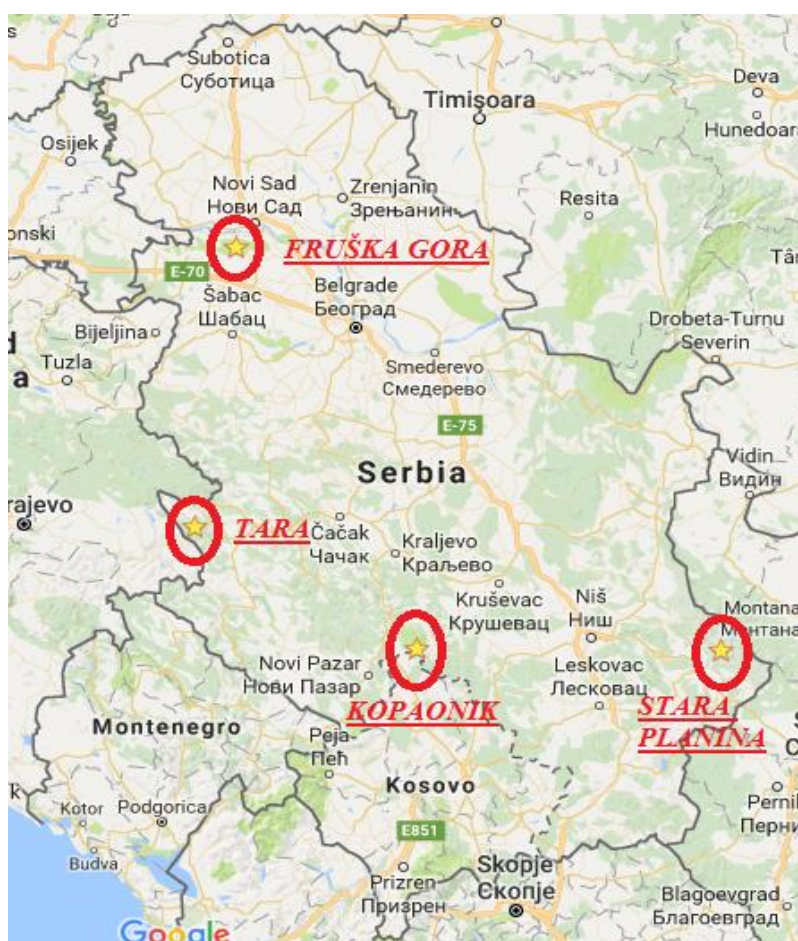


### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. Uzorkovanje zemljišta

Osnovni preduslov uspešne ekofiziološke karakterizacije zemljišnih cijanobakterija predstavlja pre svega uzorkovanje zemljišta adekvatnim sterilnim priborom i čuvanjem uzoraka na niskoj temperaturi (4°C) do početka laboratorijskog rada.

Uzorkovanje na odabranim šumskim lokalitetima na teritoriji Republike Srbije vršeno je u periodu od 2011. do 2013. godine i to na 4 lokaliteta tokom 2011. godine (Fruška gora – lokalitet Morović; Tara – lokalitet Mitrovac, drugi stepen zaštite; Kopaonik – lokalitet Metođe, prvi stepen zaštite; Stara planina – lokalitet Vidlič) i na 3 lokaliteta (Tara, Kopaonik, Stara planina) tokom perioda 2012.-2013. godine (Slika 10).



Slika 10. Lokaliteti na kojima je vršeno uzorkovanje tokom trogodišnjeg monitoringa (<https://www.google.rs/maps/@43.9853856,19.3422938,7z?hl=en>)

## Opisi lokaliteta:

## Lokalitet - Fruška gora

Fruška gora je ostrvska planina u Sremu. Najveći deo Fruške gore nalazi se na severu Republike Srbije u Vojvodini. Fruška gora se prostire na dužini od oko 75 km, širine je od 12 do 15 km i zahvata površinu od 25.525 km<sup>2</sup>. Najviši vrh nalazi se na nadmorskoj visini od 539 m (Crveni Čot). Fruška gora je proglašena nacionalnim parkom 1960 godine. Na Fruškoj gori nalazi se najveća koncentracija lipove šume u Evropi (Slika 11).



Slika 11. Planina Fruška gora  
(<http://www.npfruskagora.co.rs/pages/galerija6.htm>)

## Lokalitet - Tara

Planina Tara nalazi se u zapadnom delu Srbije. Tara predstavlja deo Dinarskih Alpa nadmorske visine od 1000 do 1500 metara. Najviši vrh planine nalazi se na nadmorskoj visini 1,544 metara (Zborište). Planinske padine Tare prekrivene su gustim šumama sa brojnim visinskim proplancima i livadama, strmim liticama, dubokim jarugama kao i kršnim predelima i krečnjačkim pećinama (Slika 12). Prirodnu vrednost po kojoj je Tara prepoznatljiva u celom svetu predstavljaju lišćarsko-četinarske šume u kojima je jedan od osnovnih graditelja omorika.



Slika 12. Planina Tara  
(foto ljubaznošću Milane Rakić)

Veliki deo planine nalazi se u okviru nacionalnog parka Tara koji je osnovan 1981 godine. Nacionalni park Tara obuhvata površinu od oko 220 km<sup>2</sup> i nalazi se na nadmorskim visinama od 250 do 1.500 metara. Najveći deo nacionalnog parka zauzimaju šume (3/4) pri čemu endemitet područja predstavlja vrsta *Picea omorika* nazvana još i Pančićeva omorika u čast botaničaru Josifu Pančiću koji ju je otkrio 1875. godine na Tari. Zbog toga što potiče iz vremena tercijera, Pančićeva omorika se smatra živim fosilom u biljnom svetu. Zbog svoje retkosti i naučnog značaja, ova biljna vrsta se nalazi pod zaštitom.



## Lokalitet - Kopaonik

Kopaonik predstavlja najveći planinski masiv u Srbiji koji se pruža od severozapada ka jugoistoku dužinom od oko 75 km. Najviši vrh nalazi se na nadmorskoj visini od 2017 m (Pančičev vrh). Deo planinskog masiva nalazi se pod zaštitom u sklopu Nacionalnog parka Kopaonik. Na višim delovima nalazi se četinarska smrčeva i jelova šuma, dok su na nižim nadmorskim visinama prisutne bukova i hrastova šuma (Slika 13). Pored toga, Kopaonik je mesto na kome se mogu naći primerci endemske flore kao što su *Sempervivum kopaonicense* *Pancic* (kopaonička čuvarkuća), *Cardamine Pancicii* (Pančičeva potočarka) i *Viola kopaonicensis* (kopaonička ljubičica).



Slika 13. Planina Kopaonik  
(foto ljubaznošću Milane Rakić)

## Lokalitet - Stara planina

Stara planina pripada masivu Karpatsko-balkanskih planina. U Srbiji se nalazi samo mali zapadni deo prostranog Karpatsko-balkanskog planinskog luka. Najviša tačka Stare planine u Srbiji nalazi se na nadmorskoj visini od 2169 m (Midžor). Područje Stare planine proglašeno je za park prirode tek 1997. godine, kao područje izuzetno vredno sa stanovišta raznovrsnosti biljnog i životinjskog sveta i njihovih zajednica, kao i geoloških, geomorfoloških i hidroloških karakteristika. Stara planina je strogi prirodni rezervat sa velikim brojem raznovrsnih biljnih zajednica (fitocenoza): šumske, žbunaste, livadske, pašnjačke i tresavske (Slika 14). Visinski se uočavaju pojasevi sa pojedinim dominantnim vrstama: hrastov pojas, bukov pojas, smrčev pojas i pojas subalpijske žbunaste vegetacije. Neke od ovih zajednica spadaju u endemične ili reliktno.



Slika 14. Stara planina  
(foto ljubaznošću Milane Rakić)

### 3.2. Izolacija i determinacija izolovanih terestričnih cijanobakterija

U cilju izolacije cijanobakterijskih sojeva iz šumskih ekosistema 4 planinska područja Srbije, u okviru eksperimentalnih površina (plotovi veličine 1000m<sup>2</sup>) na svakom lokalitetu vršeno je praćenje prisustva populacije terestričnih cijanobakterija kao i uzorkovanje materijala (cijanobakterijskog rasta i njihovog supstrata – kamen i zemljište) u cilju izolacije novih zemljišnih sojeva. Na mestima uočavanja prisustva rasta cijanobakterija na zemljištu i kamenu vršeno je sakupljanje uzoraka isecanjem površinskog sloja zemljišta odnosno struganjem rasta sa kamena. Uzorci su čuvani u sterilnim Petri pločama do početka rada u laboratoriji nakon čega je vršeno zasejavanje uzoraka zemljišta u mineralnu podlogu BG-11 čiji je sastav prikazan u Tabeli 5. Za izolaciju zemljišnih cijanobakterijskih sojeva korišćena je tečna hranljiva podloga BG-11 sa azotom i bez azota. Korišćenjem BG-11 podloge bez dodatka azota favorizovan je rast azotofiksatora i omogućeno je njihovo odvajanje od ostalih cijanobakterijskih predstavnika prisutnih u uzorcima (Rippka, 1988b).

Tabela 5. Sastav mineralne podloge BG-11 (Rippka i sar., 1979)

Sastojci	Količina u g/L
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0,04
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,036
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,020
Limunska kiselina	0,006
Fe-amonium citrat	0,006
EDTA	0,001
A5 (rastvor oligoelemenata)*	1 ml/L

\*A5 – mešavina oligoelemenata (A5 rastvor) sadrži (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2,86); MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O (1,81); ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0,222); MoO<sub>3</sub> x 2H<sub>2</sub>O (0,390); CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (0,079); Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,0494).

Nakon višemesečnog perioda inkubacije i adaptacije terestričnih sojeva cijanobakterija na rast u mineralnoj hranljivoj podlozi, mikroskopiranjem je utvrđivano da li je izolovana monokultura ili je prisutno više cijanobakterijskih sojeva. U slučajeva da se radilo o združenoj kulturi primenjivan je postupak razdvajanja i isčišćavanja upotrebom agarizovane BG-11 podloge. Korišćenjem lupe Olympus KL 1600 LED (Japan) pojedinačni filamenti sa agarizovane podloge su inokulisani u mineralnu podlogu BG-11 sa ili bez azota u zavisnosti od prisustva/odsustva heterocista u filamentu. Nakon toga, ponovo je izvršen mikroskopski pregled cijanobakterija gajenih u tečnoj kulturi, u cilju kvalitativne analize, tj. identifikacije svih iskultivisanih sojeva. Postupak razdvajanja i isčišćavanja je ponavljan sve do dobijanja monokultura (Rippka, 1988b).

Identifikacija sojeva vršena je na osnovu fenotipskih i genotipskih karakteristika. Identifikacija izolata je vršena do nivoa roda korišćenjem različitih ključeva (determinatora) (Rippka, 1988a; Rippka, 1998b; Anagnostidis i Komárek, 1988; Komárek i sar., 2014). Pored toga, u cilju dobijanja filogenetskog stabla identifikacija odabranog broja sojeva vršena je i na osnovu dela genske sekvence 16S rRNK gena (Nübel i sar., 1997).

Nakon dobijanja monokultura, dobijeni monoalgalni sojevi gajeni su u tečnoj sintetičkoj, mineralnoj, hranljivoj podlozi BG-11 sa ili bez azota, koja se u praksi pokazala kao izuzetno pogodna za rast svih cijanobakterijskih vrsta. Bezazotna podloga korišćena je za gajenje svih heterocistnih azotofiksirajućih cijanobakterija (*Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*). Za rast neheterocistnih sojeva kod kojih svojstvo azotofiksacije nije izraženo (rodovi *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lyngbya*) korišćena je podloga sa azotom. Za kultivaciju je korišćena sterilna mineralna BG-11 podloga pH vrednosti 7,4. Kulture su gajene u erlenmajer posudama i u epruvetama. Izolati su uzgajani na staklenim policama u “mirnoj kulturi”. U pogledu trajanja perioda osvetljenosti i tame korišćen je režim 12 časova svetlosti i 12 časova tame. Temperatura kultivacije se kretala između 22-24° C.

Svi izolovani sojevi poreklom iz šumskih ekosistema fotografisani su korišćenjem mikroskopa marke “Olympus” BX51 (Japan) uz pomoć kamere i softverskog programa CellB. U cilju čuvanja dobijenih cijanobakterijskih izolata u okviru kolekcije kultura, izolovani sojevi su liofilizovani korišćenjem liofilizatora “CHRIST ALPHA 2-4 LD plus“, Nemačka. Od ukupnog broja izolovanih sojeva za dalju ekofiziološku karakterizaciju odabrano je 20 sojeva sa lokaliteta Tara, Kopaonik, Stara planina, Fruška gora izolovanih tokom trogodišnjeg monitoringa (Tabela 6).

Tabela 6. Spisak odabranih cijanobakterijskih sojeva korišćenih za ekofiziološku karakterizaciju

	Cijanobakterijski soj	Lokalitet	Godina uzorkovanja
1	<i>Nostoc</i> M1	Fruška gora	2011
2	<i>Anabaena</i> M2	Fruška gora	2011
3	<i>Calothrix</i> M2	Fruška gora	2011
4	<i>Phormidium</i> M1	Fruška gora	2011
5	<i>Oscillatoria</i> M2	Fruška gora	2011
6	<i>Oscillatoria</i> SP2	Stara planina	2011
7	<i>Anabaena</i> SP2	Stara planina	2011
8	<i>Calothrix</i> SP2	Stara planina	2011
9	<i>Nostoc</i> SP5	Stara planina	2012
10	<i>Nostoc</i> T7	Tara	2012
11	<i>Nostoc</i> T18	Tara	2012
12	<i>Oscillatoria</i> T18	Tara	2012
13	<i>Phormidium</i> T11	Tara	2013
14	<i>Lyngbya</i> T7	Tara	2013
15	<i>Cylindrospermum</i> K1	Kopaonik	2012
16	<i>Lyngbya</i> K10	Kopaonik	2012
17	<i>Tolypothrix</i> K11	Kopaonik	2013
18	<i>Tolypothrix</i> K15	Kopaonik	2013
19	<i>Nostoc</i> K15	Kopaonik	2012
20	<i>Phormidium</i> K15	Kopaonik	2012

### 3.3. Identifikacija cijanobakterijskih sojeva korišćenjem dela genske sekvence 16S rRNK gena

#### 3.3.1. Izolacija i purifikacija genomske DNK

Za izolaciju ukupne genomske DNK cijanobakterijskih sojeva korišćene za identifikaciju sojeva na osnovu dela genske sekvence 16S rRNK gena kao i za analizu toksigeničnosti i utvrđivanje prisustva *mcy* gena odgovornih za produkciju cijanotoksina (mikrocistina) korišćena je metoda prilagođena izolaciji DNK iz gram-negativnih bakterija. Za ekstrakciju i izolaciju ukupne genomske DNK korišćen je metod ekstrakcije pomoću fenola i hloroforma.

#### Postupak:

Za izolaciju genomske DNK korišćeno je 1,5 ml prekonocne kulture cijanobakterijskih sojeva. Prvi korak podrazumevao je centrifugiranje (10 minuta na 10000 rpm), uklanjanje supernatanta i resuspendovanje prosušenog taloga u 468,5  $\mu$ l 0,1xTE pufera (pH=8). Nakon resuspendovanja u kivete je dodato 30  $\mu$ l 10% SDS-a i 1,5  $\mu$ l proteinaze K (40 mg/ml). Sadržaj kivete je promešan na vorteksu i uzorci su inkubirani u termobloku na 37°C u trajanju od 60 minuta. Nakon inkubacije u kivete je dodato 500  $\mu$ l smeše fenol:hloroform (1:1) i sadržaj kivete je promešan invertovanjem. Nakon toga, sledilo je centrifugiranje (10 minuta na 12000 rpm). U nove sterilne kivete prebačena je gornja vodena faza i ponovljen je prethodni korak ekstrakcije sa smešom fenol:hloroform. Dobijena gornja vodena faza prebačena je u nove sterilne kivete i na nju je dodat 3M Na-acetat (1/10 zapremine) i izopropanol (1/6 zapremine). Sadržaj kivete je invertovan do precipitacije DNK nakon čega je sledilo centrifugiranje 5 min na 10000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon odlivanja supernatanta dodat je 1 ml 70% EtOH sa -20°C. Sledeći korak je bilo centrifugiranje (5 min na 10000 rpm) na sobnoj temperaturi i odlivanje etanola. Sušenje taloga je vršeno u termobloku na 37°C do potpunog isparavanja etanola. Osušen talog je resuspendovan u 30  $\mu$ l 0,1xTE pufera (pH=8) i inkubiran 2-3 minuta u termobloku na 37°C. Nakon završene inkubacije, kivete su ostavljene 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Koncentracija dobijene izolovane genomske DNK određena je pomoću BioSpec-nano spektrofotometra (Shimadzu, Kyoto, Japan) merenjem optičke gustine na 260 nm. Kao slepa proba korišćen je TE pufer upotrebljavan za resuspendovanje izolovane DNK. Pored određivanja koncentracije izolovane genomske DNK, određivana je i čistoća izolovane DNK merenjem optičkih gustina na 230 nm i 280 nm i izračunavanjem odnosa 260/280 i 260/230. Kvalitet izolovane genomske DNK proveren je elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Nakon provere koncentracije, čistoće i kvaliteta DNK izolovana genomska DNK ostavljena je na čuvanje u frižideru na 4°C do dalje upotrebe za analize.

### 3.4. Sekvencioniranje dela genske sekvence 16S rRNK gena

Za ekstrakciju i izolaciju ukupne genomske DNK 20 odabranih cijanobakterijskih sojeva korišćena je gore opisana metoda ekstrakcije pomoću fenola i hloroforma. Iz dobijene genomske DNK, fragment 16S ribozomalnog DNK gena je amplifikovan pomoću PCR metode korišćenjem univerzalnog prajmera za cijanobakterije CYA359F (Tabela 7) (Nübel i sar., 1997) po uputstvu proizvođača KAPA Taq PCR Kit-a (Tabela 8). Kao DNK matrica korišćena je ukupna genomska DNK sojeva cijanobakterija. Program lančane reakcije polimerizacije (KAPA Taq) predstavljen je u Tabeli 9. Temperatura vezivanja prajmera je iznosila 50°C i ekstenzija u trajanju od 1 minuta vršena je tokom 35 ciklusa.

Tabela 7. Nukleotidne sekvence prajmera korišćenih u PCR metodi

Prajmer	Nukleotidna sekvenca
CYA359F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG*
CYA781R(a)**	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT
CYA781R(b)**	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT

\*Y, C/T nukleotidna „degeneričnost“

\*\*Reverse prajmer CYA781R bio je ekvimolarna mikstura prajmera CYA781R(a) i CYA781R(b)

Tabela 8. KAPA Taq PCR Kit

Komponenta	Finalna zaprema 50 µL	Finalna koncentracija
PCR voda	Do 50 µL	N/A
10X KAPA Taq Pufer sa 25 mM MgCl <sub>2</sub>	5,0 µL	1X
10 mM dNTP Mix	1 µL	0,2 mM svaki
10 µM forward prajmer	2 µL	0,4 µM
10 µM reverse prajmer	2 µL	0,4 µM
5 U/µL KAPA Taq DNK Polimeraza	0,2 µL	1 U
DNK matrica	X µL	~ 50-250 ng

Tabela 9. PCR program za umnožavanje 16S rRNK gena

Proces	Temperatura	Vreme
Inicijalna denaturacija	95°C	3 min
35 ciklusa	Denaturacija	95°C
	Aniling	60°C
	Elongacija	72°C
Finalna ekstenzija	72°C	3 min
Hlađenje	4°C	~



### 3.4.1. Prečišćavanje PCR proizvoda

Po završetku lančane reakcije polimerizacije, uzorci su analizirani horizontalnom gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Trake od približno 420 baznih parova (bp) poreklom od umnoženog dela 16S rRNK gena isečene su iz gela i prečišćene prema uputstvu proizvođača QIAquick® Gel Extraction Kit-a (Hilden, Nemačka).

### 3.4.2. Određivanje koncentracije DNK

Koncentracija DNK je proverena spot testom, nanošenjem 1  $\mu$ L izolovane DNK i DNK standardnih koncentracija (2, 5, 10 i 20 ng/ $\mu$ L  $\lambda$  DNK) na 1% agaroznu podlogu sa dodatkom 0,5  $\mu$ g/mL etidijum-bromida. Nakon 20 minuta inkubacije, koncentracija je određena osvetljavanjem UV svetlošću talasne dužine 260 nm.

### 3.4.3. Sekvenciranje dela genske sekvence 16S rRNK gena

Sekvenciranje umnoženih delova 16S rRNK gena 20 cijanobakterijskih sojeva rađeno je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Foster Siti, SAD), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing kompanije Applied Biosystems (Foster Siti, SAD). Reakciona smeša za sekvenciranje sadržala je 3  $\mu$ L Ready Reaction Mix-a; 3,2 pmol prajmera (prajmer specifičan za deo 16S rRNK gena cijanobakterija CYA359F), 10 ng DNK matrice, i destilovane vode do finalne zapremine od 8  $\mu$ L. Program reakcije sekvenciranja prikazan je u Tabeli 10. Umnožavanje je rađeno u PCR aparatu Applied Biosystems 2720 Thermocycler (Foster Siti, SAD).

Tabela 10. Program za sekvenciranje

Proces		Temperatura	Vreme
Inicijalna denaturacija		96°C	1 min
25 ciklusa	Denaturacija	96°C	10 s
	Aniling	50°C	5 s
	Elongacija	60°C	4 min

Proizvodi reakcije sekvenciranja prečišćeni su po uputstvu proizvođača, nakon čega je talog osušen i rastvoren u 25  $\mu$ L HiDi formamida. Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer korišćenjem softverskog paketa SeqAnalyzer.

Dobijeni amplifikovani fragmenti su potom sekvencionirani korišćenjem aparata Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Foster City, CA, USA). Za pretraživanje sličnosti dobijenih sekvenci sa bazom podataka za 16S rRNK gen kod cijanobakterija korišćen je BLASTN program (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul i sar., 1997). Filogenetska rekonstrukcija izvedena je korišćenjem programa SeaView, grafičkog programa za molekularnu filogeniju (Gouy i sar., 2010).



### 3.5. Metod za utvrđivanje produkcije biomase cijanobakterijskih sojeva

Za 20 izolovanih sojeva cijanobakterija određena je produkcija biomase u funkciji vremena, što je omogućilo dobijanje krive rasta svakog soja. Inokulum (2 ml) svih ispitivanih sojeva zasejavan je u erlen-majer posude sa 200 ml tečne bezazotne ili azotne podloge BG-11 u zavisnosti od pripadnosti roda, to jest sposobnosti azotifikacije. Tokom 50 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, i intenzitetu svetlosti od 750 lux-a, na svakih 7 dana određivana je koncentracija hlorofila *a* spektrofotometrijskom metodom po Mackinney (1941). Pigment se iz ćelija cijanobakterija određuje koncentrovanjem biomase filtracijom kroz filtere poroziteta 0,45 $\mu$ m (Sartorius), ekstrakcijom pomoću metanola i očitavanjem optičke gustine na spektrofotometru (Beckman 25) na talasnoj dužini od 663 nm.

Koncentracija hlorofila *a* je nakon određivanja apsorbance izračunata po sledećoj formuli:

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

$V_1$  = zapremina uzorka

$V_2$  = zapremina metanola

12,64 = korekcija apsorbance

$\text{OD}_{663}$  = optička gustina uzorka na 663nm

Krive rasta koje podrazumevaju rast biomase u funkciji vremena dobijene su iz vrednosti koncentracije hlorofila *a*, dok je količina produkovane biomase sojeva dobijena množenjem koncentracija hlorofila *a* svakog soja faktorom 67 (APHA, 1992).

### 3.6. Metod za utvrđivanje produkcije fikobilinskih pigmenata kod cijanobakterija

Sadržaj fikobiliproteinskih pigmenata (fikocijanina - PC, alofikocijanina - APC i fikoeritina - PE) određivan je korišćenjem spektrofotometrijske metode (Bennet i Bogorod, 1973) kod 20 izolovanih sojeva. Sojevi su gajeni u erlen-majer posudama u podlozi BG-11 (+N ili -N), pri čemu su inokulumi (2 ml) zasejavani u 200 ml BG-11 medijuma. Tokom 50 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, i intenzitetu svetlosti od 750 lux-a, na svakih 7 dana za određivanje sadržaja fikobilina, uzimano je po 10 ml uzorka (kulture). Uzorak je zatim centrifugiran na 3000 obrtaja/min tokom 5 minuta. Sakupljena ćelijska masa potom je isprana sa puferom 1 M Tris-Cl (pH 8.1). Da bi se fikobilinski pigmenti ekstrahovali, potrebno je bilo izvršiti cepanje ćelijskog zida. Postupkom sonifikacije uzorka (10 minuta sa ciklusima od 30 sekundi), omogućeno je razaranje ćelijskog zida cijanobakterijskih sojeva. Nakon toga vršeno je odvajanje ćelijskih ostataka centrifugiranjem na 12.000 obrtaja/min, tokom 10 minuta, a potom je količina fikobilina merena u supernatantu spektrofotometrijski na talasnim dužinama od  $\lambda = 652$  nm (alofikocijanin),  $\lambda = 615$  nm (fikocijanin),  $\lambda = 562$  nm (fikoeritriin). Merenje apsorbanci vršeno je na spektrofotometru "NICOLET Evolution 100" (Thermo Electron Corporation). Iz dobijenih vrednosti apsorbanci izračunate su koncentracije pigmenata pomoću sledećih formula:

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

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

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

Dobijene koncentracije fikocijanina (PC), alofikocijanina (APC) i fikoeritina (PE), izražene su u mgmL<sup>-1</sup>. Specifičan sadržaj fikobilinskih pigmenata je određen u odnosu na biomasu sojeva.

### 3.7. Ispitivanje mikotrofnog rasta - određivanje uticaja glukoze i saharoze na produkciju biomase i fikobiliproteinskih pigmenata

U cilju utvrđivanja sposobnosti cijanobakterija da usvajaju ugljenik u organskoj formi kod 20 sojeva ispitan je uticaj ugljenih hidrata kao organskih izvora ugljenika na produkciju biomase i fikobiliproteinskih pigmenata. Od monosaharida, testiran je uticaj glukoze kao jednog od najrasprostranjenijih monosaharida u prirodi dok je od disaharida testiran uticaj saharoze. U BG-11 medijumu sa ili bez azota, u zavisnosti od sposobnosti testiranog soja da vrši/ne vrši azotofiksaciju, glukoza i saharoza su testirane u dve koncentracije: 1,5 g/L i 3 g/L. Kao kontrola, korišćen je BG-11 medijum bez dodatka ugljenih hidrata. Sojevi su gajeni u erlen-majer posudama pri čemu su inokulumi (2 ml) zasejavani u 200 ml BG-11 medijuma (+N ili -N). Tokom 35 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, i intenzitetu svetlosti od 750 lux-a, na svakih 7 dana vršeno je utvrđivanje produkcije biomase (metoda po Mackinney, 1941) i utvrđivanje produkcije fikobilinskih pigmenata (metoda po Bennet i Bogorad, 1973). Korišćene metode i sam postupak detaljno su ranije opisane u tekstu.

### 3.8. Određivanje sadržaja ugljenih hidrata (PSA test)

Za određivanje polisaharidnog sadržaja kod 20 sojeva korišćena je modifikovana metoda Monsigny-ja i sar. (1988) prilagođena radu u mikrotitar pločama (Masuko i sar., 2005). PSA testom se određuje sadržaj ugljenih hidrata u ekstraktima cijanobakterija pomoću fenol-sumporne kiseline (PSA). PSA test je kolorimetrijska metoda koja se najčešće koristi za određivanje ukupne koncentracije ugljenih hidrata. U ovoj metodi, ugljeni hidrati (monosaharidi, oligosaharidi i polisaharidi) rearanžiraju se u furfuralne derivate pod uticajem sumporne kiseline nakon čega u reakciji sa fenolom daju obojena jedinjenja (Khamlue i sar., 2012). U PSA testu fenol se sulfonizuje *in situ* i nastala fenol-sumporna kiselina smanjuje intenzitet boje kod nekih pentoza i heksoza.

U ovom radu, analizirani šećeri početnih koncentracija 10 mg/mL bili su glukoza, fruktoza i ksiloza. Standardne krive analiziranih šećera pravljenje su odgovarajućim razblaženjima osnovnog rastvora. Testirani ekstrakti odabranih 20 cijanobakterijskih sojeva su takođe razblaženi određeni broj puta. Apsorbanca cijanobakterijskih ekstrakata nalazila se između najmanje i najveće vrednosti apsorbance dobijene za standardnu krivu. PSA metodom određen je sadržaj ukupnih ugljenih hidrata izražen u mg ek. šećera/g suvog ostatka.

Reagensi:

cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

5% fenol: 5 ml 100% fenola u 100 ml destilovane vode

1mM glukoza/fruktoza: 0,018016 g glukoze (fruktoze) u 100 ml destilovane vode

1 mM ksiloza: 0,015013 g ksiloze u 100 ml destilovane vode

## Postupak:

Od početnih koncentracija ekstrakata opsega od 10 do 0,25 mg/mL napravljena je serija razblaženja tako da je na kraju raspon radnih koncentracija kod ispitivanih ekstrakata bio od 2173,91  $\mu\text{g/mL}$  do 54,35  $\mu\text{g/mL}$ . Početne koncentracije standardnih rastvora glukoze, fruktoze i ksiloze su bile od 10000 do 62,5  $\mu\text{g/mL}$ . Radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja i za svaku radnu probu rađena je i korekcija.

Pripremljeni rastvori su prikazani u Tabeli 11. Apsorbanca za hesekeze je merena spektrofotometrijski na 490 nm dok je za pentoze apsorbanca merena na 480 nm.

Tabela 11. Rastvori za određivanje ukupnog sadržaja šećera i postupak rada

Radna proba	Korekcija	Kontrola
50 $\mu\text{l}$ šećera (ekstrakta) 150 $\mu\text{l}$ cc $\text{H}_2\text{SO}_4$ <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ vorteksiranje 30 min na sobnoj temperaturi</li> </ul>	50 $\mu\text{l}$ šećera (ekstrakta) 150 $\mu\text{l}$ $\text{dH}_2\text{O}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ vorteksiranje 30 min na sobnoj temperaturi</li> </ul>	50 $\mu\text{l}$ rastvarača (70% EtOH) 150 $\mu\text{l}$ cc $\text{H}_2\text{SO}_4$ <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ vorteksiranje 30 min na sobnoj temperaturi</li> </ul>
30 $\mu\text{l}$ 5% fenola <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ zagrevanje 10 min na 70°C u vodenom kupatilu</li> <li>➤ hlađenje 5 min na sobnoj temperaturi</li> <li>➤ očitavanje apsorbance</li> </ul>	30 $\mu\text{l}$ 5% fenola <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ zagrevanje 10 min na 70°C u vodenom kupatilu</li> <li>➤ hlađenje 5 min na sobnoj temperaturi</li> <li>➤ očitavanje apsorbance</li> </ul>	30 $\mu\text{l}$ 5% fenola <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ zagrevanje 10 min na 70°C u vodenom kupatilu</li> <li>➤ hlađenje 5 min na sobnoj temperaturi</li> <li>➤ očitavanje apsorbance</li> </ul>

## Princip računanja:

Standardna kriva je konstruisana na osnovu rezultata dobijenih merenjem apsorbance standardnih rastvora šećera (glukoze, fruktoze i ksiloze). Iz razlike radne probe ( $A_{\text{sr}}$ ), korekcije ( $A_{\text{kor}}$ ) i kontrole ( $A_{\text{kon}}$ ) izračunate su apsorbance za svaki ispitivani ekstrakt:

$$A = A_{\text{sr}} - A_{\text{kor}} - A_{\text{kon}}$$

Sadržaj svakog šećera je izračunat na osnovu kalibracione krive (apsorbance u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora šećera. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja (mg ek. šećera/ g s.m.) (Masuko i sar., 2005).

Vrednosti ek. šećera/g suve materije kod ispitivanih ekstrakata cijanobakterija dobijeni su na sledeći način:

$$\text{mg ekivalenta šećera/g s. m.} = \text{očitana konc. šećera/radna konc.} \times 1000$$

Za svaki ispitivani ekstrakt cijanobakterija izračunava se srednja vrednost dobijena za različite koncentracije ekstrakta.

### 3.9. Testiranje biološke aktivnosti cijanobakterija

#### 3.9.1. Priprema ekstrakata cijanobakterija za detekciju biološki aktivnih materija (BAM)

U cilju određivanja sposobnosti produkcije BAM cijanobakterijski sojevi su gajeni u tečnoj sintetičkoj mineralnoj podlozi BG-11, sa ili bez dodatog azota (Rippka i sar., 1979). Kulture cijanobakterija su gajene u erlen-majer posudama na temperaturi od 22-24°C, na staklenim policama u mirnoj kulturi. Intenzitet svetlosti tokom kultivacije cijanobakterija iznosio je 50 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. U eksperimentima je korišćeno 20 odabranih kultura cijanobakterijskih sojeva starih 21. dan.

Nakon 21. dana kultivacije određena zapremina cijanobakterijskih kultura je liofilizirana korišćenjem aparata "CHRIST ALPHA 2-4 LD plus", Nemačka. Nakon 24h liofilizacije na temperaturi od -85°C i odgovarajućem pritisku dobijena liofilizirana biomasa je izmerena. Na sakupljenu biomasu dodat je odgovarajući rastvarač (u zavisnosti od ispitivanja biološke aktivnosti korišćen je 75% metanol, 100% heksan, 70% etanol ili DMSO), i ekstrakcija je vršena preko noći u frižideru na temperaturi od 4°C. Oslobođanje biološki aktivnih materija iz ćelija vršeno je cepanjem ćelijskog zida postupkom sonifikacije (2-5 minuta) na sonifikatoru 250 (Branson) na sobnoj temperaturi i pri atmosferskom pritisku. Nakon sonifikacije uzorak je centrifugiran na 10.000 x g u trajanju od 15 minuta. U dobijenim supernatantima ispitivano je prisustvo biološki aktivnih materija (BAM) koje su intracelularnog porekla. Metanolni (75% MeOH) kao i heksanski (100%) ekstrakti korišćeni su za ispitivanje antibakterijske aktivnosti 20 cijanobakterijskih sojeva. Za ekstrakciju polarnih jedinjenja korišćen je 75% metanol dok je 100% heksan korišćen kao rastvarač za nepolarna jedinjenja. Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti korišćeni su 70% EtOH ekstrakti cijanobakterijskih sojeva. Za analize ispitivanja potencijalnog toksičnog efekta sojeva u bioeseju sa *Artemia salina* korišćeni su 75% MeOH ekstrakti, kao i DMSO ekstrakti koji su testirani u sva tri bioeseja (*Artemia salina*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*)

#### 3.9.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti cijanobakterija

U antibakterijskom skriningu korišćeno je 6 bakterijskih sojeva prikazanih u Tabeli 12. Svi testirani bakterijski sojevi poreklom su iz Američke kolekcije kultura (ATCC).

Tabela 12. Bakterijski sojevi korišćeni za utvrđivanje biološke aktivnosti cijanobakterija

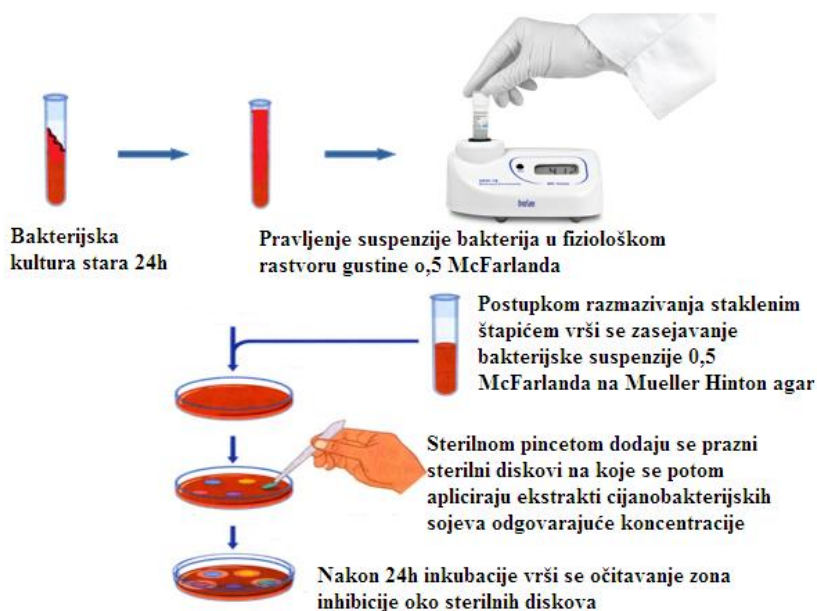
Bakterijski soj	Poreklo soja	Bojenje po Grammu-u
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gr+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	Gr+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gr+
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453	Gr-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 35544	Gr-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	Gr-

## 3.9.2.1. Disk-difuziona metoda

Ispitivanje prisustva biološki aktivnih materija sa antibakterijskom aktivnošću u cijanobakterijskim kulturama vršeno je u petri pločama na podlozi Mueller Hinton agar (Torlak) u prisustvu 6 bakterijskih sojeva. Primenjeni metod predstavlja modifikaciju klasičnog antibiogram testa (tip difuzioni) (Østensvik i sar., 1998). Bakterijske kulture su gajene na kosom hranljivom agaru (MPA "Torlak") u termostatu na temperaturi od 37°C. U antibakterijskom skriningu bakterijske kulture su korišćene nakon 24 časa kultivacije. Suspenzije bakterija pravljenе su u fiziološkom rastvoru (0,86% NaCl) pri čemu je gustina zasejavane suspenzije iznosila 0,5 McFarlanda ( $1,5 \times 10^8$  ćelija/mL). Provera gustine bakterijske suspenzije vršena je u aparatu DEN-1 densitometar (detektoru zamućenosti suspenzija) proizvođača BioSan.

## Postupak:

U sterilne petri ploče razlivano je oko 10-15 ml sterilne hranjive podloge, Mueller Hinton agara (Slika 15). Nakon toga zasejavane su bakterijske suspenzije gustine 0,5 McFarlanda postupkom razmazivanja staklenim štapićem po celoj površini podloge. Količina korišćenog bakterijskog inokuluma iznosila je 100 µl. Nakon zasejavanja na agarizovanu podlogu sterilnom pincetom stavljeni su prazni sterilni diskovi (HiMedia Laboratories, 0,6 cm) na koje su aplicirani tretmani (ekstrakti cijanobakterijskih sojeva koncentracije 10 mg/ml) u količini od 30 µl. Zasejane petri ploče su inkubirane u termostatu na temperaturu od 37°C. Merenje zona inhibicije vršeno je nakon 24 časa. Kao kontrola korišćeni su rastvarači primenjeni za ekstrakciju BAM, 75% metanol i 100% heksan. Dimenzije zona inhibicije oko sterilnih diskova određene su meraćem zone inhibicije antibiogram tableta "Torlak".



Slika 15. Šematski prikaz disk-difuzione metode

### 3.9.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) cijanobakterijskih ekstrakata primenom mikrodilucione metode

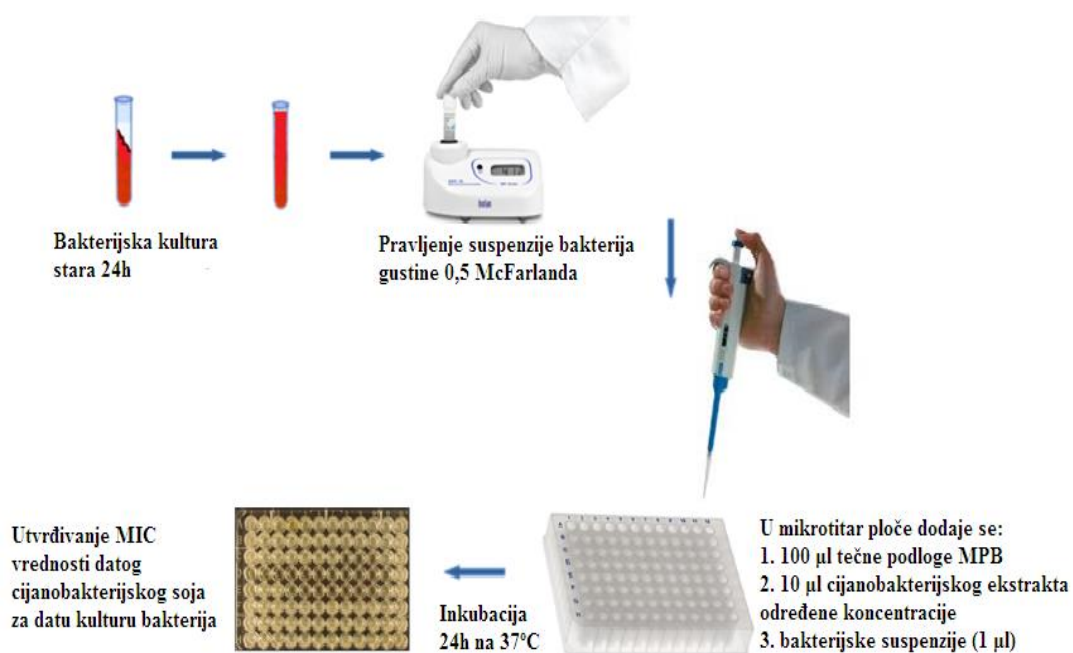
Utvrđivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) vršeno je za sve cijanobakterijske sojeve koji su pokazali antibakterijsku aktivnost, odnosno negativan efekat na rast određenih sojeva bakterija, primenom mikrodilucione metode. Minimalna inhibitorna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju nekog antimikrobnog agensa potrebnu da se vidno inhibira rast mikroorganizama nakon 24h inkubacije. Minimalna baktericidna koncentracija predstavlja najmanju koncentraciju antimikrobnog agensa pri kojoj je ubijeno 99,9 % test organizama nakon 24h inkubacije.

Za utvrđivanje MIC i MBC vrednosti napravljena je serija od 5 različitih koncentracija cijanobakterijskih ekstrakata u dva tipa rastvarača, 75% MeOH i 100% heksan. Početna koncentracija od koje je napravljena serija razblaženja iznosila je 10 mg/ml. Nakon toga je ispitivana njihova aktivnost na rast onih bakterijskih kultura kod kojih je detektovan inhibicioni efekat u disk-difuzionoj metodi.

#### Postupak:

Određivanje MIC vrednosti cijanobakterijskih ekstrakata vršeno je u mikrotitar pločama. Za pravljenje suspenzije bakterija u fiziološkom rastvoru (0,86% NaCl) korišćene su bakterijske kulture stare 24h kultivisane na hranljivom agaru (MPA "Torlak") u termostatu na temperaturi od 37°C. Gustina zasejavane suspenzije iznosila je 0,5 McFarlanda ( $1,5 \times 10^8$  ćelija/mL) (Slika 16).

U svaki otvor mikrotitar ploče prvo je dodato 100  $\mu$ l tečne podloge MPB (mesopeptonski bujon -"Torlak") i potom je dodato po 10  $\mu$ l cijanobakterijskog ekstrakta određene koncentracije. Za svaki cijanobakterijski soj testirano je 5 različitih koncentracija ekstrakta. Nakon toga, dodate su bakterijske suspenzije u količini od 1  $\mu$ l tako da svaka bakterijska kultura bude tretirana svim ispitivanim koncentracijama ekstrakata cijanobakterijskih kultura. Mikrotitar ploče su potom ostavljene na inkubaciju pri temperaturi od 37°C u trajanju od 24h. Nakon toga vršeno je utvrđivanje pri kojoj koncentraciji ekstrakta je došlo do inhibicije rasta bakterijske kulture odnosno MIC vrednosti datog cijanobakterijskog soja za datu kulturu bakterija. Za pozitivnu kontrolu korišćen je rast testiranih bakterija u MPB u cilju kontrole vitalnosti i rasta test kulture bakterija. U pozitivnu kontrolu je umesto 10  $\mu$ l ekstrakta dodato 10  $\mu$ l bakterijske suspenzije gustine 0,5 McFarlanda. Pored toga, u cilju provere uticaja korišćenog rastvarača na rast test kulture bakterije urađena je i kontrola rastvarača. U slučaju kontrole rastvarača u svaki bunarčić je aplicirano 10  $\mu$ l 75% MeOH odnosno 10  $\mu$ l 100% heksana umesto cijanobakterijskih ekstrakata. Sve probe rađene su u tri ponavljanja.



Slika 16. Šematski prikaz određivanja MIC primenom dilucione metode

Minimalna baktericidna koncentracije (MBC) je određena presejavanjem na čvrstu hranljivu podlogu (Müeller Hinton-“Torlak”) sadržaja onih tretmana kod kojih je zabeleža inhibicija ili odsustvo rasta bakterija u mikrotitar ploči. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 24h utvrđuje se MBC kao ona koncentracija cijanobakterijskog ekstrakta pri kojoj je ubijeno 99% bakterija, odnosno pri kojoj nema rasta ili je rast bakterija na čvrstoj podlozi vrlo slab.

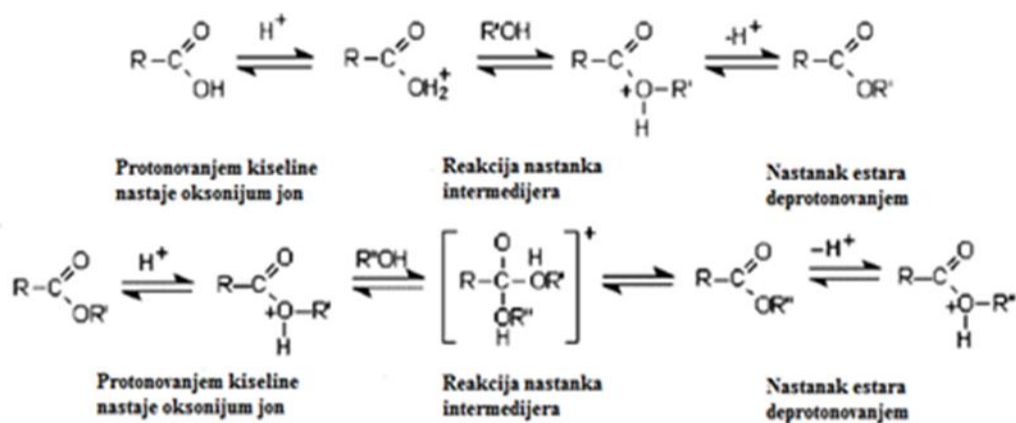
U cilju utvrđivanja prirode antibakterijskih jedinjenja određen je sadržaj masnih kiselina za koje je poznato da mogu imati antimikrobni efekat.

### 3.9.3. Hemijska karakterizacija i određivanje sastava masnih kiselina nakon transesterifikacije sa bor(III)-fluoridom metodom gasne hromatografije (GC-FID)

Lipidni ekstrakti 20 odabranih cijanobakterija dobijeni ekstrakcijom po Folchu podvrgnuti su transesterifikaciji u prisustvu bor(III)-fluorida (BF<sub>3</sub>) prema proceduri opisanoj od strane Karlović i Andrić (1996) primenom gasne hromatografije sa plameno jonizacionim detektorom (GC-FID). Oko 20 mg lipidnog ekstrakta najpre je odmereno u posude za derivatizaciju, nakon čega je dodato 0,5 ml 5% NaOH u apsolutnom metanolu i atmosfera u posudi je zamenjena uvođenjem azota tokom 10 sekundi nakon čega su posude zatvorene i podvrgnute saponifikaciji u termostatu na 70°C u trajanju od 10 minuta. Posle isteka navedenog vremena, posude su izvađene iz termostata i sadržaj je ohlađen na sobnu temperaturu. U posude je nakon toga dodato 0,5 ml 14% BF<sub>3</sub> u apsolutnom metanolu, posude su zatvorene i zagrevane 10 minuta u

termostatu na 70°C. Opšti mehanizam reakcije transesterifikacije prikazan je na Slici 17. Nakon 10 minuta, posude su izvađene iz termostata, ohlađene na sobnu temperaturu i zatim je dodato 0,5 ml zasićenog rastvora NaCl. U smešu je nakon toga dodato 1 ml n-heptana GC čistoće i sadržaj je blago promućkan kako bi se pospešila ekstrakcija metil-estara masnih kiselina. Heptanski sloj je potom prenet u epruvetu i ispran sa 1 ml zasićenog rastvora NaCl, nakon čega je organski sloj prenet u vijalu i podvrgnut analizi na gasnom hromatografu.

Gasno-hromatografska analiza metil-estara masnih kiselina (FAMES) je izvršena na GC uređaju Agilent 7890A sa plameno jonizujućim detektorom (FID) i kolonom Supelco SP-2560 (100 m x 0,25 mm; debljina stacionarne faze 0,20 μm). Helijum je korišćen kao gas nosač (čistoća > 99,9997% (v/v), protok = 1,21 ml/min). Pomoću autosamplera injektovano je 1 μl uzorka (split mod, 1:25), a temperaturni program kolone je bio sledeći: 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). Pikovi pojedinih metil-estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena sa retencionim vremenima smeše 37 standarda (Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix). Količina pojedinih masnih kiselina dobijena je poređenjem površine pikova uzorka sa površinama pikova standarda masnih kiselina poznate koncentracije. Svaka analiza urađena je u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao maseni procenat masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama ± standardna devijacija.



Slika 17. Generalni mehanizam reakcije transesterifikacije masnih kiselina (Aldai i sar., 2005)



### 3.9.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti cijanobakterija *in vitro*

#### 3.9.4.1. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH• radikala

Kapacitet „hvatanja“ slobodnih radikala ispitivanih ekstrakata DPPH testom određuje se merenjem njihove sposobnosti da neutrališu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikale (DPPH•). Metoda (Espin i sar., 2000) zasniva se na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH• u redukovani oblik žute boje, DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH• prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik. Neutralizacija DPPH• se dešava pomoću dva mehanizma koji se simultano odvijaju. Najpre, fenolno jedinjenje deluje kao donor H-atoma pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal, koji je rezonantno stabilizovan. Nakon toga, nastali ariloksi radikal može da reaguje sa još jednim DPPH• radikalom, pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralan molekul.

Reagensi:

Osnovni DPPH reagens (0,4 mM/L): 0.0157 g DPPH reagensa u 100 ml EtOH

Radni DPPH reagens (90 µM/L): 22,5 ml osnovnog DPPH reagensa u 100 ml MeOH

Postupak:

Od početnih koncentracija ekstrakata opsega od 10 do 0,0625 mg/mL napravljena je serija razblaženja tako da je na kraju raspon radnih koncentracija kod ispitivanih ekstrakata bio od 116,73 µg/mL do 29,18 µg/mL. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja. Za svaku radnu probu rađena je i jedna korekcija.

Pripremljeni rastvori i postupak rada prikazan je u Tabeli 13. Nakon inkubacije od 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 515 nm.

Tabela 13. Rastvori i postupak rada za određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH• radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola
60 µl DPPH•	-	60 µl DPPH•
10 µl ekstrakta	10 µl ekstrakta	10 µl rastvarača
180 µl MeOH	240 µl MeOH	(70% EtOH)
		180 µl MeOH

Princip računanja:

Kapacite hvatanja DPPH• radikala određen je iz razlike  $A_{gr}$  i  $A_{kor}$  i dobijena je Auzorka:

$Auzorka = A_{gr} - A_{kor}$

$\%RSC = 100 - Auzorka \times 100 / A_{kontrola} \times 100\%$

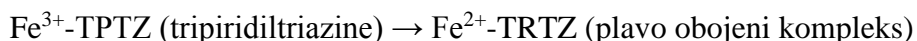
RSC=kapacitet „hvatača“ slobodnih radikala

Na osnovu vrednosti dobijenih za RSC različitih koncentracija ekstrakata cijanobakterija određene su  $IC_{50}$  ili  $IC_{25}$  vrednosti (koncentracija ispitivane supstance pri kojoj je neutralisano 50% odnosno 25% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafikona (funkcija % RSC u

zavisnosti od radne koncentracije). Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri  $IC_{50 \pm SD}$  ili  $IC_{25 \pm SD}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Espin i sar., 2000).

### 3.9.4.2. Određivanje redoks kapaciteta FRAP metodom

FRAP metoda je spektrofotometrijska metoda zasnovana na reakciji redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Nastali fero-joni sa prisutnim ligandom grade plavo obojeni kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (gvožđe(II)-2,4,5-tripiridil-S-triazin):



Prisustvo plave ili zelene boje ukazuje na prisustvo  $\text{Fe}^{2+}$  jona, kao i na njegovu koncentraciju. Antioksidativna moć raste sa povećanjem koncentracije tj. sa povećanjem mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta, što se manifestuje intenzivnijom bojom rastvora.

#### Reagensi:

FRAP reagens: acetatni pufer:TPTZ: $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  = 10 ml:1ml:1ml

$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM/L): 0,0541 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u 10 ml destilovane vode

TPTZ rastvor (10 mM/L u 40 mM/L HCl): 0,0312 g TPTZ u 10 ml 40 mM/L HCl

HCl (40 mM/L): 0,086 ml cc HCl u 25 ml destilovane vode

Askorbinska kiselina (1 mM/L): 0,0176 g askorbinske kiseline u 100 ml destilovane vode

Acetatni pufer: (pH 3,6): 0,31 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  i 1,6 ml cc  $\text{CH}_3\text{COOH}$  u 100 ml destilovane vode

#### Postupak:

Razblaženja askorbinske kiseline napravljena su u rasponu koncentracija od 0 do 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Od početnih koncentracija ekstrakata opsega od 10 do 0,0625 mg/mL napravljena je serija razblaženja tako da je na kraju raspon radnih koncentracija kod ispitivanih ekstrakata bio od 116,73  $\mu\text{g/mL}$  do 29,18  $\mu\text{g/mL}$ . Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja, a korekcije jednom. Pripremljeni rastvori i postupak rada prikazani su u Tabeli 14. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 595 nm nakon 6 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi.

Tabela 14. Rastvori i postupak rada za određivanje redoks kapaciteta FRAP metodom

Radna proba	Korekcija	Slepa proba
225 $\mu\text{l}$ FRAP reagensa		225 $\mu\text{l}$ FRAP reagensa
10 $\mu\text{l}$ ekstrakta (askorbinske kiseline)	10 $\mu\text{l}$ ekstrakta	10 $\mu\text{l}$ rastvarača
22.5 $\mu\text{l}$ destilovane $\text{H}_2\text{O}$	247.5 $\mu\text{l}$ destilovane $\text{H}_2\text{O}$	22.5 $\mu\text{l}$ destilovane $\text{H}_2\text{O}$

#### Princip računanja:

Redukcioni potencijal cijanobakterijskih ekstrakata je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbance u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora askorbinske kiseline. Standardna kriva je konstruisana na osnovu rezultata dobijenih merenjem apsorbanci standardnog rastvora askorbinske kiseline i serije razblaženja od: 1000, 800, 600, 400, 200,

100, 50, 25, 12.5 i 0  $\mu\text{M}$ . Vrednost ekvivalenta askorbinske kiseline (AK)/g suve materije kod ekstrakata ispitivanih cijanobakterija dobijene su na sledeći način:

$\text{Mg ek. AK/g s.m.} = \text{očitana konc. AK } (\mu\text{g/ml})/\text{radna konc.} \times 1000$

Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  SD (mg ekvivalenta askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta) (Benzie i Strain, 1996).

U cilju utvrđivanja prirode antioksidativnih jedinjenja dalje je određen sadržaj fenolonog sastava s obzirom na činjenicu da fenolna jedinjenja predstavljaju poznata prirodna jedinjenja sa sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala.

### 3.9.5. Hemijska analiza fenolnog sastava cijanobakterija primenom LC/MS-MS analize

Odabrana fenolna jedinjenja u ispitivanim cijanobakterijskim ekstraktima kvantifikovana su primenom LC/MS-MS tehnike (Orčić i sar., 2014). Razdvajanje komponenti pripremljenih ekstrakata izvršeno je na tečnom hromatografu Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution kuplovanim sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI). Za kontrolu rada tečnog hromatografa korišćen je MassHunter ver.B.03.01. softver (Agilent Technologies).

Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm x 50 mm x 1,8  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies) reverzno-fazna kolona pri temperaturi od 450°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0,05% mravlje kiseline (A) i metanola (B). Protok je iznosio 1 mL/min. Primenjeni gradijentni mod je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, sa vremenom reekvilibracije od 3 min. Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 5  $\mu\text{L}$ . Korišćeni ESI parametri bili su: gas za sušenje ( $\text{N}_2$ ) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM modu. Kalibracioni standardi koncentracija 0,0015  $\mu\text{g/mL}$  do 25,0  $\mu\text{g/mL}$  pripremljeni su u sekvencijalnim razblaživanjima (1:1) osnovnog miksa koncentracije 100  $\mu\text{g/mL}$  smešom metanol-voda (3:7). Određivanje sadržaja standardnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima urađeno je na osnovu standardne kalibracione krive (funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda,  $\log(A)=f \log(C)$ ), snimljene iz serije razblaženja miksa standarda).

### 3.9.6. Određivanje toksičnosti izolovanih cijanobakterija

U cilju detekcije toksičnosti kod 20 odabranih cijanobakterijskih sojeva primenjena su tri bioeseja (*Artemia salina*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*). Za ekstrakciju biološki aktivnih materija sa potencijalno toksičnim efektom korišćena su dva tipa rastvarača. U slučaju bioeseja sa račićima *Artemia salina* testirani su 75% metanolni i DMSO intracelularni ekstrakti cijanobakterijskih sojeva. Kod preostala dva bioeseja, bioeseja sa *Daphnia magna*, kao i DarT testa sa embrionima *Danio rerio* testirani su samo upareni dihlormetan-metanolni (DMSO) cijanobakterijski ekstrakti.

3.9.6.1. *Artemia salina* bioesej

Vrsta *Artemia salina* gajena je u veštačkoj morskoj vodi (ASW podloga) čija je pH vrednost iznosila 8,5 nakon sterilizacije. Sastav podloge prikazan je u Tabeli 15.

Tabela 15. Sastav podloge za gajenje *A. salina*

Sastojci	Količina u gL <sup>-1</sup>
NaCl	24,0
KCl	0,6
MgSO <sub>4</sub>	6,0
CaCl <sub>2</sub>	0,7
MgCl <sub>2</sub>	4,5

## Postupak:

U 100 ml sterilne ASW podloge dodato je 0,6 grama jaja vrste *A. salina*. Inkubacija na 30°C u trajanju od 30-36 časova vršena je u uslovima osvetljenosti i aeracije. Nakon perioda inkubacije, izleženi račići korišćeni su za dalje testiranje u mikrotitar pločama.

Pre apliciranja ekstrakata mikrotitar ploče isprane su sa destilovanom vodom. U svaki bunarčić stavljeno je po 100 µl metanolskog odnosno 10 µl DMSO ekstrakta cijanobakterijske kulture i mikrotitar ploče su ostavljene na uparavanje u toku noći na 30°C. Za svaki cijanobakterijski soj testirano je 5 koncentracija u po tri ponavljanja. Nakon uparavanja ekstrakata u svaki bunarčić aplicirano je pipetom po 10-20 živih račića u 100 µl ASW podloge nakon čega je dodato još po 100 µl podloge. Ploče su potom inkubirane na 30°C uz osvetljenje i nakon 24h izvršeno je očitavanje rezultata. Očitavanje rezultata vršeno je brojanjem mrtvih račića pod lupom Olympus KL 1600 LED (Japan) nakon čega je u svaki otvor dodato 100µl metanola kako bi se ubili svi račići odnosno odredio tačan ukupan broj račića u svakom otvoru. Dobijen je procenat mortaliteta račića koji ukazuje na toksičnost ispitivanih sojeva cijanobakterija.

Kao kontrola korišćen je esej u kojem su stavljene samo račići u podlozi bez dodatka bilo kog tretmana pri čemu se u takvoj kontroli ne očekuje da smrtnost bude veća od 5%. U cilju eliminacije uticaja ekstrakcionog sredstva na larve *A. salina*, kao dodatna kontrola testirani su upareni rastvarači korišćeni za ekstrakciju, 75% metanol i DMSO. Esej za svaki soj rađen je u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti dobijenih rezultata ±SD.

Za svaki ispitivani cijanobakterijski soj određene su LC<sub>50</sub> ili LC<sub>25</sub> vrednosti (koncentracije pri kojoj mortalitet larvi iznosi 50% ili 25%). Određivanje pomenutih vrednosti vršeno je korišćenjem serije koncentracija cijanobakterijskih ekstrakata rađenih u tri ponavljanja.

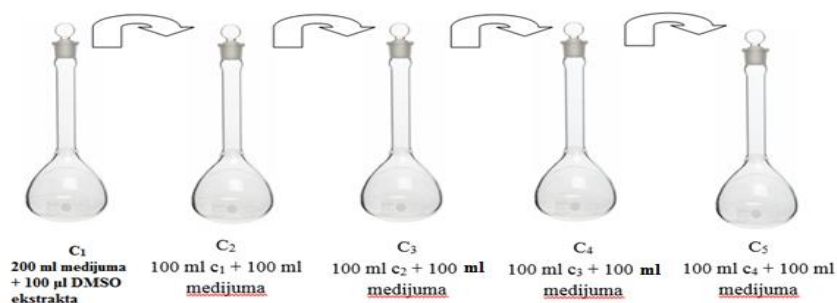
3.9.6.2. *Daphnia magna* bioesej

Vrsta *Daphnia magna* gajena je u standardnom sintetičkom medijumu prema metodi Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (USEPA) u akvarijumima zapremine 10 L sa konstantnom aeracijom, pri temperaturi 25±2°C i osvetljenošću 10-20 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> pri režimu 16h svetlosti i 8h mraka. Dafnije su hranjene jednom dnevno sa mikroalgom *Pseudokirchneriella subcapitata*.

## Postupak:

Dan pre početka eksperimenta vršeno je izdvajanje trudnih jedinki kod kojih se jaja uočavaju kao crne tačkice zbog providnosti karapaksa. Takođe, aeracija medijuma vršena je nekoliko časova pre početka oglada. Na dan eksperimenta vršena je provera određenih parametara u medijumu. U medijumu su mereni: pH vrednost (pH vrednost treba da bude u opsegu od 6 do 9); temperatura (dozvoljeni temperaturni opseg je  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ); koncentracija kiseonika (konc.  $\text{O}_2$  treba da bude iznad 3ppm). Sledeći korak u radu podrazumevao je izdvajanje neonata starosti 24h u posebnu staklenu času sa aerisanim medijumom.

Priprema serije razblaženja cijanobakterijskih ekstrakata rađena u staklenim tikvicama volumena 200 mL, pri čemu je u slučaju prve koncentracije dodato 100  $\mu\text{l}$  DMSO ekstrakta određene koncentracije u 200 mL medijuma (Slika 18). Za svaki testirani cijanobakterijski soj napravljena je serija razblaženja odnosno 5 koncentracija. Nakon toga, po 25 ml određene koncentracije ekstrakta prebačeno je u staklene čaše volumena 25 mL. Svaka koncentracija rađena je u 4 ponavljanja. Poslednji korak podrazumevao je dodavanje neonata. U svaku čašu dodato je po 5 neonata pasterovom pipetom. Staklene čaše sa neonatama ostavljene su 24h na staklenim policama sa određenim režimom osvetljenosti, 16h svetlosti i 8h mraka, pri temperaturi  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .



Slika 18. Priprema serije razblaženja cijanobakterijskih ekstrakata

Nakon 24 časa vršena je provera vijabiliteta neonata. Uginulim jedinkama smatrane su neonate kod kojih nije uočeno kretanje. Pored provere vijabilnosti jedinki, na kraju eksperimenta takođe je vršena i provera parametara medijuma (pH vrednosti, temperature, koncentracije kiseonika) u cilju eliminacije uticaja istih na uočeno odsustvo kretanja. Kao pozitivna kontrola korišćen je medijum sa neonatama bez ekstrakta. U cilju eliminacije uticaja ekstrakcionog sredstva na neonate, kao dodatna kontrola korišćen je i DMSO za koji je takođe napravljena serija razblaženja. Za svih 5 koncentracija DMSO urađena su 4 ponavljanja.

U slučaju cijanobakterijskih sojeva za koje je uočeno da su ispoljili efekat na neonate, odnosno gde je zapaženo odsustvo pokretljivosti određene su  $\text{LC}_{50}$  ili  $\text{LC}_{25}$  vrednosti (koncentracije pri kojoj mortalitet neonata iznosi 50% ili 25%). Određivanje pomenutih vrednosti vršeno je korišćenjem serije koncentracija cijanobakterijskih ekstrakata urađenih u 4 ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm\text{SD}$ .

3.9.6.3. *Danio rerio* bioesej (DarT test)

Embrioni i eleuteroembrioni vrste *Danio rerio* gajeni su u rekonstituisanom ribljem medijumu, autoklaviranoj Milipure vodi čiji je sastav soli prikazan u Tabeli 16.

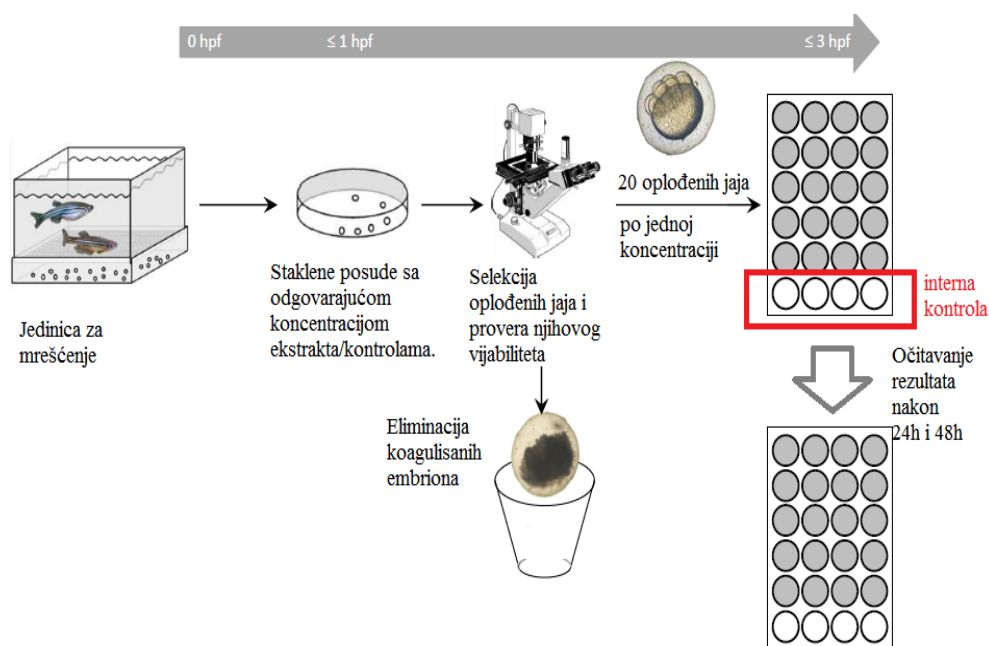
Tabela 16. Sastav rekonstituisanog ribljeg medijuma

Sastojci	Količina u gL-1
MgSO <sub>4</sub>	242,5 mmol
NaHCO <sub>3</sub>	308,3 mmol
CaCl <sub>2</sub>	794,9 mmol
KCl	30,9 mmol

## Postupak:

Odrasle zrele jedinke zebrića korišćene su za produkciju jaja. Mužjaci i ženke držani su u staklenim akvarijumima u odnosu 1:2 pri temperaturi 26±1°C sa režimom osvetljenosti 12 časova svetlosti i 12 časova mraka. Radi sprečavanja kanibalizma jaja od strane odraslih jedinki zamke za mrešćenje pokrivaju se sa nerđajućim mrežicama. Imitacije biljaka korišćene su kao supstrat za mrešćenje. Mrešćenje i fertilizacija odigravaju se ujutru tokom 30 minuta nakon paljenja svetla. Potom, 30-60 minuta nakon mrešćenja uklanjaju se zamke za jaja i jaja se sakupljaju u plastične posude sa medijumom. Jedna odrasla ženka može da produkuje 50-200 jaja dnevno. Oplođena jaja podležu prvoj deobi nakon približno 15 min i uzastopnim sinhronim deobama obrazuju se 4, 8, 16 i 32 ćelijske blastomere. Na ovom stupnju (4-32 ćelija) jaja se mogu identifikovati jasno kao oplođena i samo takva jaja treba da se koriste dalje u eksperimentu (Nagel, 2002).

Oplođena jaja korišćena su najkasnije 60 minuta posle oplodnje odnosno pre početka rascepa blastodiska ili u 16-to ćelijskoj fazi. Pre početka rada, izvršeno je pregledanje embriona pod lupom Olympus KL 1600 LED (Japan) radi eliminacije embriona kod kojih su primećeni počeci koagulacije ili anomalije u deobi ćelija. Nakon selekcije i odabira vitalnih embriona pomoću sterilnih pasterovih pipeta embrioni su prebačeni u staklene čaše određene koncentracije ekstrakta. Za svaki testirani cijanobakterijski soj rađen je raspon od 5 koncentracija. Za svaku koncentraciju korišćeno je 20 embriona, 1 embrion po jednom bunarčiću. Pored toga, za svaku koncentraciju rađene su i 4 negativne, interne kontrole bez ekstrakta (Slika 19). Kao pozitivna kontrola korišćen je 3,4-dihloraniline. U cilju ispitivanja uticaja korišćenog rastvarača na razvoj embriona rađena je kontrola za rastvarač odnosno za DMSO. Za testiranje uticaja DMSO na embrione korišćeno je 20 replikata. Po jedan embrion u 2 mL određene koncentracije ekstrakta dodat je u po jedan bunarčić u sterline mikrotitar ploče sa 24 otvora.



Slika 19. Postupak rada u DarT testu

([http://www.oecd.org/env/ehs/testing/2012-07-09\\_Draft\\_FET\\_TG\\_v8\\_FINAL.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/2012-07-09_Draft_FET_TG_v8_FINAL.pdf))

Nakon dodavanja u ploče embrioni se drže u inkubatoru na 26°C pri čemu je režim svetlosti bio 14h svetlosti:10h mraka. Nakon 24h i 48h vršena je provera vitalnosti embriona pod lupom. Letalne krajnje tačke predstavljaju: koagulacija oplodjenih jaja (embrioni su mlečno bele boje, tamni pod mikroskopom); nedostatak formiranja somita na čije formiranje ukazuju spontani pokreti (kontrakcije); nedostatak odvajanja pupoljka repa od žumančane kese; nedostatak otkucaja srca. Na kraju perioda izlaganja, akutna toksičnost je određena na osnovu pozitivnog ishoda u bilo kojoj od 4 letalne krajnje tačke na osnovu čega su računane LC<sub>50</sub> ili LC<sub>25</sub> vrednosti. Pojedinačni bunarčići se smatraju kao nezavisna ponavljanja za statističku analizu. Test se smatra validnim ukoliko 90% embriona u kontroli ne pokazuje letalni ili subletalni efekat nakon 48h. Određivanje LC<sub>50</sub> ili LC<sub>25</sub> vrednosti vršeno je korišćenjem serije koncentracija cijanobakterijskih ekstrakata urađenih u 4 ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti dobijenih rezultata ± SD.

### 3.10. qPCR metoda i ispitivanje efekta ekstrakta odabranog cijanobakterijskog soja na ekspresiju 11 gena uključenih u signalne puteve kod model organizma *Danio rerio*

Kod odabranog cijanobakterijskog soja ispitivan je uticaj različitih koncentracija DMSO ekstrakta na ekspresiju 11 gena (*bip*; *cat*; *sod*; *vtg1*; *perla*; *nr1d1*; *cry5*; *p53*; *cyp1a1*; *ahr2*; *xbp1*) uključenih u signalne puteve (ER stres, oksidativni stres, endokrine puteve, neurofiziološke procese, metabolizam ksenobiotika) kod model organizma *Danio rerio*. Mrešćenje odraslih jedinki, produkcija embriona, sastav podloge za gajenje i provera kvaliteta embriona urađeni su prema proceduri opisanoj u ranijem tekstu (Materija i metode - Bioesej sa *D. rerio* – DartT test), dok je dužina izlaganja embriona cijanobakterijskom ekstraktu bila



produžena i trajala je 6 dana (120h). Za odabrani soj, testirano je 3 koncentracije uz upotrebu internih kontrola (10 embriona po jednoj internoj kontroli). Svaka koncentracija je testirana u 6 replikata sa po 10 embriona, ukupno 60 embriona po jednoj koncentraciji. Radi eliminacije uticaja rastvarača na ekspresiju gena ispitan je i efekat 0,1% DMSO korišćenog za ekstrakciju (6 replikata sa po 10 embriona) na ekspresiju gena uz upotrebu internih kontrola u pločama. Eksperiment je rađen u mikrotitar pločama sa 12 bunarčića.

Tokom trajanja eksperimenta, na svaka 24h proveravan je vijabilitet embriona i vršena je eliminacija embriona kod kojih je došlo do koagulacije, prestanka srčane aktivnosti i deformiteta embriona. Nakon 6 dana odnosno 120h časova, usledili su sledeći postupci:

### 3.10.1. Ekstrakcija RNK

Nakon izlaganja eleuteroembriona cijanobakterijskom ekstraktu, iz svakog bunarčića preživeli eleuteroembrioni su izvađeni do isušivanja i prebačeni u kivete volumena 1,5 ml u koje je potom dodato 300  $\mu$ L RNA lejtera koji se koristi za čuvanje RNK, odnosno osigurava da RNK ostaje netaknuta tj. neoštećena. Za ekstrakciju RNK korišćen je Rneasy Mini Kit i ekstrakcija RNK je rađena na osnovu protokola proizvođača (Qiagen).

Na kraju postupka ekstrakcije, čistoća i količina dobijene RNK proverene su spektrofotometrijski na NanoDrop 1000 spektrofotometru (Nanodrop Technologies Inc. Wilmington, USA). Kvalitet, čistoća RNK i sam postupak ekstrakcije mogu se proveriti izračunavanjem odnosa apsorbanci nukleinskih kiselina, proteina i kontaminanata (OD 260/280 i OD 260/230). Pomoću NanoDropa količina svake komponente se meri na odgovarajućoj talasnoj dužini. Nukleinske kiseline se mere na talasnoj dužini od 260 nm, proteini na 280 nm dok se organski kontaminanti mere na talasnoj dužini od 230 nm. Opseg odnosa OD 260/280 i OD 260/230 koji se smatra prihvatljivim indikatorom za dobar kvalitet RNK treba da bude između 1,8 i 2,1. Niže vrednosti 260/280 odnosa mogu ukazati na kontaminaciju organskim rastvaračima korišćenim prilikom postupka ekstrakcije. NanoDrop spektrofotometar se može koristiti za merenje apsorbanci korišćenjem malih volumena uzorka (od 0,5  $\mu$ L do 2  $\mu$ L) i u opsegu talasnih dužina od 190 nm do 840 nm. Pomoću NanoDropa može se detektovati minimum od 2 ng/ $\mu$ L do 12000ng/ $\mu$ L RNK.

Pored spektrofotometrijske provere na Nanodropu, uzorci su provereni i elektroforezom na gelu čime se omogućava razdvajanje fragmentata nukleinskih kiselina na osnovu njihove veličine. Veći fragmenti se kreću sporije na gelu za razliku od manjih fragmenata koji se kreću brže preko matrice gela. Vizuelizacija dobijenih fragmenata postiže se bojenjem gela fluorescentnom bojom, etidijum bromidom. Neoštećena RNK u eukariotskim uzorcima ima jasne i oštre 28S i 18S rRNK trake. Odnos 2:1 (28S:18S) ukazuje na intaktnu RNK visokog kvaliteta. Delimično degradirana RNK ima razmazan izgled sa nedostatkom oštih rRNK traka ili je bez odnosa 2:1 (28S:18S). Kompletно degradirana RNK pojavljuje se kao veoma mali razmaz molekula. Kao kontrola koristi se RNK marker određene veličine za proveru ispravnosti postupka elektroforeze kao i za određivanje veličine traka. Nakon provere kvaliteta RNK, uzorci su čuvani na -80°C do dalje analize.



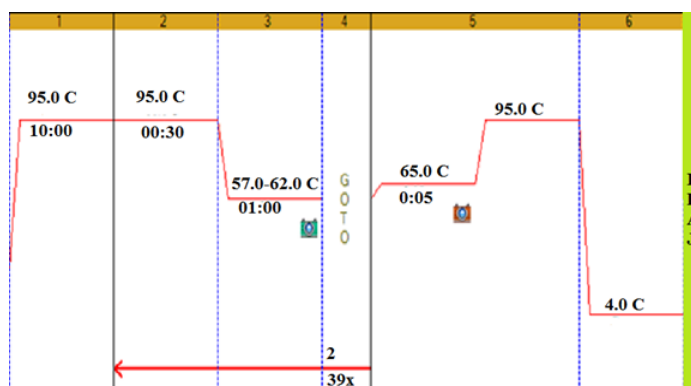
### 3.10.2. Sinteza cDNK

Korišćenjem enzima reverzna transkriptaza (M-MLV RT) 1 mikrolitar RNK reverzno je transkribovan. RNK je prvo razređena do određene koncentracije u vodi bez Rnaze do ukupnog volumena od 14  $\mu$ L po uzorku. Potom je dodat 1  $\mu$ L random heksamera i vezivanje prajmera je išlo na 70°C u toku 5 minuta u Termocycler T-Gradient (Biometra). Nakon toga, 10  $\mu$ L Mastermiksa sledećeg sastava: voda bez nukleaze (Qiagen), pufer (Promega Bioscience Inc.), dNTPs (Sigma Aldrich) i M-MLV RT-Enzim (Promega Bioscience Inc.) je dodato u svaki uzorak nakon čega je sledila inkubacija na 37°C u trajanju od 50 minuta. Nakon završene inkubacije, ciklusom u trajanju od 5 min na 96°C inaktiviran je enzim. Dobijena cDNK je čuvana na -20°C do dalje upotrebe.

### 3.10.3. qPCR

Reakcija RT-qPCR rađena je u CFX Connect Real-Time System (Bio Rad) aparatu. Za analizu je korišćen FastSart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche), koji sadrži FastStart Taq DNK polimerazu za hot-start PCR. FastStart Taq DNK Polimeraza je hemijski modifikovana forma termostabilne rekombinantne polimeraze koja pokazuje aktivnost samo na temperaturama većim od 75°C. Enzim se kompletno aktivira u jednom preinubacionom koraku na 95°C u toku 10 minuta pre početka ciklusa. Na početku umnožavanja, reakciona smeša sadrži denaturisanu DNK, prajmere i boju. Nevezani molekuli boje slabo fluoresciraju. Nakon vezivanja prajmera, nekoliko molekula boje se može vezati za dvolančanu DNK. Tokom postupka elongacije za molekul DNK se vezuje više molekula boje, što rezultira u dramatičnom povećanju emitovane svetlosti nakon pobuđivanja SYBR Green molekula. Povećanje fluorescencije SYBR Green je direktno proporcionalno količini generisane dvolančane DNK. Merjenje fluorescencije na kraju svakog elongacionog koraka svakog PCR ciklusa se vrši radi praćenja povećanja količine amplifikovane DNK.

Protokol po kome je rađen qPCR prikazan je na Slici 20. Na početku dolazi do aktivacije enzima (SYBR GREEN molekul) u jednom preinkubacionom koraku na 95°C u toku 10 minuta pre nego što počnu ciklusi. Nakon toga sledi raskidanje odnosno denaturacija dvolančane DNK na 95°C 30 sekundi nakon čega ide smanjenje temperature do 57-62°C u toku 1 minuta što predstavlja momenat vezivanja prajmera i elongacije. U slučaju gena *cyp1a1*, *ahr2*, *bip*, *sod*, *p53*, *cat* i *per1a* vezivanje prajmera se odvija na 60°C, odnosno na 62,5°C (*nr1d1* i *cry5* gen) i 57°C (*vtg1* gen). Ciklusi od jednog minuta i 30 sekundi se ponovljaju 39 puta. Tokom elongacije više molekula boje se vezuje za novo sintetisanu DNK, što dovodi do dramatičnog povećanja fluorescencije jer više molekula emituju svetlost nakon ekscitacije. Na kraju svakog ciklusa podaci se sakupljaju na šta ukazuje simbol kamere na Slici 20. Ciklus se završava generisanjem kriva topljenja produkata na temperaturama od 65°C do 95°C.



Slika 20. qPCR protokol

U Tabeli 17 nalazi se spisak korišćenih prajmera. Nivo ekspresije housekeeping gena ribozomalnog proteina je korišćen za normalizaciju ekspresije target gena. Svi prajmeri kupljeni su od Microsynth AG, Švajcarska.

Tabela 17. Spisak svih prajmera i njihovih sekvenci korišćenih u qPCR metodi

Geni	Prajmer	Opis (www.uniprot.org)	Nukleotidna sekvenca (5'-3')
Target <i>RPL</i> <sup>1</sup> <i>RPL</i> <sup>1</sup>	Forward Reverse	Ribozomalni protein	AGC TCA AGA TGG CAA CAC AG AAG TTC TTC TCG TCC TCC
ER stres <i>BIP</i> <sup>2</sup> <i>BIP</i> <sup>2</sup>	Forward Reverse	Vezujući imunoglobulonski protein	CGA AGA AGC CAG ATA TCG ATG A ACG GCT CTT TTC CGT TGA AC
Oksidativni stres <i>Cat</i> <sup>7</sup> <i>Cat</i> <sup>7</sup> <i>SOD</i> <sup>8</sup> <i>SOD</i> <sup>8</sup>	Forward Reverse Forward Reverse	Katalaza  Superoksid dismutaza	AGG GCA ACT GGG ATC TTA CA TTT ATG GGA CCA GAC CTT GG GTC GTC TGG CTT GTG GAG TG TGT CAG CGG GCT AGT GCT T
Endokrini ometači <i>Vtg1</i> <sup>13</sup> <i>Vtg1</i> <sup>13</sup>	Forward Reverse	Vitelogenin	CAT CTT ATG CTG GTG ATT TGT CA CTT GAG CTT GAA CTT GAA CTT GA
Neurofiziološki procesi <i>Per1a</i>  <i>Nr1d1</i>  <i>Cry5</i>	Forward Reverse Forward Reverse Forward Reverse	Per1a protein  Nr1d1 protein  Cry5 protein	ATG CGT GCA AGA AGT GGT G ACG TCC TCA TTT AGC GGA CTC GTG AAC AAC CAG CTG CAG AA ACT GTA AGG CCT GGA CAT GG CAT GGA GAG AAC GAA CTG GG GTG CAG ACA AGC AGC CGA AC
Apoptoza <i>p53</i> <sup>6</sup> <i>p53</i> <sup>6</sup>	Forward Reverse	Tumor protein p53	GCT TGT CAC AGG GGT CAT TT ACA AAG GTC CCA GTG GAG TG
Metabolizam ksenobiotika <i>Cyp1a1</i> <i>Ahr2</i>	Forward Reverse Forward Reverse	Citohrom P450  Ariil-ugljovodonični receptor	AAT CCC AGA CGG GCT ACA CCG GGC CAT AGC ACT TAC ACG GTG AAG CTC TCC CAT A AGT AGG TTT CTC TGG CCA C

<sup>1</sup>Oggier i sar., 2010; <sup>2</sup>Christen i sar., 2013; <sup>6</sup>Christen i sar., 2013; <sup>7</sup>Priyadarshini i sar., 2013; <sup>8</sup>Banni i sar., 2011; <sup>13</sup>Hoffmann i sar., 2006

Za obradu podata korišćen je GraphPad program pri čemu su razlike između tretmana testirane primenom one-way ANOVA i Turkey's testa u cilju poređenja srednjih vrednosti tretmana sa (rastvaračem) kontrolama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost 3 ponavljanja ± standardna greška.

### 3.11. Utvrđivanje toksigeničnosti cijanobakterija i detekcija prisutva *mcy* gena PCR metodom

U cilju utvrđivanja prirode toksičnih jedinjenja odnosno produkcije mikrocistina kod odabranih cijanobakterijskih sojeva vršena je detekcija prisutstva *mcy* gena primenom PCR metode. Za umnožavanje *mcy* gena odgovornih za produkciju toksina, mikrocistina, korišćena je lančana reakcija polimeraze po metodi Ouahid i sar. (2005). Za umnožavanje *mcy* gena (*mcyB*, *mcyE*) korišćeni su odgovarajući prajmeri. Nukleotidne sekvence i osnovne karakteristike korišćenih prajmera prikazane su u Tabeli 18.

Tabela 18. Nukleotidne sekvence i osnovne karakteristike prajmera korišćenih u PCR metodi (Ouahid i sar., 2005)

Prajmer	Nukleotidna sekvenca	Dužina	GC %	Tačka topljenja	Veličina produkta (bp)
2156-F*	5'ATCACTTCAATCTAACGACT3'	20	35,0	52,0	955
3111-R*	5'AGTTGCTGCTGTAAGAAA3'	18	38,9	49,0	955
PKEF1	5'CGCAAACCCGATTTACAG3'	18	50,0	52,0	755
PKER1	5'CCCCTACCATCTTCATCTTC3'	20	50,0	52,0	755

\*F – forward prajmer, R- reverse prajmer

#### Postupak:

Prvi korak u PCR metodi podrazumeva pripremu Master Miksa. U sterilne PCR kivetice dodato je 24  $\mu$ l Master Miksa (16,3  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O; 2,5  $\mu$ l Tag pufera; 2,5  $\mu$ l dNTP - 2 mM smeše nukleotida; 0,5  $\mu$ l direktnog i reverznog 10 pM prajmera; 1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,2  $\mu$ l Tag DNK polimeraze (5U/  $\mu$ l)). Nakon dodavanja Master Miksa, u kivete je dodat 1  $\mu$ l izolovane DNK uzorka.

Za PCR reakciju korišćen je aparat Mastercycler Personal proizvođača Eppendorf (Hamburg, Nemačka). Inicijalna denaturacija je bila podešena na 94°C u trajanju od 5 min. Nakon inicijalne denaturacije, sledilo je 35 ciklusa sa fazama denaturacije na 95°C u toku 1 minuta. U zavisnosti od *mcy* gena temperatura vezivanja prajmera u trajanju od 30s je bila 52°C za *mcyB* i *mcyE*. Nakon vezivanja prajmera sledila je sinteza DNK lanca (72°C u toku 1 minuta). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 7 minuta.

Za proveru uspešnosti umnožavanja *mcy* gena, kao i kvaliteta produkata PCR reakcije primenjena je elektroforeza. U bunarčice na 2% agaroznom gelu dodato je ukupno 5  $\mu$ l produkta PCR reakcije zajedno sa bojom, kao i 100 bp DNK marker. Za elektroforezu je korišćen 1xTAE pufer. Razdvajanje fragmenata je teklo pri konstantnom naponu od 100V u toku 1 časa. Nakon elektroforetskog razdvajanja, gelovi obojeni etidijum-bromidom i dobijeni fragmenti očitani su na UV transluminatoru i fotografisani. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni toksičan soj *Microcystis* PCC 7806 s obzirom da je poznato da dati soj poseduje *mcy* gene odgovorne za produkciju toksina mikrocistina.

### **3.12. Statistička obrada podataka**

U cilju utvrđivanja zavisnosti između ispitivanih parametara vršena je statistička obrada podataka pri čemu su dobijeni podaci obrađeni u odgovarajućim softverskim paketima (Statistica 12.6, Origin 6.1) vezanim za određenu vrstu analiza. U zavisnosti od prirode i distribucije dobijenih podataka korišćene su parametrijske i/ili neparametrijske metode. Grafički program za molekularnu filogeniju SeaView korišćen je za filogenetsku rekonstrukciju. GraphPad\_Prism 5 (GraphPad Softver, San Diego, CA, USA) softver korišćen je za obradu podataka dobijenih primenom qPCR metode.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Izolacija i determinacija izolovanih terestričnih cijanobakterija

Tokom trogodišnjeg perioda istraživanja, iz 4 različita šumska ekosistema (Fruška gora, Kopaonik, Tara, Stara planina) sa teritorije Republike Srbije izolovano je i uspešno iskultivisano ukupno 69 cijanobakterijskih sojeva (Tabela 19). Među izolovanim sojevima nalazili su se predstavnici azotofiksirajućih kao i neazotofiksirajućih rodova. Identifikacija sojeva do nivoa roda izvršena je na osnovu morfoloških karakteristika koje predstavljaju važna taksonomska obeležja detaljno opisanih u Uvodnom delu korišćenjem ključeva (determinatora) (Rippka, 1988a; Rippka, 1998b; Anagnostidis i Komárek, 1988; Komárek i sar., 2014). U slučaju azotofiksirajućih cijanobakterija izolovani sojevi pripadali su rodovima *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Tolypothrix* i *Cylindrospermum*. Sa druge strane, izolovani neazotofiksirajući sojevi pripadali su rodovima *Oscillatoria*, *Lyngbya* i *Phormidium*. Najveći broj sojeva izolovan je sa lokaliteta Kopaonik (28 sojeva), sa lokaliteta Stara planina izolovano je 19 sojeva dok je sa lokaliteta Tara izolovano ukupno 15 sojeva. U slučaju lokaliteta Fruška gora, izolovano je ukupno 7 sojeva.

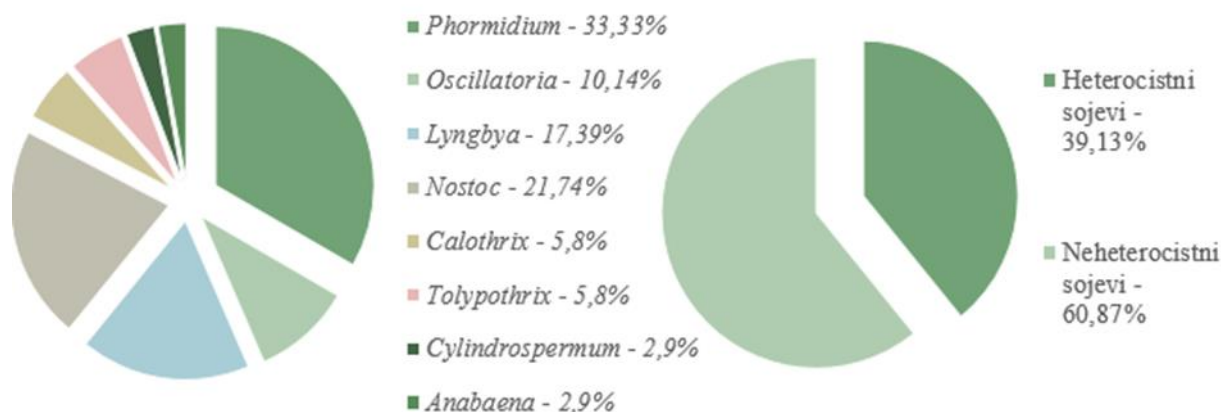
Među izolovanim sojevima, najzastupljeniji su bili predstavnici roda *Phormidium* sa čak 23 izolovana soja. Nakon roda *Phormidium*, drugi po zastupljenosti bio je rod *Nostoc* sa 15 izolovanih sojeva. U slučaju roda *Lyngbya* i roda *Oscillatoria* izolovano je ukupno 12 odnosno 7 sojeva. U slučaju predstavnika roda *Calothrix* i roda *Tolypothrix* izolovana su 4 soja. Rod *Cylindrospermum* predstavljen je sa samo dva soja izolovana iz šumskih ekosistema Kopaonik i Stara planina.

Tabela 19. Cijanobakterijski sojevi izolovani iz šumskih ekosistema 4 planinska područja teritorije Republike Srbije tokom trogodišnjeg monitoringa

Fruška gora	Kopaonik	Tara	Stara planina
<i>Nostoc</i> M1	<i>Lyngbya</i> K8 (2012)	<i>Nostoc</i> T7 (2012)	<i>Nostoc</i> SP2 (2011)
<i>Phormidium</i> M1	<i>Phormidium</i> K8 (2012)	<i>Nostoc</i> T9 (2012)	<i>Anabaena</i> SP2 (2011)
<i>Oscillatoria</i> M1	<i>Nostoc</i> K15 (2012)	<i>Nostoc</i> T11 (2012)	<i>Calothrix</i> SP2 (2011)
<i>Oscillatoria</i> M2	<i>Oscillatoria</i> K15 (2012)	<i>Phormidium</i> T18 (2012)	<i>Oscillatoria</i> SP2 (2011)
<i>Anabaena</i> M2	<i>Phormidium</i> K15 (2012)	<i>Lyngbya</i> T18 (2012)	<i>Phormidium</i> SP2 (2011)
<i>Calothrix</i> M2	<i>Tolypothrix</i> K15 (2012)	<i>Lyngbya</i> T5 (2013)	<i>Oscillatoria</i> SP2 (2013)
<i>Nostoc</i> M2	<i>Lyngbya</i> K8 (2012)	<i>Oscillatoria</i> T5 (2013)	<i>Phormidium</i> SP2 (2013)
	<i>Phormidium</i> K8 (2012)	<i>Phormidium</i> T7 (2013)	<i>Lyngbya</i> SP5 (2013)
	<i>Cylindrospermum</i> K1 (2013)	<i>Oscillatoria</i> T7 (2013)	<i>Phormidium</i> SP5 (2013)
	<i>Nostoc</i> K2 (2013)	<i>Phormidium</i> T8 (2013)	<i>Phormidium</i> SP5 (2013)
	<i>Nostoc</i> K3 (2013)	<i>Lyngbya</i> T18 (2013)	<i>Nostoc</i> SP5 (2013)
	<i>Phormidium</i> K4 (2013)	<i>Phormidium</i> T11 (2013)	<i>Calothrix</i> SP6 (2013)
	<i>Lyngbya</i> K6 (2013)	<i>Phormidium</i> T16 (2013)	<i>Phormidium</i> SP6 (2013)
	<i>Phormidium</i> K6 (2013)	<i>Lyngbya</i> T17 (2013)	<i>Nostoc</i> SP7 (2013)
	<i>Phormidium</i> K7 (2013)	<i>Phormidium</i> T17 (2013)	<i>Lyngbya</i> SP7 (2013)
	<i>Lyngbya</i> K9 (2013)		<i>Lyngbya</i> SP8 (2013)
	<i>Phormidium</i> K10 (2013)		<i>Cylindrospermopsis</i> SP9 (2013)
	<i>Tolypothrix</i> K11 (2013)		<i>Lyngbya</i> SP9 (2013)
	<i>Phormidium</i> K12 (2013)		<i>Calothrix</i> SP12 (2013)
	<i>Tolypothrix</i> K13 (2013)		
	<i>Phormidium</i> K14 (2013)		
	<i>Nostoc</i> K14 (2013)		
	<i>Tolypothrix</i> K14 (2013)		

	<i>Nostoc</i> K15 (2013)		
	<i>Nostoc</i> K17 (2013)		
	<i>Nostoc</i> K18 (2013)		
	<i>Phormidium</i> K18 (2013)		
	<i>Phormidium</i> K19 (2013)		

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 19 može se videti da među izolovanim sojevima dominiraju neheterocistni sojevi (60,87%) u odnosu na heterocistne sojeve (39,13%) (Slika 21). U slučaju azotofiksirajućih sojeva najzastupljeniji rod bio je *Nostoc*. Prema Ettl i Gärtner (1995) vrste koje pripadaju rodovima *Nostoc* i *Anabaena* (*Anabaena* sp. i *Nostoc* sp.) smatraju se kosmopolitskim s obzirom da su prisutne u različitim tipovima zemljištima. Pored toga, zahvaljujući sposobnosti fiksacije azota heterocistne azotofiksirajuće cijanobakterija sposobne su da naseljavaju najrazličitija staništa (Kato, 2012). Pripadnici roda *Nostoc* mogu biti pronađeni kao slobodnoživeći organizmi na zemljištu i kamenu (Potts, 1999; Kato i sar., 2003), ali takođe i u simbiotskim odnosima sa gljivama (Möllenhauer i sar., 1999; Wright i sar., 2001).



Slika 21. Procentualna zastupljenost azotofiksirajućih i neazotofiksirajućih rodova izolovanih iz šumskih ekosistema Republike Srbije

Lemes-da-Silva i sar. (2012) su pokazali da je u slučaju sezonskih polulistopadnih šuma Brazila identifikovano prisustvo 10 rodova cijanobakterija uključujući *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Porphyrosiphon*, *Hapalosiphon*, *Hassalia*, *Nostoc*, *Scytonema* i *Stigonema*. U poređenju sa rezultatima Lemes-da-Silva i sar. (2012) predstavnici rodova kao što su *Lyngbya*, *Phormidium*, *Nostoc* takođe su identifikovani i u ovom radu. U slučaju tropskih planinskih područja Indonezije Neustupa i Škaloud (2008) identifikovali su osam vrsta filamentoznih cijanobakterija koje su pripadale rodovima *Leptolyngbya*, *Nostoc* i *Scytonema*. U tropskim šumama u Singapuru na kori drveta identifikovano je prisustvo velikog broja cijanobakterija (*Aphanothaece* cf. *conglomerata*, *Cyanosarcina* sp., *Gloeocapsa* sp., *Gloeocapsopsis* sp., cf. *Gloeothaece* sp., *Leptolyngbya* cf. *cebennensis*, *Leptolyngbya* sp. 1, *Leptolyngbya* sp. 2, *Leptolyngbya* sp. 3, *Nostoc* sp., *Phormidium* cf. *libidum*, *Scytonema* sp.) od kojih je većina pripadala filamentoznim cijanobakterijama sa malim brojem jednoćelijskih predstavnika (Neustupa i Škaloud, 2010). U odnosu na rezultate Neustupa i Škaloud (2010), u ovom radu svi identifikovani i izolovani sojevi cijanobakterija pripadali su filamentoznim

cijanobakterijama pri čemu jednoćelijski predstavnici cijanobakterija poput roda *Aphanothaece* nisu izolovani. Imajući u vidu da je kultivacija mnogih mikroorganizama u laboratorijskim uslovima veoma otežana (Eilers i sar., 2000) i da se ponašanje izolovanih mikroorganizama u kulturama razlikuje od njihovog ponašanjem u prirodnom okruženju (Dobretsov i sar., 2011) odsustvo jednoćelijskih predstavnika u ovom radu moglo bi biti posledica „gubitka“ takvih predstavnika tokom procesa kultivacije pre nego rezultat njihovog potpunog odsustva u šumskim staništima.

Bitan faktor koji utiče na terestričnu cijanobakterijsku populaciju predstavlja i stepen opterećenosti zemljišta hemikalijama odnosno „čistoća“ ekosistema (Zancan i sar., 2006). Isti autori ustanovili su da pašnjaci i napuštena polja omogućavaju rast brojnim populacijama cijanobakterija uključujući azotofiksirajuće kao i neazotofiksirajuće vrste (*Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp., *Trichormus* sp., *Ilyonema* sp., *Leptolyngbya* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium autumnale*, *Phormidium* sp., *Pseudoanabaena* sp.). Sa druge strane, isti autori su uočili da poljoprivredno obradiva zemljišta imaju značajno redukovanu populaciju cijanobakterija s obzirom da je u istim detektovano prisustvo samo jednog roda (*Scytonema*) (Zancan i sar., 2006). U ovom radu, u slučaju šumskih ekosistema zabeleženo je prisustvo većeg broja rodova kao što su *Anabaena*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Oscillatoria* i *Phormidium* ukazujući na diverzitet šumskih ekosistema.

Među terestričnim cijanobakterijama, *Nostoc commune* predstavlja jednu od najzastupljenijih vrsta zahvaljujući velikoj otpornosti na sušu (Potts, 2000) i brzom oporavku fotosintetičke aktivnosti nakon ponovnog hidriranja ćelija (Sato i sar., 2002). Pored vrste *Nostoc commune*, još jedna veoma česta cijanobakterijska vrsta koja se sreće u terestričnim staništima podložna preživljavanju ekstremnih promena spoljašnje sredine je *Nostoc flagelliforme* (Qian i sar., 1989; Liang i sar., 2012). Ova vrsta široko je zastupljena u ardinim i semiaridnim stepama širom sveta (Alžir, Kina, Češka, Slovačka, Francuska, Japan, Meksiko, Mongolija, Maroko, Rusija, Somalija i SAD) (Li, 1991; Gao, 1998). Jedan od najfascinantnijih aspekata ekologije terestričnih cijanobakterija, poput vrste *Nostoc punctiforme*, predstavlja sposobnost ekspresije različitih fenotipova (Meeks i sar., 2002). Kod vrste *Nostoc punctiforme* u uslovima nedostatka azota, normalne vegetativne ćelije formiraju specijalizovane ćelije za fiksaciju azota, heterociste. U uslovima nutritivnog stresa dolazi do formiranja akineta (spora) čime se obezbeđuje vijabilnost organizma tokom dužeg vremenskog perioda. Pored toga, cijanobakterije takođe mogu da formiraju male pokretne fragmente (hormogonije), koje su od izuzetnog značaja za formiranje stabilnih simbiotskih odnosa sa gljivama i terestričnim biljkama uključujući briofite, gimnosperme i angiosperme (Hunsucker i sar., 2004).

U prirodnim uslovima cijanobakterije retko žive u izolaciji i daleko češće se javljaju u zajednicama u kojima mogu da menjaju svoje fiziološke i biohemijske odlike kao rezultat interakcija sa drugim mikroorganizmima u okruženju (Paerl i Pinckney 1996; Smith i Thanh Doan, 1999). U *in situ* uslovima mikroorganizmi mogu da produkuju jedinjenja u cilju podsticanja ili supresije rasta i funkcije susednih ćelija (Dobretsov i sar., 2011). Upravo zbog toga, u cilju utvrđivanja sposobnosti produkcije raznovrsnih metabolita od izuzetnog značaja predstavlja upotreba kultivisanih cijanobakterija i formiranje kolekcije kultura. Glavne prednosti kontrolisanih uslova gajenja su mogućnost istraživanja vrsta koje ne mogu da rastu u dovoljnoj gustini u prirodnoj sredini, obezbeđivanje čistoće dobijenog unilagalnog biološkog materijala, kao i mogućnost brze proizvodnje odgovarajuće količine biomase uz mogućnost



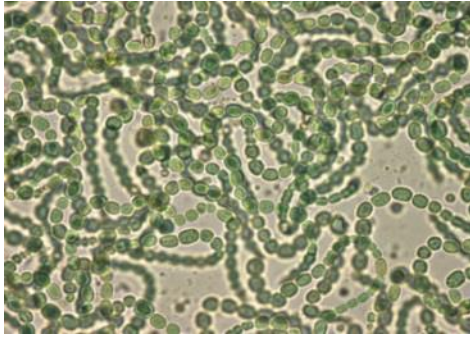
optimizacije uslova za sintezu bioaktivnih jedinjenja (Gacheva i sar., 2013). Svi sojevi prikazani u ovom radu izolovani tokom trogodišnjeg monitoringa priključeni su Novosadskoj kolekciji kultura cijanobakterija (NSCCC) koja se nalazi na Departmanu za Biologiju i Ekologiju (Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad) (Simeunović, 2005).

Za dalju ekofiziološku karakterizaciju odabrano je 20 sojeva sa lokaliteta Tara, Kopaonik, Stara planina, Fruška gora prikazanih u Tabeli 6 (Materijal i metode). Među odabranim sojevima nalazili su se predstavnici svih osam izolovanih rodova (*Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Lyngbya* i *Phormidium*). Pored toga, u okviru svakog roda karakterizacija je urađena za najmanje dva soja, sa izuzetkom roda *Cylindrospermum*, s obzirom na činjenicu da morfološki slični sojevi mogu da se razlikuju pored biogeografske distribucije i u fiziološkim karakteristikama (Boyer i sar., 2002). Na primer, *Microcoleus vaginatus* je najčešći kosmpolitski takson koji se sreće u aridnim i semiaridnim zemljištima, međutim dve vrste ovog roda imaju veoma različite ekološke strategije. *Microcoleus vaginatus* je veoma pokretan i ima protektivnu kaliptru koja mu obezbeđuje neometane pokrete kroz čestice zemljišta. Sa druge strane, *Microcoleus steenstrupii* ne poseduje zaštitnu kaliptru zbog čega je pokretljivost date vrste ograničena (Boyer i sar., 2002).

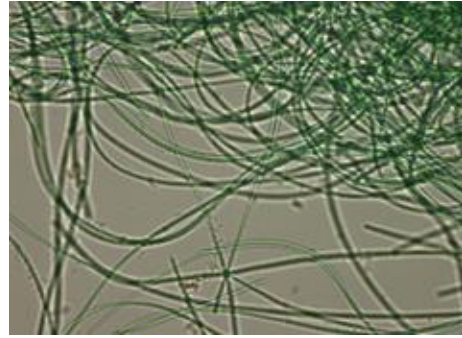
Ekofiziološka svojstva koja su dalje ispitivana kod odabranih cijanobakterijskih sojeva uključivala su:

1. Ispitivanje uticaja azota u funkciji vremena na produkciju biomase i sadržaj fikobiliproteina (fikocijanina, alofikocijanina, fikoeritrina);
2. Sposobnost miksotrofnog rasta odnosno uticaj glukoze i saharoze na produkciju biomase i fikobiliproteina;
3. Sposobnost produkcije ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze i ksiloze) kao važnih komponenata egzopolisaharida;
4. Sposobnost produkcije biološki aktivnih materija (antibakterijska jedinjenja, antioksidativna jedinjenja);
5. Hemijsku karakterizaciju fenolnog i masno kiselinskog sastava kao poznatih jedinjenja sa antioksidativnom odnosno antibakterijskom aktivnošću;
6. Ispitivanje toksičnosti sojeva primenom tri različita testa (*Artemia salina*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*);
7. Ispitivanje uticaja odabranog toksičnog soja na ekspresiju gena kod model organizma *Danio rerio*;
8. Utvrđivanje toksigeničnosti, odnosno prisustva odabranih gena iz *mcy* genskog klastera odgovornog za produkciju toksina mikrocistina.

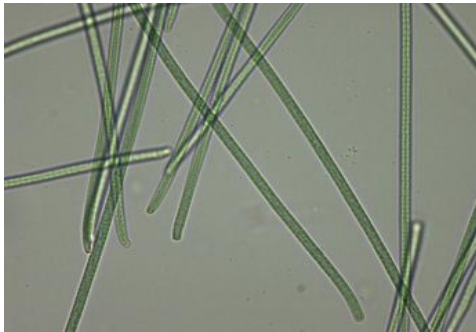
Pored identifikacije na osnovu morfoloških karakteristika (Slika 22-41) identifikacija odabranih sojeva urađena je i na osnovu dela genske sekvence 16S rRNK gena na osnovu koje je konstruisano filogenetsko stablo u cilju utvrđivanja evolutivnih odnosa između izolovanih sojeva.



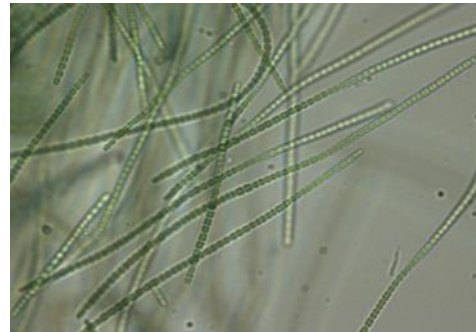
Slika 22. *Nostoc* M1 (2011)



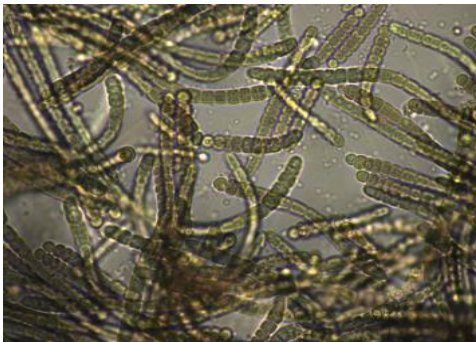
Slika 23. *Phormidium* M1 (2011)



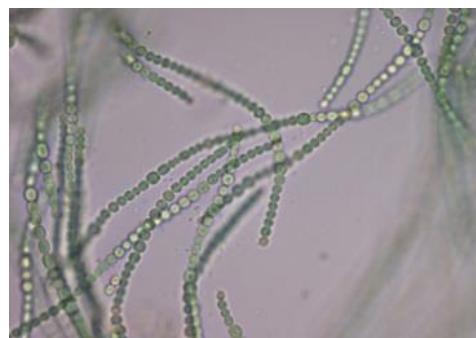
Slika 24. *Oscillatoria* M2 (2011)



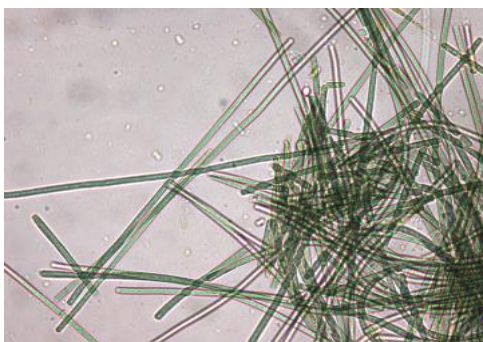
Slika 25. *Anabaena* M2 (2011)



Slika 26. *Calothrix* M2 (2011)



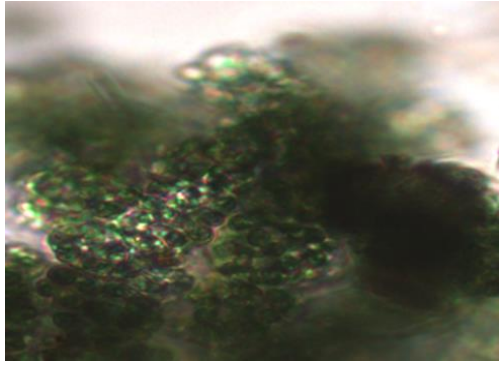
Slika 27. *Anabaena* SP2(2011)



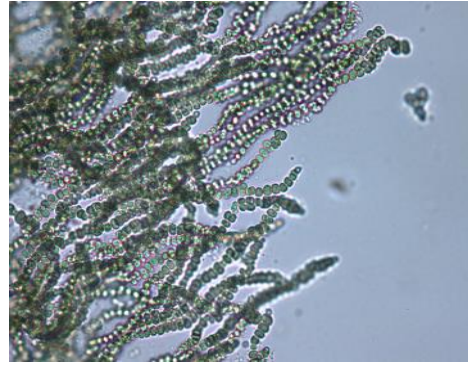
Slika 28. *Oscillatoria* SP2 (2011)



Slika 29. *Calothrix* SP2 (2011)



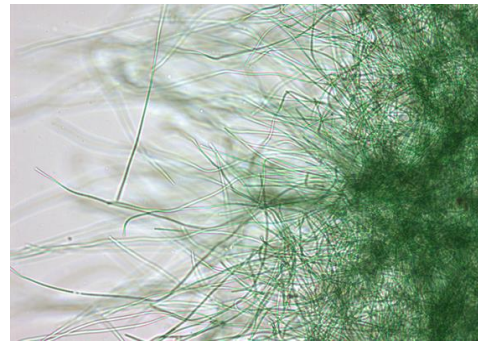
Slika 30. *Nostoc* SP5 (2012)



Slika 31. *Nostoc* T7 (2012)



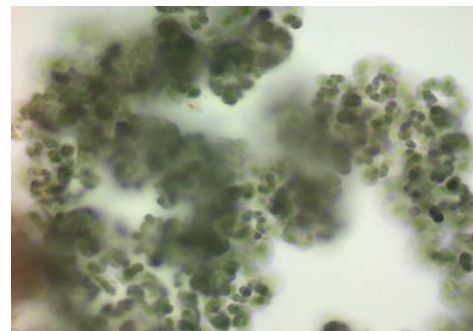
Slika 32. *Lyngbya* T7 (2013)



Slika 33. *Phormidium* T11 (2013)



Slika 34. *Oscillatoria* T18 (2012)



Slika 35. *Nostoc* T18 (2012)



Slika 36. *Cylandrospermum* K1 (2013)

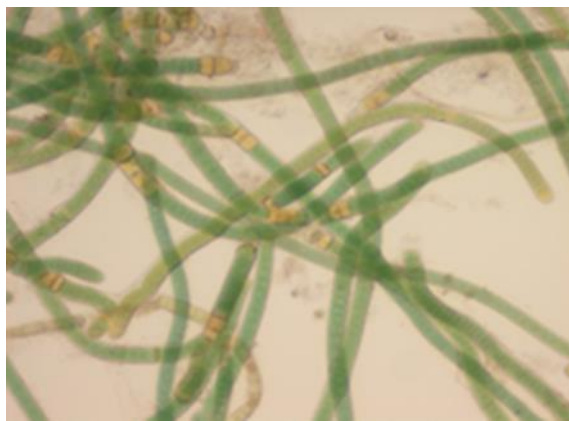


Slika 37. *Lyngbya* K10 (2012)

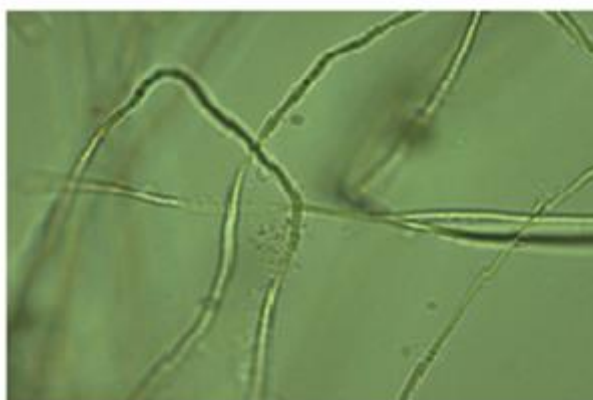




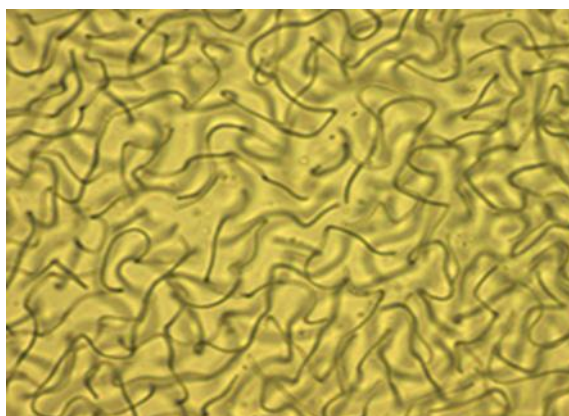
Slika 38. *Tolypothrix* K11 (2012)



Slika 39. *Tolypothrix* K15 (2012)



Slika 40. *Phormidium* K15 (2012)



Slika 41. *Nostoc* K15 (2012)

## 4.2. Identifikacija cijanobakterijskih sojeva korišćenjem dela genske sekvence 16S rRNK gena

U ovom radu izolovani cijanobakterijski sojevi su prvo identifikovani na osnovu morfoloških karakteristika koje predstavljaju važne taksonomske kriterijume koji se koriste prilikom utvrđivanja pripadnosti soja odgovarajućem rodu. Na osnovu datih morfoloških karakteristika izolovani sojevi pripadali su nekom od osam rodova (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*) za koje je karakteristično prisustvo taksonomski važnih morfoloških obeležja detaljno opisanih u Uvodnom delu. Pored toga, morfološke karakteristike tradicionalno predstavljaju glavni kriterijum za klasifikaciju i identifikaciju cijanobakterija. Upravo zbog toga, većina dosadašnjih studija oslanjala se isključivo na manje diskriminatorne metode bazirane na morfologiji (Alvarenga i sar., 2015). Međutim, kao posledica dugogodišnjeg laboratorijskog rasta, stvarni fenotipovi izolovanih sojeva podležu morfološkim promenama, što često dovodi do pogrešne identifikacije korišćenjem samo morfoloških analiza (Lopes i sar., 2012). Shodno tome, Valério i sar. (2009) su ukazali na neophodnost primene molekularnih metoda u cilju tačnije identifikacije. Pored toga, većina trenutno dostupnih molekularnih podataka dobijeni su korišćenjem standardnih sojeva iz različitih kolekcija kultura zbog čega su Thomazeau i sar. (2010) istakli značaj izolacije i sekvenciranja cijanobakterija nedovoljno istraženih staništa, uključujući šumske ekosisteme, kao neophodan korak u popunjavanju postojećih baza za filogenetsku analizu cijanobakterija.

Na osnovu dobijenih rezultata taksonomske identifikacije sojeva po osnovi poravnanja sekvenci sa sekvencama u BLAST bazi podataka (sve sekvence se nalaze u Prilogu 3, Tabela 20), za sekvence 4 soja (*Nostoc* SP5\*, *Nostoc* K15\*, *Nostoc* T7\* i *Cylindrospermum* K1\*) je dobijena visoka sličnost sa sekvencama u bazi podataka (E vrednost bliska nuli ili kada je nula ukazuje na to da je verovatnoća da su sekvence slične iz slučajnih razloga veoma mala, odnosno da ne postoji) ukazujući da bi dati sojevi roda *Nostoc* mogli da pripadaju vrsti *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (Tabela 21). U slučaju izolovanog soja iz roda *Cylindrospermum* na osnovu poravnanja sekvenci izolat bi mogao da predstavlja vrstu *Cylindrospermum siamensis* SAG B11.82. Visoka sličnost dobijena je i za sekvencu soja *Anabaena* M2 sa sekvencom vrste *Anabaena cylindrica* PCC 7122 (procenat sličnosti 96%). Kod dva soja, *Nostoc* M1 i *Nostoc* T18, sličnost sa sekvencom vrste *Nostoc punctiforme* PCC 73102 iznosila je 95%. U slučaju soja *Calothrix* M2 procentualna sličnost sa vrstom *Calothrix elsteri* CCALA 953 iznosila je 92%. Dva soja iz roda *Oscillatoria*, *Oscillatoria* M2 i *Oscillatoria* SP2, pokazali su sličnost sa sekvencom vrste *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112 koja je iznosila 91% (Tabela 21).

Sa druge strane, u slučaju preostalih 7 sojeva, dobijene sekvence pokazale su nižu sličnost sa sekvencama vrsta iz datih rodova koja je bila ispod 90% i kretala se od 89% do 84% (Tabela 21). U slučaju dva soja identifikovana kao pripadnici roda *Tolypothrix* na osnovu morfoloških karakteristika dobijene sekvence su pokazale niže poklapanje sa predstavnicima drugih rodova. Odnosno, BLAST program nije pronašao sličnost sekvenci ni sa jednom vrstom roda *Tolypothrix*. Kod soja *Tolypothrix* K15 sličnost od 89% dobijena je sa sekvencom vrste iz roda *Nodularia* (*Nodularia spumigena* PCC 73104). U slučaju soja *Tolypothrix* K11 sličnost od 84% dobijena je sa sekvencom vrste iz roda *Brasilonema* (*Brasilonema angustatum* HA4187-MV1).

Tabela 21. Rezultati dobijeni poređenjem dela genske sekvence 16S rRNK gena izolovanih sojeva sa bazom podataka za 16S rRNK bakterija i arhea (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

		Max skor	Totalni skor	Query cover	E vrednost	Ident.	Šifra
<i>Nostoc</i> M1	<i>Nostoc punctiforme</i> strain PCC 73102 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	603	603	96%	3e-172	95%	NR_074317.1
<i>Phormidium</i> M1	<i>Phormidium etoshii</i> strain KR2008/49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	435	435	96%	1e-121	87%	NR_125647.1
<i>Calothrix</i> M2	<i>Calothrix elsteri</i> strain CCALA 953 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	531	531	96%	1e-150	92%	NR_117190.1
<i>Anabaena</i> M2	<i>Anabaena cylindrica</i> strain PCC 7122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	632	632	98%	0.0	96%	NR_102457.1
<i>Oscillatoria</i> M2	<i>Oscillatoria nigroviridis</i> strain PCC 7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	514	514	96%	1e-145	91%	NR_102469.1
<i>Oscillatoria</i> SP2	<i>Oscillatoria nigroviridis</i> strain PCC 7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	510	510	92%	2e-144	91%	NR_102469.1
<i>Anabaena</i> SP2	<i>Anabaena cylindrica</i> strain PCC 7122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	231	231	87%	8e-61	88%	NR_102457.1
<i>Calothrix</i> SP2	<i>Calothrix elsteri</i> strain CCALA 953 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	95%	3e-117	87%	NR_117190.1
<i>Nostoc</i> SP5*	<i>Nostoc punctiforme</i> strain PCC 73102 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	673	673	96%	0.0	98%	NR_074317.1
<i>Cylindrospermum</i> K1*	<i>Cylindrospermum siamensis</i> strain SAG B11.82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1099	1099	97%	0.0	99%	NR_117352.1
<i>Lyngbya</i> K10	<i>Lyngbya aestuarii</i> PCC 7419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	96%	1e-100	88%	NR_112179.1

<i>Tolypothrix</i> K11	<i>Brasilonema</i> <i>angustatum</i> strain HA4187-MV1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	368	368	95%	1e-101	84%	NR_125583.1
<i>Tolypothrix</i> K15	<i>Nodularia</i> <i>spumigena</i> strain PCC 73104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	237	237	80%	2e-62	89%	NR_112106.1
<i>Nostoc</i> K15*	<i>Nostoc punctiforme</i> strain PCC 73102 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	614	614	86%	1e-175	98%	NR_074317.1
<i>Phormidium</i> K15	<i>Phormidium etoshii</i> strain KR2008/49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	95%	4e-111	86%	NR_125647.1
<i>Lyngbya</i> T7	<i>Lyngbya aestuarii</i> PCC 7419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	281	281	74%	1e-75	84%	NR_112179.1
<i>Nostoc</i> T7*	<i>Nostoc punctiforme</i> strain PCC 73102 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	651	651	96%	0.0	97%	NR_074317.1
<i>Phormidium</i> T11	<i>Phormidium etoshii</i> strain KR2008/49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	95%	3e-117	87%	NR_125647.1
<i>Nostoc</i> T18*	<i>Nostoc punctiforme</i> strain PCC 73102 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	592	592	92%	6e-169	95%	NR_074317.1
<i>Oscillatoria</i> T18	<i>Oscillatoria nigro- viridis</i> strain PCC 7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	442	442	97%	6e-124	89%	NR_102469.1

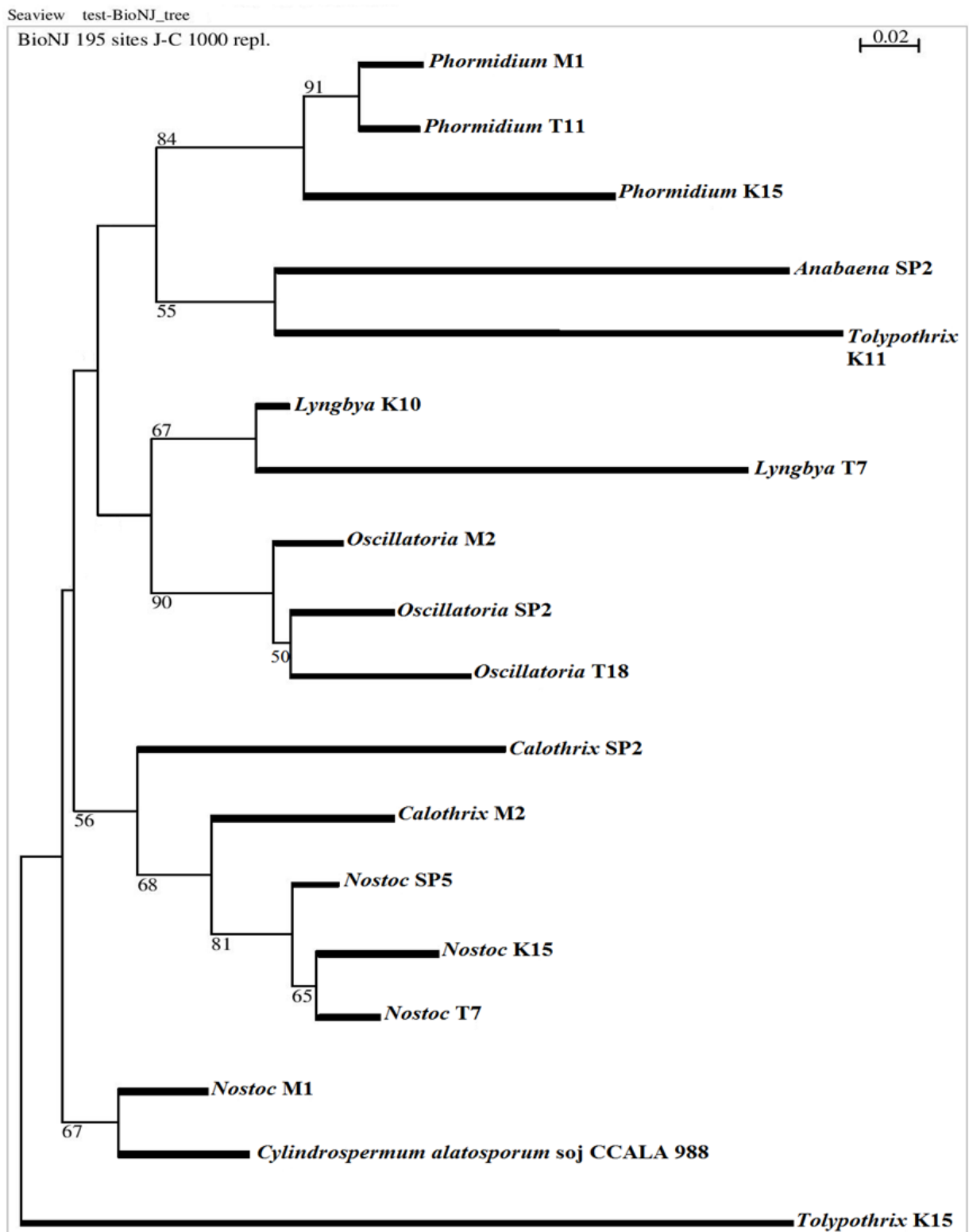
Međutim, važno je napomenuti da se dužina dobijenih sekvenci za odabrane analizirane sojeve kretala od 221 bp (*Anabena* M2) do 642 bp (*Cylindrospermum* K1) pri čemu je u većini slučajeva dužina sekvenci iznosila oko 382 bp. S obzirom da su dobijene sekvence dosta kratke svakako da je niža sličnost sa sekvencama u bazi podataka za 16S rRNK gen vrsta odgovarajućih rodova u poređenju sa sekvencama dobijenim u ovom radu očekivana. Upravo zbog toga, nepoklapanje između identifikacije izvršene na osnovu morfološki taksonomski važnih obeležja i BLAST analize sekvenci dela 16S rRNK gena primećeno kod nekih sojeva nije iznenađujuće. Štaviše, i u slučaju sličnosti genske sekvence 16S rRNK gena iznad 97,5% sekvence mogu imati nisku ili visoku DNK:DNK povezanost i mogu pripadati bilo istim ili različitim vrstama (Stackebrandt i Goebel, 1994). Odnosno, zbog ograničene rezolucije između blisko srodnih vrsta, definicija vrste se ne može zasnivati samo na 16S rRNK genskoj sekvenci (Medini i sar., 2005; Swingley i sar., 2008). Na primer, u slučaju roda *Lyngbya* prosečan broj nukleotidnih supstitucija između 16S rRNK gena unutar genoma je približno jednak broju nukleotidnih supstitucija između morfoloških vrsta. U slučaju vrste *Lyngbya* spp., genotipska



raznolikost prevazilazi fenotipsku raznolikost 10 puta. Ovo se zasniva na činjenici da nekoliko sojeva sadrži multiple intragenomske 16S rRNK varijante genske sekvence, ukazujući na nedovoljnu pouzdanost 16S rRNK genske sekvence za identifikaciju na nivou vrste kod filamentoznih cijanobakterija (Engene i sar., 2010).

Pored identifikacije cijanobakterija na osnovu dobijenih sekvenci dalji zadatak je bio ispitivanje filogenetskih odnosa izolovanih sojeva i konstrukcija filogenetskog stabla u cilju utvrđivanja evolutivnih odnosa između 20 odabranih sojeva cijanobakterija. Na osnovu dobijenih rezultata, analizirani sojevi formirali su tri relativno dobro podržane grane (bootstraps 84, 67, 90, 68 i 81) u kojima su se predstavnici roda *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Calothrix* i *Nostoc* grupisali zajedno i dobijeni rezultati podudarali su se i sa identifikacijom dobijenom na osnovu morfoloških kriterijuma (Slika 42). Sojevi roda *Phormidium* su locirani u visoko podržanoj grani (bootstrap 91). Sojevi roda *Oscillatoria*, identifikovani na osnovu morfoloških karakteristika, takođe su se grupisali zajedno sa visokom vrednošću „podrške“ koja je u ovom slučaju iznosila 90. Pored pomenutih rodova, podržane grane dobijene su i u slučaju roda *Nostoc* (bootstrap 81), *Calothrix* (bootstrap 68) i *Lyngbya* (bootstrap 67).

Međutim, zbog lošeg kvaliteta i nemogućnosti poravnavanja sa preostalim sekvencama i nemogućnosti programa da izračuna filogenetsko stablo sekvence za soj *Anabaena* M2 i soj *Cylindrospermum* K1 nisu prikazane na filogenetskom stablu (sve sekvence se nalaze u Prilogu 3, Tabela 20). Takođe, sekvence dva soja, *Nostoc* M1 i *Tolypothrix* K11, se nisu grupisale na stablu sa preostalim predstavnicima datih rodova. U slučaju soja *Tolypothrix* K15 dobijeno je najveće odstupanje na stablu s obzirom da se dati soj ponaša kao outgroup odnosno sekvenca pokazuje dovoljnu različitost, ali i sličnost sa preostalim sekvencama. Međutim, imajući u vidu da su sve dobijene sekvence za deo 16S rRNK gena kod svih sojeva veoma kratke dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima drugih autora koji ukazuju na to da slaba rezolucija 16S rRNK analize sekvenci može nastati usled kratke dužine dobijenih produkata amplifikacije/umnožavanja (359 bp) (Nübel i sar., 1997; Foster i Zehr, 2006).



Slika 42. Filogenetsko stablo izolovanih sojeva bazirano na delu 16S rRNK genske sekvence.  
Distanca određena Neighbour Joining metodom, 1000 replikacija

Pored toga, za razliku od 16S rRNK gena i filogenetskih odnosa izračunatih na osnovu jednog gena korišćenjem relativno kratkih sekvenci, filogenetski odnosi zasnovani na upotrebi nekoliko povezanih ribozomalnih proteina koji sadrže stotine aminokiselina efikasni su za detekciju čak i slabih filogenetskih signala (Gadagkar i sar., 2005). Upravo zbog toga, housekeeping geni *rpoC1* i *rpoB* koji kodiraju gama i beta subjedinicu RNK polimeraze, i *gyrB* gen koji kodira beta subjedinicu DNK žiraze sve više se koriste kao genetički markeri za prokariote pored 16S rRNK gena (Seo i Yokota, 2003; Tanabe i sar., 2007; Cheon i sar., 2012). Pored toga, za razliku od 16S rRNK gena za koje je utvrđeno da se mogu javljati u više varijabilnih kopija housekeeping geni (npr. *rpoC1*) nalaze se u samo jednoj kopiji po genomu. S obzirom da su prisutni u samo jednoj kopiji, housekeeping geni predstavljaju dobre kandidate za identifikaciju i razgraničavanje filamentoznih cijanobakterija na nivou vrsta (Engene i sar., 2010). Takođe, genetička varijabilnost housekeeping gena može se koristiti za povećanje filogenetske rezolucije i opisivanje rodova do nivoa vrsta (Ma i sar., 2004). U slučaju filamentoznih azotofiksirajućih rodova *Nostoc* i *Anabaena*, DNK sekvence *nifH* gena mogu da budu izuzetno korisne za razgraničavanje i utvrđivanje evolutivnih odnosa između datih rodova (Tamaš i sar., 2000).

Takođe, jedan od poželjnijih pristupa prilikom utvrđivanja diverziteta, zajedno sa sekvencioniranjem celog genoma, predstavlja multilokusno sekvencioniranje (MLST), to jest analiza sekvenci višestrukih gena (Lodders i sar., 2005; Tanabe i sar., 2007; Ghebremedhin i sar., 2008). U većini slučajeva MLST, pokazano je da housekeeping geni predstavljaju efikasne genetičke markere za ove analize (Salerno i sar., 2007; Ghebremedhin i sar., 2008; Guo i sar., 2008). Upravo zbog toga, svakako da bi u budućnosti bilo potrebno uraditi utvrđivanje filogenetskih odnosa izolovanih sojeva na osnovu odabranih ribozomalnih proteina povezanih u nizu u cilju tačnije identifikacije taksonomske pozicije, kao i njihovih filogenetskih odnosa. Takođe, važno je napomenuti da je taksonomija cijanobakterija i dalje nezadovoljavajuća s obzirom da molekularna filogenija ne podržava uvek monofiletsku evoluciju svih grupa (Zehr i sar., 2000; Henson i sar., 2004). Zbog kompleksnosti, taksonomija cijanobakterija treba da se bazira na kombinovanju morfoloških, molekularnih i ekofizioloških podataka (Komárek, 2006; Komárek i sar., 2014; Komárek, 2016). Pored toga, poslednji kriterijum odnosno ekofiziološki podaci podjednako su važni s obzirom na značaj uticaja staništa na metabolizam i morfologiju cijanobakterija (Garcia-Pichel i sar., 1998; Komárek, 2006). Na primer, u mnogim prirodnim populacijama vrsta *Anabaena flos-aquae* – *Anabaena spiroides* pokazano je zajedničko pojavljivanje regularnih i iregularnih spiralno uvijenih trihoma (Zapomělová i sar., 2008). Analize 16S rRNK, *rpoB* i *rbcLX* gena pokazale su visoku sličnost sekvenci kod morfo-vrsta *Anabaena* sa ravnim i spiralno uvijenim trihomima (Rajaniemi i sar., 2005). Upravo zbog toga, prisustvo ili odsustvo uvijanja trihoma i njegova pravilnost i dalje se smatraju važnim kriterijumom za definisanje vrsta roda *Anabaena*, prateći tradicionalnu klasifikaciju (Geitler, 1932; Starmach, 1966; Komárek, 1996).

Shodno svemu navedenom i imajući u vidu nedovoljnu dužinu dobijenih sekvenci za preciznije utvrđivanje izolovanih sojeva do nivoa vrste i utvrđivanja filogenetskih odnosa, neophodnost upotrebe i drugih gena kao što su housekeeping geni za identifikaciju filamentoznih cijanobakterija do nivoa vrste, taksonomsku kompleksnost identifikacije cijanobakterija, nazivi 20 sojeva odabranih za dalju ekofiziološku karakterizaciju u tekstu koji sledi zasnivaju se na morfološkoj pripadnosti odgovarajućem rodu. Drugim rečima, u ovom radu identifikacija

sojeva bazirana je prvenstveno na osnovu morfološki taksonomski važnih odlika rodova i nazivi sojeva vezani su za različito poreklo.

#### 4.3. Uticaj azota na produkciju biomase i sadržaj fikobiliproteinskih pigmenata

U cilju dobijanja podataka o osnovnim karakteristikama rasta 20 odabranih sojeva određena je produkcije biomase u funkciji vremena. Pored toga, ujedno je praćen i uticaj azota na rast i produkciju biomase pri čemu su svi sojevi gajeni u medijumu sa azotom (BG +N) i medijumu bez azota (BG -N). Na osnovu dobijenih vrednosti formirane su krive rasta kao osnovno ekofiziološko svojstvo specifično za svaki soj (Prilog 4, Grafici 1-20).

Među ispitivanim sojevima najveća produkcija biomase zabeležena je 42. dana kod soja *Calothrix* M2 izolovanog sa Fruške gore koja je iznosila 2967,47  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 22). Pored pomenutog soja, značajna produkcija biomase, iznad 2000  $\mu\text{g/ml}$ , zabeležena je i kod sojeva *Oscillatoria* M2 (2772,68  $\mu\text{g/ml}$ ), *Phormidium* M1 (2726,95  $\mu\text{g/ml}$ ), *Nostoc* SP5 (2542,21  $\mu\text{g/ml}$ ) i *Calothrix* SP2 (2125,67  $\mu\text{g/ml}$ ) izolovanih sa lokaliteta Fruška gora i Stara planina. Pomenuti sojevi koji su ostvarili produkciju biomase preko 2 mg/ml predstavljaju visoko produktivne sojeve. Srednje produktivnim sojevima pokazalo se 5 sojeva (*Oscillatoria* T18, *Nostoc* T7, *Oscillatoria* SP2, *Anabaena* M2 i *Nostoc* M1) kod kojih je produkcija biomase bila veća od 1000  $\mu\text{g/ml}$  to jest kretala se u opsegu između 1 i 2 mg/ml. Kod soja *Oscillatoria* T18 poreklom sa lokaliteta Tara produkcija biomase bila je 1593,83  $\mu\text{g/ml}$ , dok je u slučaju drugog soja izolovanog sa istog lokaliteta, *Nostoc* T7, ostvarena produkcija biomase od 1126,35  $\mu\text{g/ml}$ . U slučaju soja *Oscillatoria* SP2 (Stara planina) zabeležena produkcija biomase iznosila je 1409,21  $\mu\text{g/ml}$ . U slučaju preostala dva soja izolovanih sa lokaliteta Fruška gora (*Anabaena* M2 i *Nostoc* M1), dobijene su sledeće vrednosti 1449,86  $\mu\text{g/ml}$  i 1156,84  $\mu\text{g/ml}$ .

Za razliku od napred navedenih sojeva kod kojih su zabeležene vrednosti produkcije biomase bile iznad 2000  $\mu\text{g/ml}$  odnosno 1000  $\mu\text{g/ml}$ , u slučaju 7 sojeva produkciju biomase bila je niža i kretala se u opsegu od 500  $\mu\text{g/ml}$  do 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Među datim sojevima, kod soja *Anabaena* SP2 izolovanog sa Stare planine dobijena vrednost produkcije biomase iznosila je 918,02  $\mu\text{g/ml}$ . U slučaju cijanobakterijskog soja *Cylindrospermum* K1 poreklom sa lokaliteta Kopaonik registrovana vrednost produkcije biomase iznosila je 834,35  $\mu\text{g/ml}$ . Kod dva soja, *Nostoc* T18 i *Phormidium* K15, produkcija biomase bila je 780,82  $\mu\text{g/ml}$  i 701,22  $\mu\text{g/ml}$ , dok je za soj *Lyngbya* K10 dobijena vrednost iznosila 649,56  $\mu\text{g/ml}$ . Kod preostala dva soja izolovanih sa lokaliteta Tara, dobijene vrednosti za produkciju biomase iznosile su 533,87  $\mu\text{g/ml}$  (*Phormidium* T11) i 521,00  $\mu\text{g/ml}$  (*Lyngbya* T7). U slučaju preostalih sojeva (*Nostoc* K15 i *Tolypothrix* K15) konstatovana je znatno niža produkcija biomase (333,67  $\mu\text{g/ml}$  i 211,72  $\mu\text{g/ml}$ ).

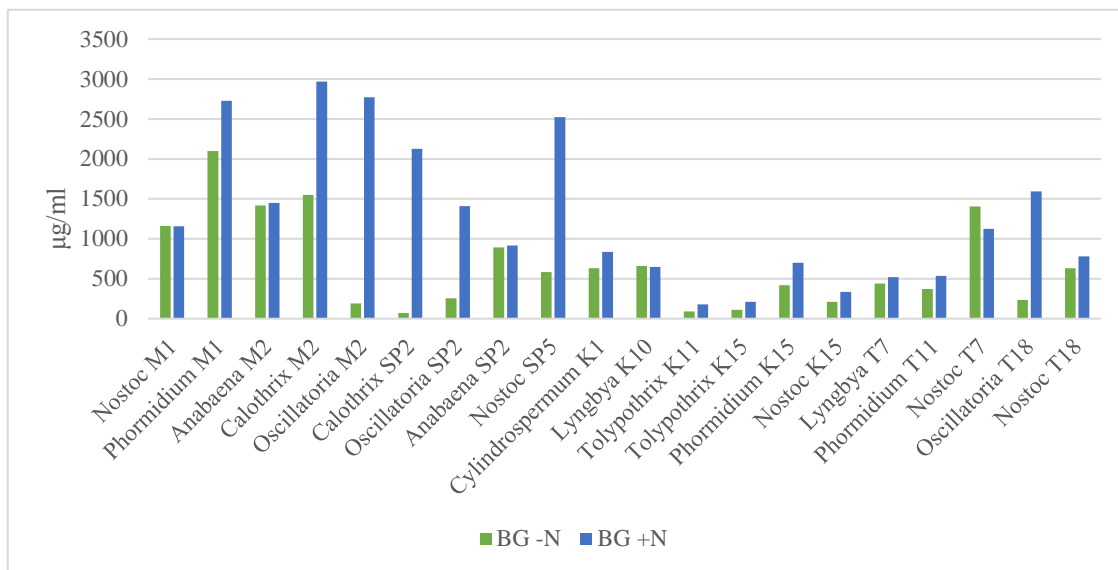
Tabela 22. Produkcija biomase kod terestričnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema na području Republike Srbije

Biomasa	µg/ml						
Testirani soj	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan	35. dan	42. dan	50. dan
<b><i>Nostoc M1</i></b>							
BG -N	98,24	299,79	689,36	<u>1160,22</u>	962,05	911,24	601,28
BG +N	123,64	221,88	497,96	701,21	880,75	<u>1156,84</u>	237,13
<b><i>Phormidium M1</i></b>							
BG -N	81,3	226,96	265,92	<u>2098,57</u>	370,93	99,93	0
BG +N	59,28	238,82	491,19	1129,74	1895,32	<u>2726,95</u>	2225,6
<b><i>Oscillatoria M2</i></b>							
BG -N	94,85	152,44	<u>193,09</u>	99,93	38,95648	5,08	3,39
BG +N	59,28	350,61	1224,59	1482,04	<u>2772,68</u>	1341,46	1148,37
<b><i>Calothrix M2</i></b>							
BG -N	89,77	347,22	381,1	<u>1549,79</u>	1332,99	1082,31	1026,42
BG +N	74,52	342,14	362,46	1676,82	1913,95	<u>2967,47</u>	553,86
<b><i>Anabaena M2</i></b>							
BG -N	74,52	133,81	199,86	565,71	1185,63	<u>1415,98</u>	1388,2
BG +N	115,17	193,09	452,23	896	1014,56	<u>1449,86</u>	599,59
<b><i>Oscillatoria SP2</i></b>							
BG -N	128,72	211,72	<u>255,76</u>	54,2	10,16	0	0
BG +N	193,09	321,81	968,83	1058,6	<u>1409,21</u>	1102,64	1039,97
<b><i>Calothrix SP2</i></b>							
BG -N	23,71	40,65	44,04	<u>71,14</u>	5,08	0	0
BG +N	3,39	81,30	169,38	250,68	1222,89	<u>2125,67</u>	1045,05
<b><i>Anabaena SP2</i></b>							
BG -N	74,52	143,97	304,88	<u>892,61</u>	633,47	513,21	409,89
BG +N	147,36	152,44	860,43	<u>918,02</u>	472,56	426,83	382,79
<b><i>Nostoc SP5</i></b>							
BG -N	175,30	223,58	321,98	303,52	478,15	540,65	<u>585,02</u>
BG +N	187,33	380,25	487,80	573,34	641,76	<u>2524,21</u>	319,27
<b><i>Nostoc T7</i></b>							
BG -N	254,06	357,38	570,80	653,79	<u>1404,13</u>	604,67	486,04
BG +N	245,59	391,26	511,51	<u>1126,35</u>	984,07	724,93	103,32
<b><i>Lyngbya T7</i></b>							
BG -N	98,75	154,81	230,69	<u>440,88</u>	299,63	110,43	98,78
BG +N	97,22	200,71	401,42	<u>521,00</u>	342,31	204,94	152,27
<b><i>Phormidium T11</i></b>							
BG -N	86,89	120,26	137,19	189,19	<u>372,80</u>	237,46	199,86
BG +N	91,46	123,30	246,78	323,34	365,51	<u>533,87</u>	378,22
<b><i>Oscillatoria T18</i></b>							
BG -N	208,33	<u>235,43</u>	191,39	177,84	37,26	5,08	0
BG +N	169,38	565,71	630,08	892,61	<u>1593,83</u>	918,02	181,23
<b><i>Nostoc T18</i></b>							
BG -N	101,62	204,94	482,72	<u>630,09</u>	567,40	362,46	359,08

BG +N	60,97	171,07	330,28	740,17	<u>780,82</u>	746,95	470,86
<b><i>Cylindrospermum K1</i></b>							
BG -N	89,60	158,20	371,61	379,06	505,08	<u>633,47</u>	517,10
BG +N	97,39	171,41	201,73	289,80	307,76	<u>834,35</u>	396,85
<b><i>Lyngbya K10</i></b>							
BG -N	140,07	315,89	<u>658,36</u>	439,70	326,99	215,11	97,56
BG +N	242,04	289,46	<u>649,56</u>	539,63	483,91	453,42	425,13
<b><i>Tolypothrix K11</i></b>							
BG -N	79,26	<u>89,42</u>	84,38	81,65	80,47	54,39	40,85
BG +N	90,87	124,86	159,52	<u>177,52</u>	131,92	68,55	52,37
<b><i>Tolypothrix K15</i></b>							
BG -N	10,16	42,34	54,20	<u>110,09</u>	88,07	72,83	42,27
BG +N	77,91	89,77	111,79	<u>211,72</u>	174,46	57,59	49,12
<b><i>Phormidium K15</i></b>							
BG -N	142,27	186,31	228,66	<u>420,05</u>	44,04	10,16	0
BG +N	72,83	145,66	343,83	<u>701,22</u>	225,27	142,27	55
<b><i>Nostoc K15</i></b>							
BG -N	1,69	23,71	108,40	120,26	<u>210,03</u>	152,44	55,89
BG +N	27,10	86,38	103,32	260,84	<u>333,67</u>	252,37	91,46

Na osnovu dobijenih vrednosti prikazanih u Tabeli 22 može se videti da je produkcija biomase u funkciji vremena ekofiziološko svojstvo specifično za svaki ispitanu cijanobakterijski soj. Takođe, većina testiranih cijanobakterijskih sojeva ostvarila je maksimalnu produkciju biomase nakon 21. dana kultivacije s obzirom da je kod samo jednog soja, *Lyngbya K10*, maksimalna produkcija biomase ostvarena 21. dana (Grafici prikazani u Prilogu 4). U slučaju 6 sojeva (*Anabaena SP2*, *Nostoc T7*, *Tolypothrix K15*, *Tolypothrix K11*, *Phormidium K15* i *Lyngbya T7*) maksimalna produkcija biomase zabeležena je 28. dana, dok je kod 6 sojeva (*Oscillatoria M2*, *Oscillatoria SP2*, *Nostoc T7*, *Nostoc T18*, *Oscillatoria T18*, *Nostoc K15*) maksimalna produkcija biomase ostvarena 35. dana. Kod najvećeg broja sojeva, tačnije osam sojeva (*Nostoc M1*, *Anabaena M2*, *Calothrix M2*, *Phormidium M1*, *Calothrix SP2*, *Nostoc SP5*, *Phormidium T11* i *Cylindrospermum K1*), maksimalna produkcija biomase zabeležena je 42. dana kultivacije, to jest rast biomase je bio kontinualan (Grafici 1-20 prikazani u Prilogu 4).

U odnosu na uticaj azota na produkciju biomase, kod svih sojeva, veća produkcija biomase zabeležena je u medijumu sa  $\text{NaNO}_3$  kao izvorom N (Grafici prikazani u Prilogu 4). U slučaju azotofiksirajućih sojeva u većini slučajeva prisustvo azota pospešilo je rast i produkciju biomase (*Calothrix M2*, *Calothrix SP2*, *Nostoc SP5*, *Cylindrospermum K1*, *Tolypothrix K15*, *Nostoc K15*, *Nostoc T18*) i kod samo tri soja (*Nostoc M1*, *Anabaena M2*, *Anabaena SP2*) produkcija biomase bila je slična u podlozi sa azotom i bez azota. Jedini soj kod koga je uočen slabiji rast u medijumu sa azotom u odnosu na medijum bez dodatka  $\text{NaNO}_3$  bio je *Nostoc T7* (Grafik 21). U slučaju neheterocistnih, neazotofiksirajućih sojeva u odsustvu  $\text{NaNO}_3$  u medijumu došlo je do značajnog pada produkcije biomase i ugibanja sojeva tokom kasnijih faza rasta. Pored smanjenja produkcije biomase, u slučaju nedostatka azota u medijumu neazotofiksirajući sojevi daleko ranije su ulazili u eksponencijalnu fazu (uglavnom 14. dan) ukazujući da neazotofiksirajući sojevi poseduju manju sposobnost preživljavanja u uslovima bez azota (Grafici prikazani u Prilogu 4).



Grafik 21. Maksimalna produkcija biomase kod testiranih sojeva u zavisnosti od prisustva i odsustva azota tokom kultivacije

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa prethodnim studijama koje su pokazale da fiksacija azota nije uobičajno svojstvo neheterocistnih cijanobakterija i poznat je samo mali broj neheterocistnih sojeva sa sposobnošću usvajanja atmosferskog azota (Bergman i sar., 1997). Na primer, iz sveobuhvatne liste cijanobakterijskih sojeva koji se nalaze u okviru kolekcije kultura cijanobakterija Pasterovog Instituta u Parizu, manje od 40% neheterocistnih sojeva cijanobakterija pokazalo je sposobnost azotofiksacije (Rippka i sar., 1979). Pored toga, sposobnost neheterocitnih cijanobakterija da usvajaju  $N_2$  najčešće se dešava isključivo u anoksičnim ili mikrooksičnim uslovima u toku noći (Bergman i sar., 1997).

Pored toga, Zapomělová i sar. (2008) su istakli da zemljišne cijanobakterije ispoljavaju različit odgovor na variranje koncentracije azota u odnosu na planktonske vrste cijanobakterija zbog činjenice da na koncentraciju azota u zemljištu utiču mnogobrojni faktori (Kleinhenz i sar., 1997; Beier i Eckerstenb, 1998; Liu i Chen, 2003; Liu i sar., 2003). Shodno tome, regulacija formiranja heterocista kod terestričnih cijanobakterija veoma je važna za adaptaciju na brze promene koje se dešavaju u uslovima spoljašnje sredine (Zapomělová i sar., 2008). Za razliku od terestričnih sredina, promene u koncentraciji azota manje su izražene u vodenoj sredini (Coveney i sar., 2002; Rekolainen i sar., 2005). Prema Muro-Pastor i sar. (2005)  $NH_4^+$  predstavlja direktan izvor azota koji se može inkorporirati u biomasu preko glutamin/glutamat sintaze. Pored toga, Galmozzi i sar. (2007) su istakli da koncentracija  $NH_4^+$  bitno utiče na rast i produkciju biomase kod cijanobakterija s obzirom da je u slučaju soja *Cyanothece* 51142 uočen rast samo na nižim koncentracijama  $NH_4^+$  zbog inhibitornog efekta viših koncentracija. U ovom radu, kao izvor azota korišćen je  $NaNO_3$  i svi testirani sojevi ispoljili su sposobnost usvajanja  $NO_3^-$ . Odnosno, inhibitorni efekti nitrata na rast i produkciju biomase nisu uočeni. Štaviše, prisustvo azota u medijumu doprinelo je povećanju produkcije biomase kod 95% sojeva sa izuzetkom soja *Nostoc* T7.

U slučaju uticaja azota na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina, kod većine sojeva prisustvo azota doprinelo je povećanju sadržaja APC, PE i PC dok je kod dva azotofiksirajuća soja (*Nostoc* M1, *Tolypothrix* K15) sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina bio veći u uslovima



kultivacije bez prisustva azota u medijumu (Prilog 4 Tabela 23). Maksimalne zabeležene koncentracije pojedinačnih fikobiliproteina bile u opsegu od 0,0017 mg/ml (*Phormidium* M1) do 0,2053 mg/ml (*Nostoc* SP5) u slučaju fikoeritina, od 0,0061 mg/ml (*Lyngbya* K10) do 0,1429 mg/ml (*Calothrix* SP2) u slučaju alofikocijanina, od 0,0023 mg/ml (*Oscillatoria* M2) do 0,1057 mg/ml (*Nostoc* T7) u slučaju fikocijanina. Dobijeni rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima Simeunović i sar. (2013) koji su pokazali da su se kvalitativni i kvantitativni sadržaji ukupnih i pojedinačnih fikobilinskih pigmenata razlikovali kod testiranih filamentoznih cijanobakterija ukazujući na specifičnost pigmentnog sastava svakog ispitivanog soja. Na osnovu dobijenih rezultata, većina sojeva roda *Nostoc* pokazali su veći sadržaj fikobiliproteina u poređenju sa pripadnicima roda *Anabaena* tokom različitih faza rasta. Simeunović i sar. (2013) su istakli da iako su pomenuta dva roda filogenetski veoma bliska (Schirrmeister i sar., 2011), distribucija fikobiliproteina bila je različita među ispitivanim sojevima roda *Nostoc* i roda *Anabaena*.

Pored toga, promene u sadržaju pojedinačnih fikobiliproteina tokom različitih faza rasta detektovane su kod svih ispitivanih sojeva ukazujući da je sadržaj fikobiliproteina soj-specifično svojstvo na koje utiče faza rasta. Kod 4 soja (*Phormidium* M1, *Oscillatoria* M2, *Anabaena* SP2, *Calothrix* SP2) maksimalan sadržaj pigmenata postignut je 28. dana kultivacije dok je kod 5 sojeva (*Nostoc* M1, *Anabaena* M2, *Nostoc* T7, *Nostoc* K15 i *Tolypothrix* K11) maksimalan sadržaj pojedinačnih pigmenata bio najveći 35. dana kultivacije. U slučaju preostalih sojeva (*Phormidium* K15, *Tolypothrix* K15, *Lyngbya* K10, *Cylindrospermum* K1, *Lyngbya* T7, *Phormidium* T11, *Oscillatoria* T18, *Nostoc* SP5 i *Calothrix* M2) sadržaj fikobiliproteina bio je najveći 42. dana kultivacije.

U ovom radu primećene razlike u koncentraciji i sastavu fikobiliproteina u medijumu sa i bez azota ukazuje na to da dostupnost azota utiče na sastav i sadržaj fikobiliproteina kod svih sojeva (Prilog 4 Tabela 23) što je u saglasnosti sa rezultatima Simeunović i sar. (2013). Kod većine testiranih sojeva, na početku perioda kultivacije, proizvodnja fikobiliproteina povećana je u medijumu sa azotom. Dobijeni rezultati ukazuju da prisustvo azota u podlozi može povećati sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina. Na osnovu prikazanih rezultata, najviše zabeležene vrednosti za fikoeritin (PE), kao i fikocijanin (PC) dobijeni su u podlozi sa azotom kod cijanobakterijskih sojeva *Nostoc* SP2 i *Anabaena* SP2. Ovi rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Simeunović i sar. (2012), koji su pokazali da je sadržaj fikoeritina bio najviši kod dva soja roda *Nostoc* i *Anabaena* koji su gajeni u medijumu sa  $\text{NaNO}_3$  kao izvorom azota. Soltani i sar. (2007) takođe su pokazali da je u slučaju cijanobakterije *Fischerella* produkcija fikobiliproteina veća u prisustvu nitrata u odnosu na uslove gajenja bez azota.

Takođe, tokom stacionarne faze rasta, sposobnost azotofiksacije može prouzrokovati porast koncentracije plavih pigmenata (PC i APC) kod heterocistnih sojeva. Simeunović i sar. (2013) su pokazali da promene sadržaja PC i APC značajno zavise od izvora azota za razliku od PE sadržaja, kao i da je sposobnost azotofiksacije značajno uticala na povećanje koncentracije APC i PC kod većine sojeva. U ovom radu koncentracija alofikocijanina (APC) (0.0164 mg / mL) bila je najviša kod soja *Nostoc* M1 (35. dan) gajenog u medijumu bez azota. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih istraživanja koja su pokazala da heterocistne, azotofiksirajuće cijanobakterije pokazuju veći sadržaj fikobiliproteina u odsustvu azota. Hifney i sar. (2012) su utvrdili da su koncentracije fikobiliproteina (fikocijanina, alofikocijanina i fikoeritina) bile povišene u uslovima nedostatka azota, fosfora i sumpora, kao i da prisustvo

HCl (0,3 i 0.6M) takođe povećava proizvodnju fikobiliproteina. U studiji Hemlata i Fatma (2009), u slučaju soja *Anabaena* NCCU-9 takođe je zabeležena najveća produkcija fikobiliproteina u uslovima gajenja bez azota. Do sličnih rezultata došli su i Loreto i sar. (2003), koji su pokazali da je soj *Anabaena* 7120 kultivisan u sredini bez azota imao daleku veću produkciju fikobiliproteina u odnosu na isti soj uzgajan u sredini sa azotom. Tandeau de Marsac i sar. (1996) takođe su uočili da je u slučaju soja *Calothrix* PCC 7601 prisustvo odnosno odsustvo azota u medijumu značajno uticalo na sadržaj fikobilina. Schwarz i sar. (2006) su istakli da nivo fikocijanina (PC) odražava ravnotežu između stope sinteze i degradacije ovog antena pigmenta tokom perioda „gladovanja“ s obzirom da predstavlja glavnu komponentu fikobilizoma.

U slučaju oksigenih fototrofa, pigmenti predstavljaju jedne od najčešće korišćenih markera (Dijkman i sar., 2010). Pored species-specifičnih razlika, varijacije u pigmentom sastavu takođe mogu da nastanu i usled uticaja spoljašnje sredine i stresnih uslova poput intenzivne radijacije, UV-zračenja ili isušivanja (Potts i sar., 1987; Ehling-Schulz i sar., 1997). Singh i sar. (2012) su istakli da na proizvodnju fikobiliproteina utiču brojni faktori poput dostupnosti hranljivih sastojaka, intenziteta svetlosti, talasne dužine svetlosti, temperature (Prassana i sar., 2004), prisustva toksičnih jedinjenja, pH vrednosti medijuma, kao i njihove međusobne kombinacije. Kao odgovor na različite signale iz životne sredine, cijanobakterije mogu regulisati sadržaj i sastav tetrapirola (Prassana i sar., 2004). Tamary i sar. (2012) su pokazali da rearanžiranje PBS antena pigmentata u stresnim uslovima prouzrokovanim visokom radijacijom može dovesti do njihove degradacije, koja se verovatno dešava i u uslovima nedostatka azota/fosfora kada dolazi do njihove razgradnje (Grossman i sar., 1993). Degradacijom fikobiliproteina mogu se obezbediti aminokiseline neophodne za sintezu osnovnih proteina u uslovima nedostatka nutrijenata s obzirom da fikobiliproteini predstavljaju znatan deo ukupnih rastvorljivih proteina (Ughyt i Ajlani, 2004). Takođe je važno napomenuti da su svi ispitivani cijanobakterijski sojevi koji su izolovani iz različitih šumskih ekosistema uzgajani u stalnim i uobičajenim uslovima gajenja. S obzirom na to da su svi testirani sojevi u svojim prirodnim staništima često izloženi promenama faktora životne sredine, uticaj različitih faktora na proizvodnju fikobiliproteina od velikog je značaja za buduća istraživanja i analize imajući u vidu činjenicu da dati faktori (promena temperature, svetlosnog režima, i dr.) mogu imati veliki uticaj na proizvodnju fikobiliproteina.

#### 4.4. Ispitivanje mikсотrofnog rasta – određivanje uticaja glukoze i saharoze na produkciju biomase i sadržaj fikobiliproteinskih pigmenata

U cilju utvrđivanja sposobnosti usvajanja organskog izvora ugljenika u vidu monosaharida (glukoze) i disaharida (saharoze), ispitan je njihov uticaj na produkciju biomase i fikobiliproteinskih pigmenata kod 20 cijanobakterijskih sojeva. Mikсотrofni uslovi rasta predstavljaju tip rasta gde se CO<sub>2</sub> i organski ugljenik u prisustvu svetla simultano asimiliraju pri čemu se respiracija i fotosinteza odvijaju istovremene (Lee, 2004). U aerobnim uslovima, ugljenični supstrati predstavljaju ključne faktore koji kontrolišu efikasnost rasta cijanobakterija (Reddy i sar., 1993; Berman-Frank i sar., 2003; Tamagnini i sar., 2007). Od ugljenih hidrata, najčešće korišćeni izvor ugljenika je glukoza dok glicerol i piruvat predstavljaju derivate lipida i organskih kiselina iz centralnih metaboličkih puteva (Feng i sar., 2010). U ovom radu korišćene su dve različite koncentracije glukoze i saharoze (1,5 g/L i 3 g/L) i sposobnost usvajanja ugljenih hidrata praćena je tokom 35. dana kultivacije.

U slučaju glukoze, svi testirani sojevi ispoljili su različitu sposobnost usvajanja glukoze (Tabela 24). Prisustvo glukoze u medijumu pospešilo je rast i produkciju biomase kod nekih sojeva dok je kod drugih sojeva produkcija biomase bila veća u kontrolnom medijumu, mineralnoj podlozi BG11 bez dodatka glukoze. (Prilog 5 Grafici 22-41). Među sojevima kod kojih je uočena favorizacija rasta u prisustvu glukoze takođe je pokazano i da koncentracija glukoze značajno utiče na produkciju biomase. U slučaju tri soja roda *Nostoc* (*Nostoc* T7, *Nostoc* T18 i *Nostoc* K15) sa povećanjem koncentracije glukoze u medijumu uočeno je proporcionalno povećanje produkcije biomase. Najveći rast zabeležen je u prisustvu najviše koncentracije glukoze u podlozi u poređenju sa kontrolnim medijumom. Među datim sojevima, najveće povećanje produkcije biomase od 5,8 puta (1,5 g/L glukoze) i 8,71 puta (3 g/L glukoze) zabeleženo je kod soja *Nostoc* T18. Ujedno, najveća produkcija biomase od 2427,16 µg/ml i 3644,97 µg/ml dobijena je upravo kod soja *Nostoc* T18 kultivisanog u medijumu sa glukozom u poređenju sa svim testiranim sojevima. U slučaju soja *Nostoc* T7 povećanje produkcije biomase u odnosu na kontrolni medijum (386,18 µg/ml) iznosilo je 2,32 puta (895,99 µg/ml) i 2,78 puta (1075,54 µg/ml) odnosno kod soja *Nostoc* K15 dobijene vrednosti bile su 1,92 puta (376,69 µg/ml) i 3,11 puta (615,51 µg/ml) veće u odnosu na medijum bez dodatka glukoze (198 µg/ml).

Sa druge strane, u slučaju 4 soja, prisustvo glukoze u podlozi pospešilo je rast sojeva, ali je veća produkcija biomase uočena pri nižoj koncentraciji glukoze (1,5 g/L). Kod datih sojeva, povećanje produkcije biomase nije bilo proporcionalno sa povećanjem koncentracije glukoze u medijumu. Kod soja *Nostoc* M1 uočeno je povećanje od 4,51 puta 28. dana i dobijena vrednost biomase od 2117,2 µg/ml ukazuje da pored soja *Nostoc* T18 kod koga je dobijena najveća vrednost za produkciju biomase (2427,16 µg/ml) glukoza značajno favorizuje rast i drugih sojeva iz roda *Nostoc*. Kod soja *Nostoc* M1, u prisustvu glukoze pri koncentraciji 3 g/L povećanje produkcije biomase je iznosilo 1,99 (933,26 µg/ml) puta u odnosu na kontrolni medijum (469,17 µg/ml). Kod dva soja, *Anabaena* SP2 i *Tolypothrix* K15, pri koncentraciji od 1,5 g/L glukoze uočeno je slično povećanje produkcije biomase od 1,87 puta (649,89 µg/ml) i 1,85 puta (191,39 µg/ml) odnosno 1,06 puta (367,54 µg/ml) i 1,04 puta (107,55 µg/ml) pri koncentracije glukoze od 3g/L u odnosu na kontrolni medijum (347,39 µg/ml i 103,32 µg/ml).

Sa druge strane, u slučaju preostalih 11 sojeva najveća produkcija biomase uočena je u kontrolnim uslovima, mineralnoj podlozi BG11 bez dodatka glukoze. Kod 7 sojeva, produkcija biomase proporcionalno se smanjivala sa povećanjem koncentracije glukoze u medijumu. Najveće smanjenje produkcije biomase uočeno je kod soja *Calothrix* SP2 koje je iznosilo 5,67 puta (60,97 µg/ml) i 1,76 puta (196,48 µg/ml) i kod soja *Cylindrospermum* K1 koje je iznosilo 4,83 puta (180,89 µg/ml) i 2,31 puta (377,03 µg/ml), u odnosu na rast istih sojeva u medijumu bez glukoze (345,53 µg/ml i 872,96 µg/ml). Veći pad produkcije biomase od 3,73 puta (168,70 µg/ml) i 3,71 puta (169,38 µg/ml) odnosno 3,45 puta (132,79 µg/ml) i 2,54 puta (180,38 µg/ml) zabeležen je i kod sojeva *Phormidium* T11 i *Lyngbya* T7 u uslovima prisustva glukoze u odnosu na produkciju biomase u medijumu bez dodatka glukoze (628,55 µg/ml i 458,67 µg/ml). Kod soja *Tolypothrix* K11 produkcija biomase bila je 1,22 puta manja (143,29 µg/ml) odnosno 2,07 puta manja (84,69 µg/ml) u medijumu sa glukozom u odnosu na kontrolni medijum (175,30 µg/ml). Kod preostala dva soja, *Calothrix* M2 i *Oscillatoria* SP2, smanjenje produkcije biomase iznosilo je 1,54 puta (235,43 µg/ml) i 2,03 puta (178,86 µg/ml) odnosno 1,22 puta (620,42 µg/ml) i 1,43 puta (527,77 µg/ml) u uslovima kultivacije sa glukozom u odnosu na vrednosti dobijene za iste sojeve gajene u medijumu bez glukoze (362,97 µg/ml i 754,57 µg/ml).

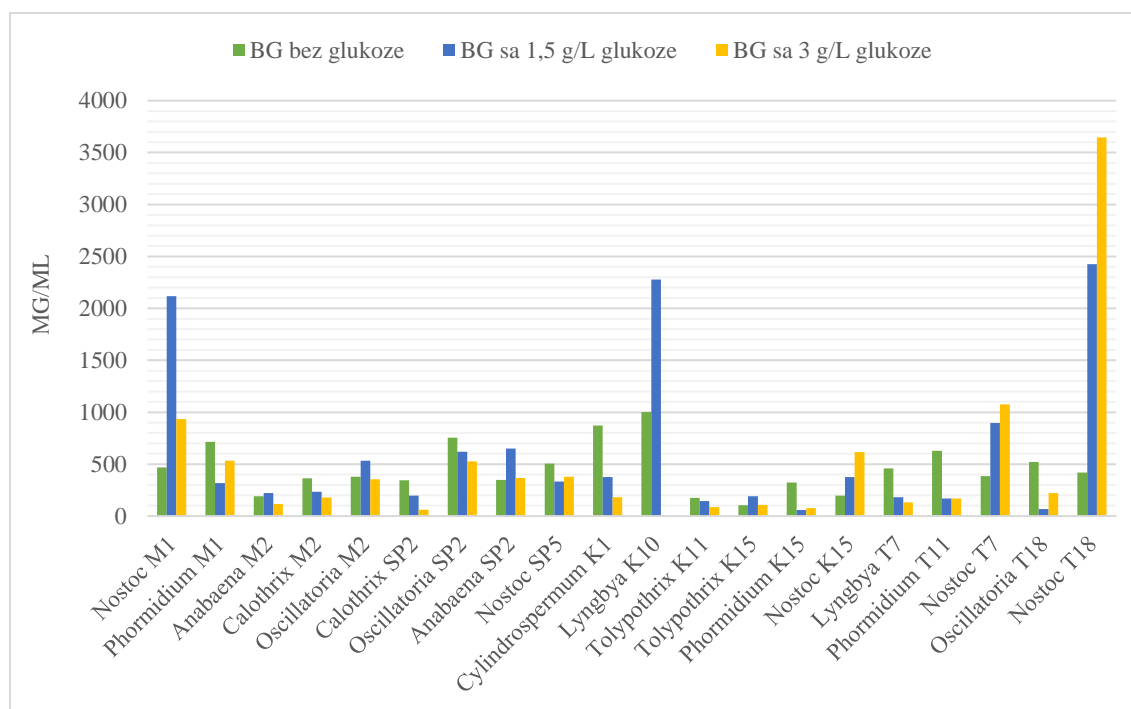
Tabela 24. Uticaj glukoze na produkciju biomase kod testiranih terestričnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema

Testirani soj	7. dan µg/ml	14. dan µg/ml	21. dan µg/ml	28. dan µg/ml	35. dan µg/ml
<b><i>Nostoc</i> M1</b>					
BG-N bez glukoze	99,93	149,05	<u>469,17</u>	414,97	226,96
BG-N sa 1,5 g/L glukoze	264,23	685,97	924,79	<u>2117,2</u>	1603,99
BG-N sa 3 g/L glukoze	321,81	<u>933,26</u>	684,28	652,10	613,14
<b><i>Phormidium</i> M1</b>					
BG+N bez glukoze	179,54	235,43	241,70	<u>714,77</u>	508,47
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	37,26	84,69	282,52	<u>318,09</u>	292,00
BG+N sa 3 g/L glukoze	86,38	<u>533,53</u>	223,91	118,22	74,02
<b><i>Oscillatoria</i> M2</b>					
BG+N bez glukoze	3,39	127,03	237,29	<u>380,42</u>	356,87
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	121,95	181,23	388,04	<u>534,55</u>	184,45
BG+N sa 3 g/L glukoze	45,73	228,66	269,48	386,52	<u>354,84</u>
<b><i>Calothrix</i> M2</b>					
BG-N bez glukoze	30,49	160,91	288,45	<u>362,97</u>	240,68
BG-N sa 1,5g/L glukoze	11,86	<u>235,43</u>	160,06	120,59	78,59
BG-N sa 3 g/L glukoze	5,08	10,16	<u>178,86</u>	94,34	75,20
<b><i>Anabaena</i> M2</b>					
BG+N bez glukoze	37,26	45,73	79,61	128,89	<u>191,22</u>
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	6,77	<u>220,19</u>	109,25	108,74	129,91
BG+N sa 3 g/L glukoze	28,79	28,79	70,46	<u>116,02</u>	86,38
<b><i>Oscillatoria</i> SP2</b>					
BG+N bez glukoze	99,93	404,98	464,09	533,53	<u>754,57</u>
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	116,87	235,43	400,74	<u>620,42</u>	281,84
BG+N sa 3 g/L glukoze	23,71	145,66	284,21	<u>527,77</u>	463,75
<b><i>Calothrix</i> SP2</b>					

BG-N bez glukoze	152,44	160,91	<u>345,53</u>	243,90	240,51
BG-N sa 1,5 g/L glukoze	79,61	81,38	<u>196,48</u>	74,52	0
BG-N sa 3 g/L glukoze	<u>60,97</u>	40,65	33,87	23,71	0
<b>Anabaena SP2</b>					
BG-N bez glukoze	42,34	116,87	256,94	310,47	<u>347,39</u>
BG-N sa 1,5g/L glukoze	32,18	245,59	356,37	539,80	<u>649,89</u>
BG-N sa 3 g/L glukoze	186,31	<u>367,54</u>	345,36	313,68	158,70
<b>Nostoc SP5</b>					
BG-N bez glukoze	210,03	369,24	<u>504,74</u>	409,89	57,59
BG-N sa 1,5 g/L glukoze	267,61	271,00	286,24	<u>333,67</u>	210,03
BG-N sa 3 g/L glukoze	208,33	301,49	<u>379,40</u>	316,73	152,44
<b>Nostoc T7</b>					
BG-N bez glukoze	89,77	225,27	<u>386,18</u>	377,71	160,91
BG-N sa 1,5 g/L glukoze	113,48	333,67	<u>895,99</u>	613,14	470,86
BG-N sa 3 g/L glukoze	176,15	431,91	687,67	728,32	<u>1075,54</u>
<b>Lyngbya T7</b>					
BG+N bez glukoze	132,45	149,56	278,11	<u>458,67</u>	134,65
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	115,34	123,14	<u>180,38</u>	162,60	90,78
BG+N sa 3 g/L glukoze	88,75	<u>132,79</u>	119,24	99,42	94,00
<b>Phormidium T11</b>					
BG+N bez glukoze	32,18	138,89	296,07	<u>628,55</u>	565,88
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	16,94	<u>169,38</u>	159,04	131,10	94,34
BG+N sa 3 g/L glukoze	16,94	143,97	<u>168,70</u>	131,77	77,40
<b>Oscillatoria T18</b>					
BG+N bez glukoze	140,58	430,21	516,60	<u>521,68</u>	431,91
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	6,77	28,79	<u>66,06</u>	18,63	0
BG+N sa 3 g/L glukoze	60,97	116,87	<u>220,19</u>	120,26	0
<b>Nostoc T18</b>					
BG-N bez glukoze	67,75	169,38	264,27	360,77	<u>418,36</u>
BG-N sa 1,5 g/L glukoze	138,89	785,90	1539,63	<u>2427,16</u>	1703,92
BG-N sa 3 g/L glukoze	147,36	1189,02	1965,10	<u>3644,97</u>	2571,13
<b>Cylindrospermum K1</b>					
BG+N bez glukoze	22,02	394,31	465,78	502,54	<u>872,96</u>
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	47,42	121,95	279,98	280,32	<u>377,03</u>
BG+N sa 3 g/L glukoze	10,16	27,10	<u>180,89</u>	106,88	95,53
<b>Lyngbya K10</b>					
BG+N bez glukoze	284,55	413,28	535,23	<u>1002,71</u>	916,32
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	232,04	259,14	670,73	1561,98	<u>2276,41</u>
BG+N sa 3g/L glukoze	251,32	351,62	542,89	1100,8	1581,52
<b>Tolypothrix K11</b>					
BG+N bez glukoze	91,63	125,62	149,22	<u>175,30</u>	129,91
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	84,35	95,61	107,89	<u>143,29</u>	94,00
BG+N sa 3 g/L glukoze	80,45	<u>84,69</u>	78,76	77,91	74,69
<b>Tolypothrix K15</b>					
BG+N bez glukoze	23,71	37,26	66,73	73,68	<u>103,32</u>

BG+N sa 1,5 g/L glukoze	22,02	<u>191,39</u>	85,03	71,14	69,27
BG+N sa 3 g/L glukoze	20,32	30,49	<u>107,55</u>	80,28	74,86
<b>Phormidium K15</b>					
BG+N bez glukoze	54,20	127,03	<u>323,51</u>	130,42	99,93
BG+N sa 1,5 g/L glukoze	1,69	32,18	<u>59,28</u>	47,42	0
BG+N sa 3 g/L glukoze	1,69	60,97	<u>76,22</u>	8,47	0
<b>Nostoc K15</b>					
BG-N bez glukoze	8,47	8,47	157,18	161,75	<u>198,00</u>
BG-N sa 1,5g/L glukoze	1,69	50,56	311,31	332,82	<u>376,69</u>
BG-N sa 3 g/L glukoze	2,68	5,08	194,78	384,14	<u>615,51</u>

Na osnovu dobijenih rezultata, među testiranim sojevima najveća produkcija biomase zabeležena je u slučaju tri soja (*Nostoc* T18, *Lyngbya* K10 i *Nostoc* M1) gajenih u podlozi sa glukozom (Grafik 42). U slučaju sva tri soja produkcija biomase bila je veća od 2000 µg/ml. Sa druge strane, najmanja produkcija biomase u prisustvu glukoze u medijumu registrovana je kod soja *Phormidium* K15 (Grafik 42). U zavisnosti od sposobnosti usvajanja glukoze testirani cijanobakterijski sojevi mogu se podeliti u 4 grupe. U prvoj grupi se nalaze sojevi kod kojih je sa povećanjem glukoze došlo do proporcionalnog povećanja produkcije biomase (*Nostoc* T7, *Nostoc* T18, *Nostoc* K15). U drugoj grupi se nalaze sojevi kod kojih je takođe uočeno povećanje produkcije biomase u prisustvu glukoze u medijumu pri čemu povećanje produkcije biomase nije bilo proporcionalno sa koncentracijom glukoze (*Nostoc* M1, *Oscillatoria* M2, *Anabaena* SP2, *Tolypothrix* K15). Odnosno, veća produkcija biomase zabeležena je pri nižoj koncentraciji glukoze (1,5 g/L) u medijumu. U trećoj grupi nalaze se sojevi kod kojih je došlo do proporcionalnog pada produkcije biomase sa povećanjem koncentracije glukoze u medijumu (*Calothrix* SP2, *Calothrix* M1, *Oscillatoria* SP2, *Phormidium* T11, *Cylindrospermum* K1, *Lyngbya* T7 i *Tolypothrix* K11). U poslednjoj grupi nalaze se sojevi kod kojih je takođe u prisustvu glukoze došlo do smanjenja rasta, ali na obrnuto proporcionalan način odnosno veće smanjenje produkcije biomase uočeno je pri nižoj koncentracije glukoze (*Nostoc* SP5, *Phormidium* K15, *Oscillatoria* T18, *Phormidium* M1) (Grafik 42). Dobijeni rezultati ukazuju na različitu sposobnost miksotrofnog rasta testiranih sojeva kao i na to da sposobnost usvajanja glukoze predstavlja soj specifično svojstvo.



Grafik 42. Maksimalna produkcija biomase kod testiranih sojeva cijanobakterija u prisustvu različitih koncentracija glukoze

U slučaju uticaja glukoze na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina (APC, PE, PC) kod 20 testiranih cijanobakterijskih sojeva u većini slučajeva prisustvo glukoze u medijumu pospešilo je njihov sadržaj (Prilog 5 Tabela 25). Kod osam sojeva (*Nostoc* M1, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* SP2, *Anabaena* SP2, *Lyngbya* T7, *Nostoc* T18, *Lyngbya* K10, *Calothrix* M2) najveći sadržaj APC, PC i PE zabeležen je pri koncentraciji glukoze od 1,5 g/L pri čemu su maksimalne zabeležene koncentracije pojedinačnih fikobiliproteina bile u opsegu od 0,049 mg/ml (*Lyngbya* T7) do 1,037mg/ml (*Nostoc* M1) u slučaju fikocijanina, od 0,047 mg/ml (*Lyngbya* K10) do 0,384 mg/ml (*Nostoc* M1) u slučaju alofikocijanina. U slučaju 6 sojeva (*Calothrix* SP2, *Nostoc* SP5, *Oscillatoria* T18, *Cylandrospermum* K1, *Tolypothrix* K11, *Nostoc* K15) pri koncentraciji glukoze 3 g/L sadržaj APC, PC i PE bio je najveći. Maksimalne zabeležene koncentracije fikobiliproteina u prisustvu glukoze (3g/l) bile su u opsegu od 0,022 mg/ml (*Calothrix* SP2) do 0,259 mg/ml (*Nostoc* SP5) u slučaju fikocijanina, od 0,024 mg/ml (*Calothrix* SP2) do 0,094 mg/ml (*Cylandrospermum* K1) u slučaju alofikocijanina, od 0,022 mg/ml (*Cylandrospermum* K1) do 0,139 mg/ml (*Nostoc* SP5) u slučaju fikoeritina (Prilog 5 Tabela 25). Pored toga, među testiranim sojevima kod kojih je prisustvo glukoze u medijumu pospešilo rast, kod 5 sojeva uočeno je kontinuirano povećanje sadržaja pojedinačnih fikobiliproteina i maksimalan sadržaj postignut je 35. dana kultivacije (*Nostoc* M1, *Nostoc* SP5, *Nostoc* T18, *Lyngbya* K10, *Nostoc* K15). Pored toga, u odnosu na sve sojeve, izuzetno povećanje sadržaja fikobiliproteina (fikocijanina i alofikocijanina) u prisustvu glukoze u odnosu na medijum bez glukoze uočeno je kod tri soja iz roda *Nostoc* (*Nostoc* M1, *Nostoc* SP5 i *Nostoc* T18).



Za razliku od gore pomenutih sojeva kod kojih je prisustvo glukoze u medijumu uticalo na povećanje sadržaja pojedinačnih fikobiliproteina, kod 7 sojeva (*Phormidium* M1, *Calothrix* M2, *Anabaena* M2, *Nostoc* T7, *Phormidium* T11, *Tolypothrix* K15 i *Phormidium* K15) sadržaj istih je bio najveći u medijumu bez dodatka glukoze kao organskog izvora ugljenika (Prilog 5 Tabela 25). Kod testiranih sojeva koncentracija fikocijanina u medijumu bez glukoze kretala se u opsegu od 0,051 mg/ml (*Phormidium* M1) do 0,099 mg/ml (*Phormidium* K15). U sličnom opsegu kretale su se i koncentracije alofikocijanina (od 0,046 mg/ml (*Phormidium* M1) do 0,093 mg/ml (*Phormidium* K15)) i fikoeritrina (od 0,003 mg/ml (*Anabaena* M2) do 0,093 mg/ml (*Nostoc* T7)).

Poređenjem vrednosti dobijenih za maksimalan sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina među testiranim sojevima, fikocijanin je bio zastupljeniji i u najvećoj količini. Drugi po zastupljenosti bio je alofikocijanin, dok je u slučaju fikoeritrina (crvenog pigmenta) zabeležen dosta nizak sadržaj i kod nekih sojeva uočeno je odsustvo istog. Najpotentnijim producentima fikocijanina pokazali su se *Nostoc* M1 (1,037 mg/ml) i *Nostoc* SP5 (0,259 mg/ml) gajeni u medijumu sa glukozom. U slučaju alofikocijanina najveći sadržaj takođe je zabeležena kod soja *Nostoc* M1 (0,384 mg/ml) kultivisanog u medijumu sa glukozom. U slučaju fikoeritrina, najveći sadržaj zabeležena je kod soja *Nostoc* SP5 (0,139 mg/ml) gajenog takođe u medijumu sa glukozom. Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da glukoza može uticati na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina, posebno fikocijanina kao komercijalno važnog jedinjenja.

Prema Lewin (1974) fruktoza, glukoza, glicerol i saharoza se kod mikroalgi transformišu u gliceraldehid-3-fosfat, glavni intermedijerni produkt koji je uključen u glikolizu i u pentozno-fosfatni put. Za razliku od polisaharida, usvajanje glukoze energetski je povoljnije nego usvajanje skroba koji mora biti prvo enzimski hidrolizovan do glukoze i tek nakon toga iskorišćen (Pramanik i sar., 2011). Upravo zbog toga, među ugljenim hidratima glukoza predstavlja jedan od najčešće korišćenih izvora ugljenika u medijumu. Glikolizom glukoza se konvertuje u trioze koje se dalje konvertuje u piruvat, i nakon toga u acetat koji ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina u kome nastaju CO<sub>2</sub> i voda uz oslobađanje energije (Noaman i sar., 2004). Katabolizam glukoze značajan je i za obezbeđivanje intermedijera neophodnih za primarni kao i za sekundarni metabolizam. Strategija aktivnog usvajanja nekih organskih molekula od strane fotoheterotrofa može biti energetski daleko korisnija nego *de novo* sinteza istih molekula (Pramanik i sar., 2011).

Pored obezbeđivanja neophodnih intermedijera i energije Chojnacka i Noworyta (2004) su ukazali da bi u miksotrofnim uslovima glukoza mogla da ima protektivan uticaj s obzirom da fotoinhibicija rasta pri visokoj svetlosnoj radijaciji nije primećena u miksotrofnim uslovima za razliku od fotoautotrofnih uslova. Na kraju, važno je napomenuti da se autotrofni rast cijanobakterija, asimilacija azota i generisanje H<sub>2</sub> oslanjaju na proces fotosinteze (Wan i sar., 2015) i za regulisanje ovih puteva cijanobakterije koriste globalne regulatore (kao što je NtcA) (Osana i sar., 2014). S obzirom da su za metabolizam azota i vodonika neophodni izvori energije, korišćenjem organskih supstrata može se ublažiti teret pomenutih metaboličkih procesa energetski zavisnih od procesa fotosinteze (Wan i sar., 2015). Organski izvor ugljenika pospešuju aktivnost enzima uključenih u metabolizam azota i vodonika (nitrogenaze i hidrogenaze) preko donacije elektrona (Dutta i sar., 2005). Shodno tome, u miksotrofnim uslovima, organski supstrati mogu obezbediti cijanobakterijama dodatni izvor ugljenika i energije (Nakajima i sar., 2014). Takođe, Kalvinov ciklus i oksidativni pentozna fosfatni put

(OPP) mogu funkcionisati simultano u cilju regulacije miksotrofnog i autotrofnog metabolizma (Young i sar., 2011). Korišćenjem organskih izvora ugljenika (kao što su glukoza i acetat), metabolizam cijanobakterija postaje efikasniji u smislu fotosintetičke aktivnosti usled čega dolazi do povećanja stope rasta (Yan i sar., 2012).

Pored toga, u slučaju glukoze, smanjenje produkcije biomase i sadržaja pojedinačnih fikobiliproteina u prisustvu datog monosaharida moglo bi ukazati i na nedostatak inducibilnog transportnog sistema za heksoze s obzirom da je pokazano da u slučaju mikroalgi kao što je *Chlorella vulgaris*, postojanje datog sistema omogućava organizmu unos i upotrebu glukoze (Haass i Tanner, 1974). Štaviše, u nekim slučajevima pokazano je da obligatna fotoautotrofna priroda mikroalgi nastaje zbog nedostatka efikasnih mehanizama transporta ugljenih hidrata i introdukovanjem odgovarajućih transportera ćelije postaju sposobne da rastu u heterotrofnim uslovima (Chen i Chen, 2006; Doebbe i sar., 2007). Sposobnost korišćenja različitih izvora ugljenika (uključujući acetat, glukozu, laktat i glicerol) zahteva postojanje nekoliko enzimskih sistema za transport, aktivaciju supstrata preko fosforilacije, intermedijarnog anaboličkog i kataboličkog metabolizma i stvaranja energije preko nivoa supstrata i/ili respiracije (Van Baalam i Pulish, 1973). U slučaju glukoze, različite vrste cijanobakterija koriste piridin nukleotid glukoza zavisnu dehidrogenazu, koja je odgovorna za inicijalni metabolizam slobodne (nefosforilisane) glukoze (Van Baalam i Pulish, 1973). Nakon unosa glukoze, ili nekog drugog sličnog ugljenog hidrata, šećeri se dalje metabolišu preko puta pentoza fosfata (PPP) i Embedn-Meyerhof-Parnas (EMP) puta (Morales-Sánchez i sar., 2013; Perez-Garcia i sar., 2011). Metabolički putevi PPP i EMP su funkcionalni u ćelijskoj citoplazmi mikroalgi, i u zavisnosti od uslova sredine (prisustva svetla i glukoze) PPP najverovatnije ima višu metaboličku stopu i preimućstvo u odnosu na druge metaboličke puteve (Perez-Garcia i sar., 2011). Pored toga, rezultati Lin i Wu (2015) su pokazali da ksiloza ne može biti efikasno iskorišćena za rast mikroalgi što je doprinelo smanjenju produkcije biomase korišćenjem ksiloze kao organskog izvora ugljenika u poređenju sa drugim organskim izvorima ugljenika kao što su urea i saharoza. Isti autori su istakli da mikroalge iako poseduju transportni sistem za heksoze ne poseduju i za pentoze (Lin i Wu, 2015).

U ovom radu je pored glukoze kao monosaharida takođe ispitan i uticaj jednog disaharida (saharoze) na rast i produkciju biomase i sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina kod testiranih sojeva. Kao i u slučaju glukoze, dobijeni rezultati ukazali su da je sposobnost produkcije biomase u prisustvu saharoze soj-specifično svojstvo (Tabela 26). Dobijeni rezultati ukazuju na specifičnost korišćenja organskog supstrata kao donora ugljenika i na razlike u metaboličkim svojstvima sojeva. Obrazac produkcije biomase i sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina varirao je između sojeva u zavisnosti od koncentracije saharoze ukazujući da kod nekih sojeva saharoza može imati stimulativan efekat na rast i produkciju biomase, dok je kod drugih sojeva veća produkcija zabeležena u medijumu bez saharoze (Prilog 5 Grafici 43-62).

U slučaju sojeva kod kojih je pokazano povećanje produkcije biomase u prisustvu saharoze kod tri soja uočeno je proporcionalno povećanje produkcije biomase sa porastom koncentracije saharoze u medijumu. Najveći porast produkcije biomase od 2,64 puta (640,24 µg/ml) i 2,58 puta (624,99 µg/ml) zabeležen je kod soja *Nostoc* T18 u prisustvu saharoze u medijumu u odnosu na kontrolni medijum (242,21 µg/ml). Sa druge strane, kod 4 soja (*Nostoc* M1, *Nostoc* K15, *Calothrix* SP2 i *Phormidium* K15) na porast produkcije biomase značajno je uticala koncentracija saharoze u medijumu (Tabela 26). Kod datih sojeva, pri koncentraciji 3 g/L došlo

je do povećane produkcije biomase dok je pri koncentraciji 1,5 g/L detektovan pad produkcije u odnosu na kontrolni medijum. Za razliku od prethodno pomenutih sojeva, kod 4 soja povećanje produkcije biomase registrovano je u prisustvu koncentracije saharoze od 1,5 g/L saharoze, dok je pri koncentracije 3 g/L došlo do pada produkcije u odnosu na medijum bez dodatka saharoze. Kod soja *Oscillatoria* SP2 pri koncentracije saharoze 1,5 g/l produkcija biomase bila je veća 1,57 puta u odnosu na medijum bez saharoze (1378,72 µg/ml). Kod 4 soja sa porastom koncentracije saharoze došlo je do proporcionalnog smanjenja produkcije biomase. Najveći pad produkcije biomase od čak 11,8 puta (99,93 µg/ml) uočen je kod soja *Phormidium* M1 kultivisanog u prisustvu 3 g/L saharoze u odnosu na kontrolni medijum (1178,86 µg/ml).

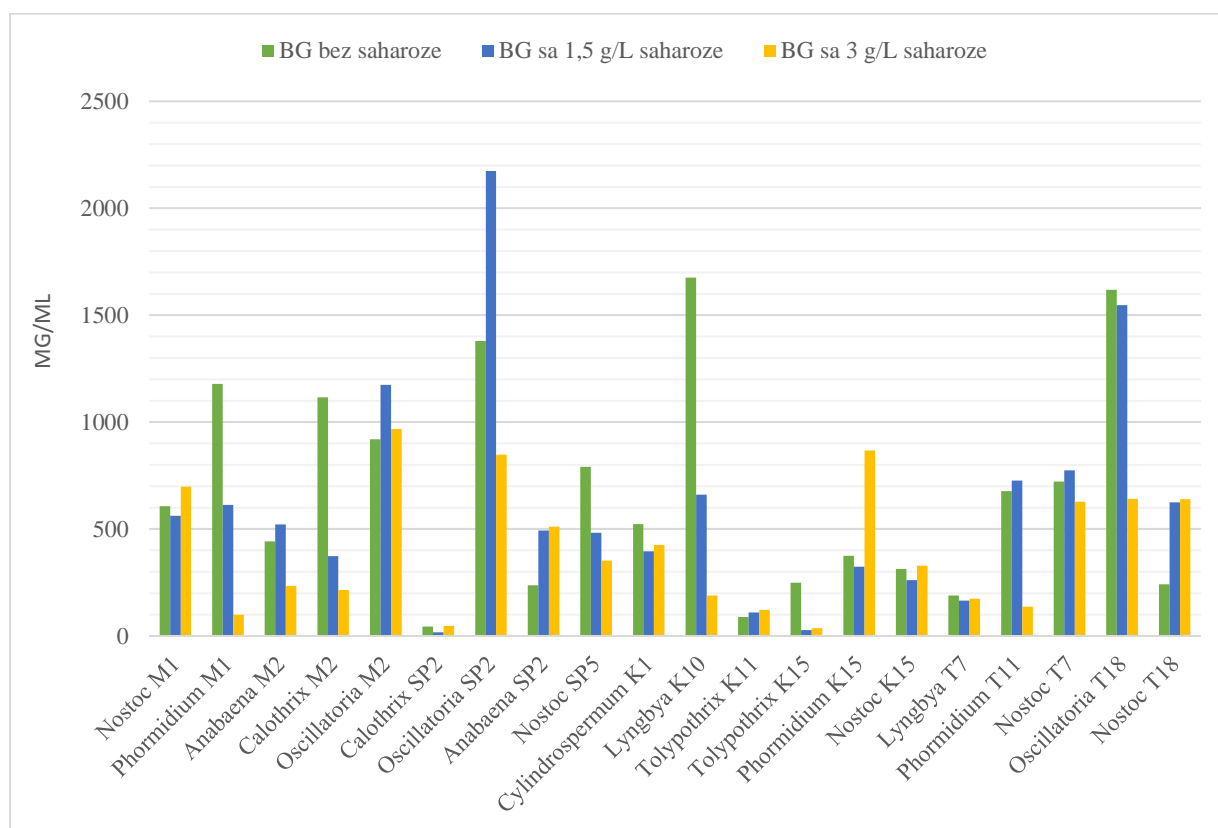
Tabela 26. Uticaj različitih koncentracija saharoze na produkciju biomase testiranih sojeva

Testirani soj	7. dan µg/ml	14. dan µg/ml	21. dan µg/ml	28. dan µg/ml	35. dan µg/ml
<b><i>Nostoc</i> M1</b>					
BG-N bez saharoze	54,20	264,23	353,99	447,15	<u>606,37</u>
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	55,89	298,10	404,81	436,83	<u>562,33</u>
BG-N sa 3 g/L saharoze	42,34	213,41	394,65	467,48	<u>697,83</u>
<b><i>Phormidium</i> M1</b>					
BG+N bez saharoze	142,27	306,57	558,94	<u>1178,86</u>	689,36
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	35,57	50,81	54,20	289,63	<u>613,14</u>
BG+N sa 3 g/L saharoze	81,30	82,99	86,38	<u>99,93</u>	91,46
<b><i>Oscillatoria</i> M2</b>					
BG+N bez saharoze	142,27	428,52	425,13	572,49	<u>919,71</u>
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	127,03	237,13	438,68	699,52	<u>1173,78</u>
BG+N sa 3 g/L saharoze	191,39	313,34	331,98	753,72	<u>967,14</u>
<b><i>Calothrix</i> M2</b>					
BG-N bez saharoze	113,48	138,45	216,80	<u>1116,19</u>	399,73
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	138,89	194,78	277,78	<u>372,63</u>	289,63
BG-N sa 3 g/L saharoze	67,75	110,09	<u>215,11</u>	120,26	77,91
<b><i>Anabaena</i> M2</b>					
BG+N bez saharoze	93,16	218,49	308,26	<u>442,07</u>	392,95
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	96,54	353,99	469,17	<u>521,68</u>	381,10
BG+N sa 3 g/L saharoze	93,16	<u>233,74</u>	212,48	191,39	37,26
<b><i>Oscillatoria</i> SP2</b>					
BG+N bez saharoze	154,13	508,13	814,70	1031,5	<u>1378,72</u>
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	174,46	281,16	352,30	1056,91	<u>2174,79</u>
BG+N sa 3 g/L saharoze	93,16	210,03	304,88	628,38	<u>848,57</u>
<b><i>Calothrix</i> SP2</b>					
BG-N bez saharoze	20,44	35,57	44,04	<u>40,65</u>	40,65
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	7,86	10,16	<u>16,94</u>	13,55	8,47
BG-N sa 3 g/L saharoze	13,14	16,94	<u>47,42</u>	37,26	10,16
<b><i>Anabaena</i> SP2</b>					
BG-N bez saharoze	46,84	172,76	196,48	<u>237,13</u>	228,66
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	82,19	177,84	179,54	182,93	<u>492,88</u>
BG-N sa 3 g/L saharoze	90,56	193,09	242,21	291,33	<u>511,51</u>
<b><i>Nostoc</i> SP5</b>					

BG-N bez saharoze	210,03	348,91	360,77	360,77	<u>790,98</u>
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	205,32	238,82	269,31	282,86	<u>482,72</u>
BG-N sa 3 g/L saharoze	218,33	233,74	210,03	142,27	152,30
<b><i>Nostoc T7</i></b>					
BG-N bez saharoze	89,77	142,27	176,15	<u>721,54</u>	106,71
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	113,48	250,68	570,80	<u>774,05</u>	223,58
BG-N sa 3 g/L saharoze	176,15	240,51	<u>628,38</u>	564,02	570,80
<b><i>Lyngbya T7</i></b>					
BG+N bez saharoze	99,76	120,09	<u>189,02</u>	164,80	98,41
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	112,46	130,25	144,31	<u>164,63</u>	92,65
BG+N sa 3 g/L saharoze	125,68	126,01	<u>174,29</u>	105,86	75,88
<b><i>Phormidium T11</i></b>					
BG+N bez saharoze	142,19	301,49	606,37	608,06	<u>677,50</u>
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	130,15	186,31	420,05	672,42	<u>726,62</u>
BG+N sa 3 g/L saharoze	12,80	32,18	<u>137,19</u>	52,51	33,87
<b><i>Oscillatoria T18</i></b>					
BG+N bez saharoze	140,58	259,14	587,73	<u>1619,23</u>	542,00
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	193,54	457,31	618,22	<u>1546,40</u>	501,35
BG+N sa 3 g/L saharoze	60,67	128,72	428,52	574,18	<u>641,93</u>
<b><i>Nostoc T18</i></b>					
BG-N bez saharoze	67,75	121,95	167,68	<u>242,21</u>	137,19
BG-N sa 1,5 g/L saharoze	56,24	94,85	138,89	<u>624,99</u>	511,51
BG-N sa 3 g/L saharoze	62,98	81,30	265,92	<u>640,24</u>	372,63
<b><i>Cylindrospermum K1</i></b>					
BG+N bez saharoze	162,77	335,36	492,88	<u>523,37</u>	382,79
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	181,91	<u>396,34</u>	237,13	157,52	5,08
BG+N sa 3 g/L saharoze	165,14	372,63	<u>425,13</u>	398,03	137,19
<b><i>Lyngbya K10</i></b>					
BG+N bez saharoze	345,53	470,86	623,30	<u>1675,13</u>	582,65
BG+N 1,5 g/L saharoze	164,29	167,68	204,94	657,18	<u>660,57</u>
BG+N sa 3 g/L saharoze	47,42	82,99	<u>189,70</u>	130,42	32,18
<b><i>Tolypothrix K11</i></b>					
BG+N bez saharoze	81,47	<u>88,58</u>	85,20	82,99	82,82
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	74,36	85,20	103,83	<u>109,75</u>	90,11
BG+N sa 3 g/L saharoze	78,76	100,61	104,84	<u>122,29</u>	77,07
<b><i>Tolypothrix K15</i></b>					
BG+N bez saharoze	10,16	72,83	103,32	<u>248,98</u>	147,36
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	6,77	15,24	20,32	<u>27,10</u>	5,08
BG+N sa 3 g/L saharoze	3,39	13,39	<u>37,26</u>	32,18	10,16
<b><i>Phormidium K15</i></b>					
BG+N bez saharoze	54,20	89,77	199,86	<u>374,32</u>	105,01
BG+N sa 1,5 g/L saharoze	22,43	54,20	69,44	<u>323,69</u>	152,44
BG+N sa 3 g/L saharoze	7,76	11,86	279,47	<u>867,20</u>	340,44
<b><i>Nostoc K15</i></b>					
BG-N bez saharoze	25,41	101,62	120,26	233,74	<u>313,34</u>

BG-N sa 1,5 g/L saharoze	10,16	54,20	71,14	<u>260,84</u>	206,64
BG-N sa 3 g/L saharoze	1,69	105,01	140,58	<u>328,59</u>	281,16

Na osnovu dobijenih rezultata, među testiranim sojevima najveća produkcija biomase, veća od 2000 µg/ml, zabeležena je kod soja *Oscillatoria* SP2 gajenog u podlozi sa 1,5 g/L saharoze. Pored pomenutog soja, značajnija produkcija biomase veća od 1500 µg/ml registrovana je i kod soja *Oscillatoria* T18, koji je takođe kultivisan u prisustvu 1,5 g/L saharoze. Sa druge strane, najmanja produkcija biomase u prisustvu saharoze zabeležena je kod soja *Tolypothrix* K15 (Grafik 63). Pored toga, u zavisnosti od sposobnosti usvajanja saharoze testirani cijanobakterijski sojevi mogu se podeliti u 3 grupe. U prvoj grupi se nalaze sojevi kod kojih povećanje koncentracije saharoze u medijumu dovodi do proporcionalnog povećanja produkcije biomase (*Anabaena* SP2, *Nostoc* T18, *Tolypothrix* K11). U drugoj grupi nalaze se sojevi kod kojih nije uočeno proporcionalno povećanje produkcije biomase sa povećanjem koncentracije saharoze (*Anabaena* M2, *Oscillatoria* SP2, *Nostoc* T7 i *Phormidium* T11, *Nostoc* M1, *Nostoc* K15, *Calothrix* SP2 i *Phormidium* K15). U poslednjoj grupi nalaze se sojevi kod kojih je u prisustvu saharoze došlo do smanjenja produkcije biomase (*Calothrix* M2, *Phormidium* M1, *Lyngbya* K10 i *Nostoc* SP5, *Tolypothrix* K15 i *Cylindrospermum* K1).



Grafik 63. Maksimalna produkcija biomase kod testiranih sojeva cijanobakterija u prisustvu različitih koncentracija saharoze

Saharoza kao organski izvor ugljenika značajno je uticala na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina i kod 75% testiranih cijanobakterijskih sojeva pospešila je sadržaj pojedinačnih fikobilina (Prilog 5 Tabela 27). Kod četiri soja (*Nostoc* M1, *Anabaena* M2, *Oscillatoria* SP2, *Phormidium* T11) veći sadržaj zabeležen je pri koncentraciji saharoze 1,5 g/L. Među datim sojevima maksimalne zabeležene koncentracije fikobiliproteina u prisustvu saharoze kretale su

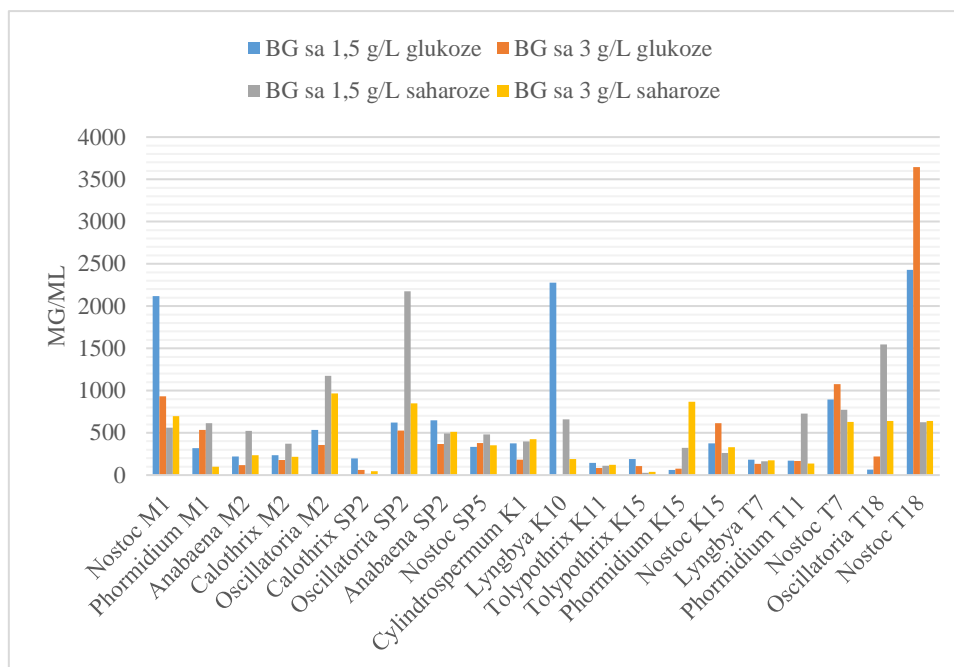
se u sledećem opsegu: od 0,054 mg/ml (*Phormidium* T11) do 0,128 mg/ml (*Anabaena* M2) u slučaju fikocijanina, od 0,026 mg/ml (*Anabaena* M2) do 0,082 mg/ml (*Oscillatoria* SP2) u slučaju alofikocijanina, dok je zabeležena maksimalna koncentracija fikoeritrina kod soja *Phormidium* T11 bila 0,038 mg/ml. Sa druge strane, u slučaju 11 sojeva (*Oscillatoria* M2, *Anabaena* SP2, *Nostoc* SP5, *Nostoc* T7, *Lyngbya* T7, *Oscillatoria* T18, *Nostoc* T18, *Cylindrospermum* K1, *Tolypothrix* K11, *Tolypothrix* K15, *Phormidium* K15) maksimalan sadržaj fikobiliproteina ostvaren je pri koncentraciji saharoze 3 g/L. U slučaju datih sojeva maksimalne zabeležene koncentracije fikobiliproteina u prisustvu saharoze bile su u opsegu od 0,014 mg/ml (*Nostoc* T7) do 0,1241 mg/ml (*Phormidium* K15) u slučaju fikocijanina, od 0,013 mg/ml (*Nostoc* T7) do 0,116 mg/ml (*Phormidium* K15) u slučaju alofikocijanina, od 0,058 mg/ml (*Cylindrospermum* K1) do 0,071 mg/ml (*Nostoc* SP5) u slučaju fikoeritrina.

Za razliku od gore pomenutih sojeva kod kojih je prisustvo saharoze u medijumu doprinelo povećanju sadržaja pojedinačnih fikobiliproteina, kod 5 sojeva maksimalan sadržaj ostvaren je u medijumu bez dodatka saharoze kao organskog izvora ugljenika. Među datim sojevima nalazili su se *Phormidium* M1, *Calothrix* M2, *Calothrix* SP2, *Lyngbya* K10 i *Nostoc* K15. U slučaju pomenutih sojeva, maksimalne zabeležene koncentracije fikobiliproteina u medijumu bez saharoze kretale su se u sledećem opsegu: od 0,014 mg/ml (*Calothrix* SP2) do 0,08 mg/ml (*Lyngbya* K10) u slučaju fikocijanina, od 0,016 mg/ml (*Calothrix* SP2) do 0,079 mg/ml (*Lyngbya* K10) u slučaju alofikocijanina, od 0,008 mg/ml (*Lyngbya* K10) do 0,065 mg/ml (*Calothrix* M2) u slučaju fikoeritrina.

Poređenjem vrednosti dobijenih za maksimalan sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina kod testiranih sojeva, fikocijanin je kao i u slučaju glukoze bio zastupljen u najvećoj količini. Drugi po zastupljenosti bio je alofikocijanin dok je u slučaju fikoeritrina (crvenog pigmenta) zabeležen niži sadržaj (Prilog 5 Tabela 27). Najpotentnijim producentima fikocijanina pokazali su se *Anabaena* M2 (0,128 mg/ml), *Phormidium* K15 (0,124 mg/ml) i *Nostoc* M1 (0,116 mg/ml) gajeni u medijumu sa saharozom. U slučaju alofikocijanina najveći sadržaj takođe je zabeležena kod soja *Phormidium* K15 (0,116 mg/ml) kultivisanog u medijumu sa saharozom. U slučaju fikoeritrina, najveća produkcija zabeležena je kod soja *Nostoc* SP5 (0,071 mg/ml) gajenog takođe u medijumu sa saharozom. Na osnovu dobijenih rezultata, saharoza pored glukoze može biti izuzetno značajna za povećanje sadržaja pojedinačnih fikobiliproteina kod nekih testiranih terestričnih šumskih sojeva cijanobakterija. Prema Lin i Wu (2015) molekul saharoze se prvo razgrađuje na molekul glukoze i fruktoze nakon čega mikroalge mogu da ga koriste.

U odnosu na sposobnost usvajanja organskog izvora ugljenika, dobijeni rezultati su ukazali da je sposobnost korišćenja organskog supstrata svojstvo specifično za svaki soj. Kod tri testirana soja, veća produkcija biomase zabeležena je u prisustvu glukoze u odnosu na saharozu (*Nostoc* M1, *Lyngbya* K10, *Nostoc* T18). Sa druge strane, kod 5 sojeva produkcija biomase bila je veća u prisustvu saharoze u medijumu (*Anabaena* M2, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* SP2, *Phormidium* K15, *Oscillatoria* T18) (Grafik 64). U slučaju dva soja sposobnost usvajanja glukoze i saharoze bila je veoma slična (*Tolypothrix* K11, *Lyngbya* T7). Shodno tome, dobijeni rezultati su pokazali da testirani sojevi poseduju sposobnost miksotrofnog metabolizma monosaharida (glukoza) i disaharida (saharoz) što je u saglasnosti sa činjenicom da su zahvaljujući svestranim metaboličkim mogućnostima cijanobakterije sposobne da rastu u autotrofnim, heterotrofnim i miksotrofnim uslovima (Bottomley i Van Baalen, 1978, Yang i sar., 2002; Eiler, 2006). Prema Radwan i Al-Hasan (2002) na osnovu sposobnosti

cijanobakterija da usvajaju ugljene hidrate testirani supstrati mogu biti raspoređeni u opadajućem nizu D-glukoza > D saharoza i D fruktoza > D riboza i D glicerol. Rezultati dobijeni u ovom radu govore u prilog tome da su za testirane sojeve cijanobakterija povoljniji izvori ugljenika i glukoza i saharoza.



Grafik 64. Produkcija biomase u prisustvu glukoze i saharoze.

Na grafiku su predstavljene vrednosti dobijene za maksimalnu produkciju biomase

Cheirsilp i Torpee (2012) su ukazali da u miksotrofnim uslovima rasta prisustvo organskog supstrata obezbeđuje rast ćelija koji nije striktno zavistan od fotosinteze i svetlosti kao nužnog faktora rasta. Za razliku od fotoautotrofnih uslova gde glavni nedostatak gajenja predstavlja pojava ćelijskog „samo-senčenja“ usled čega u kasnijim fazama rasta dolazi do smanjenja dostupnosti svetlosti i shodno tome smanjenja produkcije biomase i rasta (Lin i Wu, 2015) glavna prednost miksotrofnog rasta predstavlja upravo relativno mali zahtev prema izvoru svetlosti (Fernández-Sevilla i sar., 2014). Pored toga, Cheirsilp i Torpee (2012) su istakli da miksotrofan rast nije jednostavna kombinacija fotoautotrofnog i heterotrofnog rasta kod mikroalgi. Do sličnih rezultata došli su i Chojnacka i Noworyta (2004) u slučaju cijanobakterijskog soja *Spirulina* sp. i isti autori su istakli da fotoautotrofni rast može biti stimulisan u prisustvu glukoze verovatno i preko povećanja koncentracije CO<sub>2</sub> nastale iz metabolizma glukoze.

Međutim, Vonshak i sar. (2000) su ukazali da je većina studija miksotrofnog i heterotrofnog rasta fokusirana uglavnom na mikroalge kao što su *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus* i da je broj studija vezan za cijanobakterije daleko manji. Pored toga, iako je poznato da cijanobakterije mogu da koriste različite izvore ugljenika (Rippka, 1972; Stal i Moezelaar, 1997) malo informacija je dostupno vezano za fiziološke karakteristike miksotrofije kod cijanobakterija (Guoce i sar., 2011). Takođe, većina radova fokusirana je na vrstu *Spirulina platensis* (Marquez i sar., 1993; Marquez i sar., 1995; Chen i sar., 1996; Chen i sar., 2006) pri čemu je miksotrofan rast filamentoznih, heterocistnih cijanobakterija retko proučavan (Haury i



Spiller, 1981; Rozen i sar., 1986; Rozen i sar., 1988; Guoce i sar., 2011). Do danas, postoji nekoliko radova o mehanizmima korišćenja organskog izvora ugljenika od strane cijanobakterija (Ding i sar., 2013).

U slučaju jednoćelijskih predstavnika cijanobakterija, Yang i sar. (2002) su utvrdili da u slučaju vrsta roda *Synechocystis* glukoza predstavlja najpovoljniji izvor ugljenika. Pored toga, pokazano je da soj *Synechocystis* 6803 poseduje transporter za glukozu (kod za gen SII0771) čija je sekvenca slična sa sekvencom transportera glukoze kod sisara (Schmetterer, 1990). Na primer, Feng i sar. (2010) su pokazali da enzimi uključeni u transport glukoze i njeno iskorišćavanje kod soja *Cyanothece* 51142 nisu toliko efikasni kao enzimi kod soja *Synechocystis* PCC6803. Rezultati Feng i sar. (2010) su pokazali da je kod soja *Cyanothece* 51142 u uslovima kontinualnog osvetljenja dodatak glicerola dvostruko unapredio produkciju biomase. U istom radu, soj *Synechocystis* sp. PCC 6803 takođe je pokazao sposobnost miksotrofnog metabolizma i sposobnost usvajanja glicerola, glukoze i piruvata kao organskih izvora ugljenika (Feng i sar., 2010).

U slučaju neazotofiksirajućih sojeva, Francisco i sar. (2012) su ispitivali rast vrste *Phormidium* sp. u prisustvu različitih disaharida (laktoza, maltoza, saharoza i trehaloza) pri čemu je među testiranim disaharidima najveći potencijal ispoljila trehaloza. Pored toga, u istom radu pokazano je da vrsta *Phormidium* sp. poseduje sposobnost heterotrofnog metabolizma disaharida (Francisco i sar., 2012). U odnosu na rezultate Francisco i sar. (2012) sojevi roda *Phormidium* testirani u ovom radu takođe su ispoljili sposobnost metabolizma disaharida, saharoze, pri čemu je kod soja *Phormidium* K15 uočeno značajnije povećanje produkcije biomase pri koncentraciji saharoze 3 g/L. U slučaju filamentoznog cijanobakterijskog roda *Spirulina*, dodatak glukoze u medijum pospešio je rast i produkciju biomase (Marquez i sar., 1993; Chojnacka i Noworyta, 2004). Kod vrste *S. platensis* tokom miksotrofnih uslova rasta produkcija biomase i fotosintetičkih pigmenata bila je povećana 1,5 do 2 puta u poređenju sa fotoautotrofnim kulturama (Marquez i sar., 1995). Rezultati Marquez i sar. (1995) bili su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu gde je takođe pokazano da je u slučaju nekih filamentoznih neheterocistnih sojeva zabeleženo povećanje biomase u prisustvu saharoze (*Phormidium* K15, *Oscillatoria* SP2) ili glukoze (*Lyngbya* K10).

Međutim, iako su Marquez i sar. (1993) ukazali na nezavisnost fotosintetičke aktivnosti i heterotrofnog metabolizma kod *S. platensis* u miksotrofnim uslovima rasta pokazano je da miksotrofni rast ima značajan efekat na fotosintetičku aktivnost kod cijanobakterija (Rozen i sar., 1988; Valiente i sar., 1992). Do sličnih rezultata došli su i Vonshak i sar. (2000) koji su pokazali da miksotrofne kulture cijanobakterijske vrste *Spirulina platensis* rastu brže i postižu veću koncentraciju biomase u poređenju sa fotoautotrofnim kulturama kao i da pokazuju bolju otpornost i brži oporavak nakon stresa izazvanog radijacijom. Isti autori su istakli da je veća stopa oporavka uočena kod miksotrofnih kultura rezultat njihove veće metaboličke aktivnosti s obzirom da su respiracija i maksimalna fotosintetička aktivnost (dva parametra koja mogu ukazati na metaboličku aktivnost kod ćelija) značajno povišeni u miksotrofnim kulturama. Veći sadržaj hlorofila kod miksotrofnih ćelija ukazuje na pozitivan efekat egzogenog izvora ugljenika na formiranje hlorofila koji može služiti kao ugljenična okosnica za biosintezu i povećanje celularne fotosintetičke aktivnosti u miksotrofnim uslovima rasta (Guoce i sar., 2011).

U slučaju heterocistnih azotofiksirajućih sojeva, Yu i sar. (2009) su pokazali da je kod vrste *Nostoc flagelliforme* prinos biomase bio 3,94 puta veći u odnosu na prinos zabeležen u fototrofnim kulturama. U skladu sa tim su i rezultati ovog rada koji ukazuju takođe na povećanje biomase kod svih pripadnika roda *Nostoc* gajenih u medijumu sa glukozom (*Nostoc* M1, *Nostoc* K15, *Nostoc* T7 i *Nostoc* T18) sa izuzetkom soja *Nostoc* SP5. Yu i sar. (2009) su istakli da *N. flagelliforme* može koristiti glukozu preko pentoza fosfatnog puta. Prema Yu (2012) *N. flagelliforme* mogao bi koristiti miksturu glukoze i acetata kao izvor ugljenika u cilju poboljšavanja produkcije EPS u prisustvu svetla. Do sličnih rezultata su takođe došli i Ding i sar. (2013) koji su potvrdili sposobnost *N. flagelliforme* da u miksotrofnim uslovima rasta ostvaruje veliku gustinu ćelija i proizvodnju EPS. U radu Guoce i sar. (2011) maksimalna gustina ćelija u miksotrofnim uslovima kod soja *Anabaena* sp. PCC 7120 postignuta je pri koncentraciji glukoze od 18 g/L i bila je 4,5 puta veća u odnosu na fotoautotrofne uslove. Guoce i sar. (2011) su istakli da poboljšanje rasta *Anabaena* sp. PCC 7120 u miksotrofnim uslovima može nastati usled doprinosa egzogene glukoze asimilirane kao izvora ugljenika i moguće kao izvora energije pri relativno niskom intenzitetu svetlosti. Pored glukoze, kod vrste *Anabaena variabilis* zabeleženo je da fruktoza može biti usvojena i iskorišćena (Haury i Spiller, 1981; Valiente i sar., 1992). Takođe, pokazano je da fruktoza poboljšava razvoj i rast vrste *Anabaena azollae* u miksotrofnim uslovima (Rozen i sar., 1986; Rozen i sar., 1988), ukazujući na potencijal miksotrofije kod roda *Anabaena*. U saglasnosti sa nalazima prethodnih istraživanja, u ovom radu kod soja *Anabaena* SP2 uočena je veća produkcija biomase u prisustvu oba ugljena hidrata.

Sa druge strane, kod nekih sojeva u ovom radu uočeno je da u prisustvu glukoze i saharoze dolazi do smanjenja produkcije biomase (u slučaju saharoze smanjenje produkcije biomase uočeno je kod sojeva *Calothrix* M2, *Phormidium* M1, *Lyngbya* K10, *Nostoc* SP5, *Tolypothrix* K15 i *Cylindrospermum* K1; u slučaju glukoze smanjenje produkcije biomase uočeno je kod sojeva *Calothrix* SP2, *Calothrix* M1, *Oscillatoria* SP2, *Phormidium* T11, *Cylindrospermum* K1, *Lyngbya* T7, *Tolypothrix* K11, *Nostoc* SP5, *Phormidium* K15, *Oscillatoria* T18 i *Phormidium* M1). Do sličnih rezultata došli su i drugi autori koji su pokazali da prisustvo čak i malih koncentracija nekog organskog izvora ugljenika, glukoze ili acetata, dovodi do inhibicije rasta (Chen i Johns, 1994; Cheirsilp i Torpee, 2012). Prema nekim autorima nekompletni putevi ili nedostatak enzimskih reakcija u centralnom metabolizmu ugljenika predstavlja primarni uzrok obligatnog fotoautotrofnog rasta, odnosno nemogućnost miksotrofnog i heterotrofnog rasta. Pokazano je da nekoliko obligatnih fotoautotrofnih mikroalgi poseduju nekompletni ciklus trikarboksilnih kiselina (TCA) usled nedostatka enzima oksoglutarat dehidrogenaza. U slučaju nedostatka enzima oksoglutarat dehidrogenaza, smatra se da se TCA ciklus primarno koristi u svrhe biosinteze usmeravanjem ugljenika u centralne puteve biosinteze, bez mogućnosti proizvodnje molekula adenozin trifosfata (ATP) (Chen i Chen, 2006). Pored toga, slab rast u prisustvu glukoze takođe može biti povezan sa prirodom fotoautotrofije kod cijanobakterija, kod kojih ciklus trikarbonskih kiselina nije potpun i glukoza se metaboliše uglavnom preko pentoza fosfatnog puta (Guoce i sar., 2011).

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu, pokazano je da cijanobakterije terestričnih staništa poseduju sposobnost miksotrofnog rasta i usvajanja mono i disaharida. Štaviše, kod mnogih sojeva produkcija biomase i fikobiliproteina (fikocijanina, alofikocijanina, fikoeritrina) bila je značajno povećana u prisustvu organskog supstrata. Sa aspekta fiziološke i metaboličke perspektive, skrining sojeva iz različitih okruženja (Jia i sar., 2014) i razvoj molekularnih i metaboličkih „alatki“, važan je u cilju otkrivanja novih vrsta mikroalgi, uključujući cijanobakterije, koje mogu da rastu na različitim izvorima ugljenika (Morales-Sánchez i sar., 2015). Shodno tome, kod terestričnih cijanobakterija izolovanih iz šumskih ekosistema sa sposobnošću usvajanja glukoze i saharoze miksotrofija bi mogla biti značajna ne samo u cilju pospešivanja produkcije biomase, već i jedinjenja sa biološkom aktivnošću.

#### 4.5. Određivanje sadržaja ugljenih hidrata – PSA test

U cilju karakterizacije sadržaja ugljenih hidrata kod zemljišnih sojeva cijanobakterija poreklom iz šumskih ekosistema ispitan je sadržaj različitih monosaharida kao važnih konstituenata EPS tokom stacionarne faze rasta. Na osnovu dobijenih rezultata, kod svih testiranih sojeva zabeleženo je prisustvo sva tri monosaharida (Tabela 28). Između testiranih sojeva sadržaj monosaharida se značajno razlikovao ukazujući da je ugljeno hidratni sastav specifično svojstvo svakog soja. Među analiziranim monosaharidima, kod svih testiranih sojeva u najvećoj količini bila je zastupljena glukoza dok su preostala dva monosaharida (fruktoza i ksiloza) bila zastupljena u daleko manjim količinama.

U slučaju najzastupljenijeg i najdominantnijeg monosaharida, soj kod koga je registrovana najveća koncentracija glukoze bio je *Nostoc* M1 (2626,88±27,82 mg ekvivalenta/g suve materije - mg ek/g s.m.) (Tabela 28). Pored soja *Nostoc* M1, soj sa visokom sadržajem glukoze bio je i *Phormidium* T11 (1918,69±27,82 mg ekvivalenta/g suve materije - mg ek/g s.m.). U slučaju 6 sojeva (*Calothrix* M2, *Lyngbya* T7, *Lyngbya* K10, *Oscillatoria* T18, *Tolypothrix* K11, *Cylindrospermum* K1) dobijene vrednosti za koncentraciju glukoze bile su takođe značajnije i iznosile su preko 1000 mg ek/g s.m.. Sa druge strane, u slučaju preostalih sojeva dobijene vrednosti bile su ispod 1000 mg ek/g s.m., odnosno, sojevi sa najnižim sadržajem glukoze u ovom radu bili su *Nostoc* T18 (253,96±11,59 mg ek/g s.m.), *Anabaena* SP2 (247,87±3,09 mg ek/g s.m.) i *Nostoc* K15 (207,41±18,08 mg ek/g s.m.).

U slučaju drugog testiranog monosaharida, najveća količina fruktoze registrovana je kod soja *Nostoc* M1 (546,97±6,49 mg ek/g s.m.) dok je najmanja količina fruktoze detektovana kod soja *Nostoc* K15 (45,06±4,25 mg ek/g s.m.). Kao i u slučaju glukoze, dobrim producentima fruktoze (pored soja *Nostoc* M1) pokazali su se takođe sojevi *Phormidium* T11 (381,86±6,49 mg ek/g s.m.), *Calothrix* M2 (307,28±2,49 mg ek/g s.m.) i *Lyngbya* T7 (256,09±1,50 mg ek/g s.m.). Produkcija fruktoze bila je najmanja kod sojeva *Nostoc* T18 (55,93±2,80 mg ek/g s.m.), *Anabaena* SP2 (52,33±0,72 mg ek/g s.m.) i *Nostoc* K15 (45,06±4,25 mg ek/g s.m.).

U slučaju poslednjeg testiranog monosaharida ksiloze, dobijeni su slični rezultati kao i u slučaju prethodna dva monosaharida. Najmanja i najveća količina ksiloze detektovane su kod predstavnika roda *Nostoc*. Kod soja *Nostoc* T18 registrovana je najmanja koncentracija ksiloze (28,74±3,38 mg ek/g s.m.) dok je najveća količina ksiloze detektovana kod soja *Nostoc* M1 (342,49±8,12 mg ek/g s.m.).

Tabela 28. Sadržaj glukoze, fruktoze i ksiloze kod testiranih terestričnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema

Cijanobakterijski soj	Glukoza mg ekvivalenta/g suve materije	Fruktoza mg ekvivalenta/g suve materije	Ksiloza mg ekvivalenta/g suve materije
<i>Nostoc</i> M1	2626,88±27,82	546,97±6,49	342,49±8,12
<i>Phormidium</i> M1	786,65±30,91	177,95±7,21	111,57±3,10
<i>Anabaena</i> M2	356,91±5,10	79,95±1,26	43,82±0,70
<i>Oscillatoria</i> M2	779,86±9,74	178,51±2,28	102,86±0,19
<i>Calothrix</i> M2	1331,98±10,66	307,28±2,49	172,40±5,42
<i>Anabaena</i> SP2	247,87±3,09	52,33±0,72	31,94±0,43
<i>Calothrix</i> SP2	778,92±4,06	177,51±0,95	100,67±9,72
<i>Oscillatoria</i> SP2	605,43±22,72	137,88±5,30	83,37±4,55
<i>Nostoc</i> SP5	806,41±6,49	184,77±1,46	96,54±4,38
<i>Nostoc</i> T7	550,24±5,30	125,03±1,24	69,80±1,23
<i>Lyngbya</i> T7	1122,17±6,18	256,09±1,50	146,47±8,27
<i>Phormidium</i> T11	1918,69±27,82	381,86±6,49	329,16±19,12
<i>Nostoc</i> T18	253,96±11,59	55,93±2,80	28,74±3,38
<i>Oscillatoria</i> T18	1062,06±0,00	242,23±0,05	139,15±0,10
<i>Tolypothrix</i> K11	1014,57±6,96	232,47±1,55	122,55±8,67
<i>Tolypothrix</i> K15	954,78±37,09	157,12±8,65	112,15±9,69
<i>Cylindrospermum</i> K1	1014,03±6,57	232,33±1,53	144,45±6,86
<i>Lyngbya</i> K10	1067,52±10,82	243,43±2,68	131,21±6,98
<i>Phormidium</i> K15	626,09±14,47	142,70±3,46	85,96±3,16
<i>Nostoc</i> K15	207,41±18,08	45,06±4,25	36,92±1,75

Na osnovu dobijenih rezultata, svi testirani sojevi ispoljili su sposobnost produkcije ugljenih hidrata kao što su glukoza, fruktoza i ksiloza. Dobijeni rezultati u saglasnosti sa nalazima Ding i sar. (2013) koji su pokazali da pored galaktoze, glukoza i ksiloza predstavljaju glavne monosaharide EPS cijanobakterija. U ovom radu, soj sa najpotentnijom sposobnošću produkcije monosaharida bio je *Nostoc* M1. Kod datog soja, koncentracije sva tri analizirana monosaharida (glukoze, fruktoze i ksiloze) bile su daleko veće u poređenju sa ostalim testiranim sojevima. Do sličnih rezultata došli su i Jensen i sar. (2013) koji su pokazali da su kod tri terestrične vrste iz roda *Nostoc* (*N. commune*, *N. flagelliforme*, *N. sphaeroides*) glukoza (Glc) i ksiloza (Xyl), bile prisutne u značajnim količinama. Pored toga, isti autori identifikovali su i prisustvo galaktoze (Gal) kod pomenutih zemljišnih sojeva, dok je u slučaju vrste *N. flagelliforme* utvrđeno još i prisustvo manoze (Man) i arabinoze (Ara) (Jensen i sar., 2013). Pored soja *Nostoc* M1 potentnim producentima glukoze, fruktoze i ksiloze u ovom radu pokazali su se i *Phormidium* T11 i *Calothrix* M2. U slučaju 6 sojeva (*Lyngbya* T7, *Oscillatoria* T18, *Lyngbya* K10, *Cylindrospermum* K1, *Lyngbya* K10 i *Tolypothrix* K11) zabeležena je slična produkcija testiranih monosaharida. Sa druge strane, sadržaj monosaharida bio je najniži kod dva predstavnika roda *Nostoc* (*Nostoc* K15 i *Nostoc* T18) i roda *Anabaena* (*Anabaena* SP2 i *Anabaena* M2).

Rezultati, Hu i sar. (2003) su pokazali da su se kod vrsta *Microcoleus vaginatus* i *Scytonema javanicum* ugljenohidratni lanci sastojali uglavnom iz jednakih proporcija manoze (Man), galaktoze (Gal) i glukoze (Glc), dok su se u slučaju vrste *Phormidium tenue* sastojali iz arabinoze, glukoze i ramnoze ukazujući da ugljeno hidratni profil predstavlja specifično svojstvo svakog soja. Na primer, u slučaju Nc-5-s heteroglikana molekulske mase oko 1500 kDa izolovanog iz terestrične cijanobakterije *N. commune* monosaharidni profil činile su jedinice Glc/GlcA/Xyl/Man/Ara/Rib/Gal zastupljene u odnosu 24:24:15:13:13:7:4 (Jensen i

sar., 2013). Sa druge strane, kod vrsta *Oscillatoria* sp., *Cyanothece* sp. i *Nostoc* sp., utvrđeno je prisutvo riboze kao monosaharidne jedinice cijanobakterijskih heteroglikana (De Philippis i sar., 2000; Helm i sar., 2000; De Philippis i sar., 2001; Parikh i Madamwar, 2006) zbog čega je ukazano da Ribf može biti uključen u zaštitu susednih glikozidnih veza u EPS i da doprinosi želatinoznoj konzistenciji prirodnog materijala (De Philippis i Vincenzini, 1998; Helm i sar., 2000). U ovom radu, ugljeni hidrat prisutan u najvećoj količini kod svih testiranih sojeva bila je glukoza. S obzirom da glukoza predstavlja jedan od najraspostranjenijih ugljenih hidrata u prirodi koji učestvuje u izgradnji složenijih formi ugljenih hidrata dobijeni rezultati bili su očekivani. Do sličnih rezultata došli su i Parikh i Madamwar (2006) koji su istakli da je glukoza najčešći i najzastupljeniji monosaharid kod cijanobakterija, iako se mogu naći polimeri u kojima su drugi šećeri, poput ksiloze, arabinoze, galaktoze ili fukoze, prisutni u većim koncentracijama od glukoze.

Dosadašnje analize monosaharidnog sastava cijanobakterija pokazale su da su EPS uglavnom izgrađeni iz šest do 10 različitih monosaharidnih jedinica uključujući glukozu (Glc), galaktozu (Gal), ksilozu (Xyl) i uronsku kiselinu (De Philippis i sar., 2001; Otero i Vincenzini, 2003; Pereira i sar., 2009). U poređenju sa polimerima sintetisanim od strane drugih bakterija ili makroalgi, kod kojih je broj monomera obično manji od četiri, cijanobakterijski EPS predstavljaju kompleksne heteropolisaharide (De Philippis i Vincenzini, 1998). Takođe, isti autori su istakli da je 75% polimera cijanobakterija sastavljeno od šest ili više različitih vrsta monosaharida (De Philippis i Vincenzini, 1998). Pored toga, dobijeni rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja koji su identifikovali 12 različitih monosaharida koji ulaze u sastav EPS uključujući heksoze (glukoza, galaktoza, manoza i fruktoza), pentoze (riboza, ksiloza i arabinoza), deoksiheksoze (fukoza, ramnoza i metil ramnoza), i kiselinske heksoze (glukuronska i galakturonska kiselina) (De Philippis i sar., 2001, De Philippis i Vincenzini, 1998, 2003). Rezultati ovog rada ukazali su da zemljišne cijanobakterije šumskih ekosistema imaju sposobnost sinteze heksoza poput glukoze i fruktoze kao i pentoznog šećera ksiloze, što je u saglasnosti sa istraživanjima pomenutih autora.

Prema Pereira i sar. (2009) veliki broj različitih monosaharida pronađenih kod cijanobakterijskih EPS i posleđično tome veliki broj različitih vrsta veza, odgovorni su za prisustvo složenih ponavljajućih jedinica, kao i širokog spektra različitih struktura i arhitektura ovih makromolekula. Upravo zbog svoje kompleksnosti, cijanobakterijski EPS slabije su okarakterisani nego EPS drugih mikroorganizama (Pereira i sar., 2009). Uočeno je da cijanobakterijski EPS nisu sastavljeni samo od ugljenih hidrata, već i od drugih makromolekula poput polipeptida (Kawaguchi i Decho, 2000).

Na ugljeno-hidratni profil cijanobakterija značajno utiče i faza rasta. Prema De Philippis i Vincenzini (1998) polisaharidni sastav određenog soja, kvalitativno i kvantitativno blago varira u različim fazama kultivacije. Do sličnih rezultata došli su i Nicolaus i sar. (1999) koji su istakli da hemijski sastav, tip i količina egzopolisaharida produkovanih od strane određenog cijanobakterijskog soja zavise pre svega od načina i uslova kultivacije. Na primer, u fotoautotrofnim uslovima kultivacije strukturnim ispitivanjima EPS oslobođenog od vrste *Nostoc insulare* registrovano je prisustvo glukuronske kiseline (GlcA), glukoze (Glc) i arabinoze (Ara) zastupljenih delimično u formi 3-OMe-Araf (Volk i sar., 2007). Takođe, kod terestričnog soja *N. commune* gajenog u bezazotnom medijumu arabinoza (Ara) je detektovana u značajnijim količinama (do 25%) (Huang i sar., 1998). Do sličnih rezultata došli su i Brull i

sar. (2000) koji su pokazali prisustvo značajnih količina D-arabinoze (D-Arabinose - Araf), 2-OMe-Glcp i GlcpA, u uslovima gajenja *N. commune* bez azota. Odnosno, nedostatak azota u medijumu kod zemljišnog soja *N. commune* dovodi do povećanja količine arabinoze (Ara) (Huang i sar., 1998; Brull i sar., 2000; Arnalds i Kimble, 2001). Varijacije u metabolizmu azota mogu uticati na metabolizam ugljenih hidrata i smatra se da stimulišu sintezu polisaharida čijom ekskrecijom se ćelije mogu osloboditi viška ugljenika (De Philippis i Vincenzini, 1998; Huang i sar., 1998; Brull i sar., 2000). Rezultati Chen i sar. (2012) su pokazali da kada se ćelije cijanobakterija nalaze pod stresom dolazi do aktivne sinteze saharoze redukovanjem ukupnog nivoa ugljenih hidrata u ćeliji. Pored toga, u cilju preživljavanja produženog stresa EPS mikroalgi mogu biti apsorbovani i korišćeni kao izvor ugljenika u heterotrofnom metabolizmu (Chen i sar., 2003). EPS mogu biti apsorbovani kao izvor ugljenika koji će se koristiti u metabolizmu ugljenih hidrata, i čak mogu poboljšati funkciju eliminacije ROS i zaštite ćelija od oksidativnog oštećenja (Chen i sar., 2006). EPS takođe obrazuju „zaštitni“ sloj oko ćelija formirajući mikro okruženje koje sprečava gubitak vode i omogućava apsorbovanje vode iz atmosferski vlažnog vazduha (75%) (Caiola i sar., 1996; Pereira i sar., 2009).

U slučaju slobodnoživećih kolonija terestričnog soja *N. commune*, smatra se da različit sastav heteroglikana nastaje upravo usled modifikacija ugljeno-hidratnog profila u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine koji često mogu biti nepovoljni tokom dužeg vremenskog perioda (Jensen i sar., 2013). Fleksibilnost polisaharidnog sastava cijanobakterija je od izuzetne važnosti za obezbeđivanje vijabilnosti organizma, ali sa druge strane može da učini strukturne analize cijanobakterijskih polisaharida izazovnim (Brull i sar., 2000; Helm i sar., 2000). Međutim, varijabilnost strukture u zavisnosti od spoljašnjih uslova daje mogućnost da se utiče na sastav heteroglikana variranjem uslova kultivacije (Jensen i sar., 2013). S obzirom da se *Nostoc* može gajiti u bioreaktorima (Yu i sar., 2010), manipulisanjem uslova gajenja može se omogućiti proizvodnja EPS sa odgovarajućim fizičko-hemijskim karakteristikama koje su od značaja za različite industrije (prehrambenu, kozmetičku, i dr.) (Jensen i sar., 2013). Međutim, detaljne studije tačnog sastava monosaharidnih jedinica i njihovo povezivanje u polisaharidnu strukturu su i dalje retke kod cijanobakterija (Jensen i sar., 2013).

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da terestrične cijanobakterije izolovane iz šumskih ekosistema poseduju sposobnost produkcije glukoze, fruktoze i ksiloze kao i da je ugljeno-hidratni profil specifično svojstvo svakog soja. Među testiranim sojevima, izuzetnu sposobnost produkcije testiranih heksoza i pentoza ispoljio je cijanobakterijski soj *Nostoc* M1. Pored datog soja, dosta dobrim producentima monosaharida pokazali su se i sojevi *Phormidium* T11 i *Calothrix* M2. Međutim, imajući u vidu generalnu sposobnost cijanobakterija da produkuju veliki broj različitih ugljenih hidrata svakako da bi u budućim istraživanjima trebalo ispitati produkciju i drugih tipova šećera kao i uticaj različitih faktora (na primer azota) na produkciju istih.

#### 4.6. Testiranje biološke aktivnosti terestričnih cijanobakterija izolovanih iz šumskih ekosistema

Kao jedna od najstarijih grupa prokariotskih, fotoautotrofnih mikroorganizama, cijanobakterije predstavljaju široko rasprostranjene mikroorganizme sa raznovrsnim metaboličkim strategijama u cilju preživljavanja u različitim uslovima životne sredine. Upravo zbog toga, cijanobakterije terestričnih staništa predstavljaju izuzetno zanimljivu grupu mikroorganizama za ispitivanje ne samo osnovnih ekofizioloških svojstava već i produkcije različitih biološki aktivnih metabolita. Imajući u vidu da je većina studija o cijanobakterijama uglavnom vezana za cijanobakterije vodenih ekosistema i da na teritoriji Republike Srbije do sada nije rađena karakterizacija zemljišnih cijanobakterijskih sojeva poreklom iz šumskih ekosistema biohemijska i genetička karakterizacija šumskih zemljišnih cijanobakterija od izuzetne je važnosti u cilju utvrđivanja njihove sposobnosti produkcije biološki aktivnih jedinjenja kao potencijala njihove moguće biotehnološke primene.

#### 4.7. Određivanje antimikrobne aktivnosti cijanobakterija

Ispitivanjem antibakterijske aktivnosti dobijeni su rezultati koji pokazuju da je 16 testiranih cijanobakterijskih sojeva ispoljilo antibakterijsku aktivnost na najmanje jednu Gr+ ili Gr- bakteriju. Među testiranim bakterijama, Gr+ bakterije bile su osetljivije na ekstrakte testiranih cijanobakterija u odnosu na Gr- bakterije (Tabela 29 i 30). Antibakterijska aktivnost je zavisila od kombinacije cijanobakterijski – bakterijski soj kao i od tipa ekstrakta.

U slučaju Gram + bakterija, najosetljiviji bakterijski soj bio je *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. Na *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 delovalo je čak 13 cijanobakterijskih sojeva (75% MeOH ekstrakti) pri čemu su najpotentniji sojevi bili *Tolypothrix* K11, *Cylindrospermum* K1 kao i *Nostoc* SP5 (Tabela 29). Sa druge strane, za razliku od 75% MeOH ekstrakata 100% heksanski ekstrakti ispoljili su daleko slabiji inhibicioni efekat na rast *E. faecalis* ATCC 19433. Odnosno, u slučaju 100% heksanskih ekstrakata zone inhibicije dobijene za dva ponavljanja uočene su samo kod jednog cijanobakterijskog soja, *Phormidium* K15 (16 mm; 14 mm). Pored *E. faecalis* ATCC 19433, testirani Gr+ bakterijski soj koji se takođe pokazao osetljivijim na testirane cijanobakterijske ekstrakte bio je *Bacillus subtilis* ATCC 6633. U slučaju *B. subtilis* ATCC 6633 9 testiranih cijanobakterijskih 75% MeOH ekstrakata ispoljilo je inhibicioni efekat i najveće zone inhibicije dobijene su kod sojeva *Lyngbya* T7 (30 mm; 14 mm) i *Oscillatoria* M2 (16 mm; 20 mm). Sa druge strane, u slučaju 100% heksanskih ekstrakata uočeno je odsustvo zona inhibicija. Odnosno, nijedan od 20 testiranih heksanskih ekstrakata nije delovao inhibiciono na rast *B. subtilis* ATCC 6633. U slučaju testirane Gram+ bakterije, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, i metanolni i heksanski cijanobakterijski ekstrakti ispoljili su slabiji inhibicioni efekat. Inhibicioni efekat 75% MeOH ekstrakata na rast *S. aureus* ATCC 25923 ispoljila su samo tri soja *Oscillatoria* M2, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1 pri čemu su dobijene zone inhibicije za date sojeve bile dosta slične (10 i 8 mm, 10 i 8 mm, 8 i 8 mm). Sa druge strane, među 100% heksanskim ekstraktima, ekstrakti dva soja *Nostoc* T7 i *Phormidium* K15 ispoljila su negativan efekat na rast *S. aureus*.



Tabela 29. Rezultati disk difuzione metode dobijeni za dva tipa cijanobakterijskih ekstrakata (75% metanolnih i 100% heksanskih) testiranih na Gr+ bakterije

Testirani bakterijski sojevi	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Cijanobakterijski sojevi	75% MeOH	100% heksan	75% MeOH	100% heksan	75% MeOH	100% heksan
<i>Nostoc</i> M1	12;10	n.d.	10; 8	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> M2	8; 8	n.d.	8; 8	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> M2	16; 20	n.d.	10; 8	n.d.	8; 8	n.d.
<i>Phormidium</i> M1	n.d.*	n.d.	11; 8	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> M2	14; 12	n.d.	8; 8	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> SP2	16; 10	n.d.	8; 12	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> SP2	n.d.	n.d.	8; 10	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> SP5	n.d.	n.d.	10; 10	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T7	13; 11	n.d.	8; 8	n.d.	n.d.	10; 18
<i>Lyngbya</i> T7	30; 14	n.d.	8; 8	n.d.	10; 8	n.d.
<i>Phormidium</i> T11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T18	8; 8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> T18	8; 13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Cylindrospermum</i> K1	n.d.	n.d.	12; 12	n.d.	10; 8	n.d.
<i>Lyngbya</i> K10	n.d.	n.d.	10; 8	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K11	n.d.	n.d.	14; 12	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> K15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> K15	n.d.	n.d.	n.d.	16; 14	n.d.	10; 16
<i>Tolypothrix</i> K15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

\*n.d. – nije detektovana inhibicija rasta

U slučaju Gram negativnih bakterija, 75% MeOH ekstrakti također su ispoljili veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa heksanskim ekstraktima. Među testiranim Gr- bakterijama najosjetljiviji bakterijski soj bio je *Proteus mirabilis* ATCC 12453 na koji je delovalo 6 cijanobakterijskih ekstrakata. Među testiranim cijanobakterijskim sojevima 75% MeOH ekstrakt soja *Calothrix* M2 pokazao se kao najpotentniji s obzirom da su za dati soj dobijene najveće zone inhibicije (26 mm; 12 mm). Pored toga, 75% MeOH ekstrakt soja *Cylindrospermum* K1 također je ispoljio značajan inhibitorski efekat na rast *P. mirabilis* ATCC 12453 (zone inhibicije iznosile su 12 mm). Za razliku od 75% MeOH ekstrakata, 100% heksanski ekstrakti ispoljili su slabiji inhibitorski efekat na rast *P. mirabilis* ATCC 12453. U slučaju heksanskih ekstrakata zone inhibicije uočene su samo kod tri testirana cijanobakterijska soja (*Oscillatoria* M2, *Phormidium* M1 i *Nostoc* T18) pri čemu je najveći inhibitorski efekat na rast bakterijske kulture ispoljio soj *Nostoc* T18 (22 mm; 20 mm). U slučaju preostale dve testirane Gram- bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35544 i *Escherichia coli* ATCC 11229, vrlo mali broj cijanobakterijskih sojeva delovao je inhibitorski na rast istih. Na bakterijski soj *P. aeruginosa* delovali su samo 75% MeOH ekstrakti dva cijanobakterijska soja *Calothrix* M2 i *Cylindrospermum* K1. Sa druge strane, heksanski ekstrakti nisu ispoljili inhibitorski efekat na rast *P. aeruginosa* ATCC 35544. U slučaju testirane Gr- bakterije, *E. coli*

ATCC 11229, jedan cijanobakterijski soj (*Lyngbya* T7, 75% MeOH ekstrakt) delovao je inhibitorno na rast pomenute bakterijske kulture. Shodno tome, među testiranim Gr-bakterijama *E. coli* ATCC 11229 predstavljala je najrezistentniji bakterijski soj prema testiranim ekstraktima.

Tabela 30. Rezultati disk difuzione metode dobijeni za dva tipa cijanobakterijskih ekstrakata (75% metanolnih i 100% heksanskih) testiranih na Gr- bakterije

Testirani bakterijski sojevi	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 35544	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 35544	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453
Cijanobakterijski sojevi	75% MeOH	100% heksan	75% MeOH	100% heksan	75% MeOH	100% heksan
<i>Nostoc</i> M1	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	12; 8	n.d.
<i>Anabaena</i> M2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> M2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,10	10; 10
<i>Phormidium</i> M1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8; 6	10; 8
<i>Calothrix</i> M2	10; 8	n.d.	n.d.	n.d.	26; 12	n.d.
<i>Oscillatoria</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> SP5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Lyngbya</i> T7	n.d.	n.d.	10; 10	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> T11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22; 20
<i>Oscillatoria</i> T18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Cylindrospermum</i> K1	10; 10	n.d.	n.d.	n.d.	12; 12	n.d.
<i>Lyngbya</i> K10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10; 10	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> K15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> K15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

\*n.d. – nije detektovana inhibicija rasta

MIC i MBC vrednosti su određene za cijanobakterije koje su ispoljile antibakterijsku aktivnost. U slučaju najosetljivijeg bakterijskog soja *E. faecalis* ATCC 19433 MIC vrednosti su se kretale u opsegu od  $1,67 \pm 0,08$  mg/ml do  $3,33 \pm 0,17$  mg/ml, dok je raspon MBC vrednosti bio od  $2 \pm 0,1$  mg/ml do  $5 \pm 0,25$  mg/ml (Tabela 31). Najpotentniji cijanobakterijski sojevi bili su *Nostoc* SP5, *Nostoc* T7, *Lyngbya* T7 i *Lyngbya* K10 i kod datih sojeva MBC vrednost je iznosila  $2 \pm 0,1$  mg/ml. Značajan antimikrobni efekat na testirani bakterijski soj ispoljili su i *Oscillatoria* SP2 i *Anabaena* M2 sa zabeleženim MBC vrednostima od  $2,31 \pm 0,12$  mg/ml. U slučaju druge testirane Gram pozitivne bakterije *B. subtilis* ATCC 6633, 9 cijanobakterijskih sojeva ispoljilo je inhibitorni efekat. Kod datog bakterijskog soja, MIC vrednosti su se kretala u rasponu od  $0,45 \pm 0,02$  mg/ml do  $1,67 \pm 0,08$  mg/ml. Na osnovu dobijenih MBC vrednosti, najpotentnijim sojevima pokazali su se *Nostoc* T18, *Oscillatoria* T18 i *Oscillatoria* M2 kod kojih je zabeležena MBC vrednost iznosila  $0,91 \pm 0,04$  mg/ml. Potentnim sojem sa antimikrobnom aktivnošću

pokazao se i *Nostoc* T7 ( $1,67 \pm 0,08$  mg/ml). U slučaju *B. subtilis* ATCC 6633 cijanobakterijski soj *Calothrix* M2 ispoljio je najslabiju antibakterijsku aktivnost (MBC  $<4,74 \pm 0,24$ ). Na Gram+ bakteriju *S. aureus* ATCC 25923, antimikrobni efekat ispoljila su samo tri soja pri čemu je opseg MIC vrednosti bio od  $1,3 \pm 0,06$  mg/ml (*Lyngbya* T7) do  $1,93 \pm 0,1$  mg/ml (*Oscillatoria* M2); odnosno MBC vrednosti kretale su se u rangu od  $1,67 \pm 0,08$  mg/ml (*Lyngbya* T7) do  $2,31 \pm 0,11$  mg/ml (*Oscillatoria* M2, *Cylindrospermum* K1). Soj sa najjačom antimikrobnom aktivnošću na rast *S. aureus* ATCC 25923 bio je *Lyngbya* T7.

Na *P. mirabilis* ATCC 12453 delovalo je 6 cijanobakterijskih sojeva sa MIC vrednostima koje su se kretale u opsegu od  $0,91 \pm 0,04$  mg/ml (*Oscillatoria* M2, *Phormidium* M1, *Calothrix* M2, *Cylindrospermum* K1, *Lyngbya* K10) do  $2,86 \pm 0,14$  mg/ml (*Nostoc* M1) i MBC vrednostima koje su bile u opsegu od  $1,30 \pm 0,06$  mg/ml (*Phormidium* M1, *Cylindrospermum* K1) do  $4,12 \pm 0,21$  mg/ml (*Nostoc* M1). Sojevi koji su ispoljili značajan antimikrobni efekat na rast *P. mirabilis* ATCC 12453 bili su *Cylindrospermum* K1 i *Phormidium* M1. U slučaju dve testirane Gram negativne bakterije (*P. aeruginosa* ATCC 35544 i *E. coli* ATCC 11229), od ukupno 20 testiranih cijanobakterijskih sojeva antimikrobni efekat ispoljila su samo dva odnosno jedan testirani cijanobakterijski soj. U slučaju *P. aeruginosa* ATCC 35544, antibakterijski efekat uočen je kod dva filamentozna heterocistna soja (*Calothrix* M1 i *Cylindrospermum* K1) pri čemu se potentnijim pokazao *Cylindrospermum* K1 (MIC  $1,30 \pm 0,06$  mg/ml). U slučaju bakterijskog soja *E. coli* ATCC 11229, samo jedan cijanobakterijski soj (*Lyngbya* T7) delovao je inhibitoryno na rast (MIC  $0,91 \pm 0,04$  mg/ml; MBC  $1,67 \pm 0,08$  mg/ml).

Tabela 31. Rezultati MBC i MIC vrednosti dobijeni testiranjem cijanobakterijskih sojeva

Testirani sojevi (bakterijski i cijanobakterijski sojevi)		MBC vrednosti mg/ml	MIC vrednosti mg/ml
<b><i>E. faecalis</i> ATCC 19433</b>			
1	<i>Nostoc</i> M1	$4,44 \pm 0,22$	$2,86 \pm 0,14$
2	<i>Anabaena</i> M2	$2,31 \pm 0,11$	$2 \pm 0,1$
3	<i>Oscillatoria</i> M2	$4,44 \pm 0,22$	$2 \pm 0,1$
4	<i>Phormidium</i> M1	$5 \pm 0,25$	$1,80 \pm 0,09$
5	<i>Calothrix</i> M2	$2,86 \pm 0,14$	$2,31 \pm 0,11$
6	<i>Oscillatoria</i> SP2	$2,31 \pm 0,11$	$2 \pm 0,1$
7	<i>Anabaena</i> SP2	$3,33 \pm 0,17$	$2,86 \pm 0,14$
8	<i>Nostoc</i> SP5	$2 \pm 0,1$	$1,67 \pm 0,08$
9	<i>Nostoc</i> T7	$2 \pm 0,1$	$1,67 \pm 0,08$
10	<i>Lyngbya</i> T7	$2 \pm 0,1$	$1,67 \pm 0,08$
11	<i>Cylindrospermum</i> K1	$3,75 \pm 0,19$	$2,31 \pm 0,11$
12	<i>Lyngbya</i> K10	$2 \pm 0,1$	$1,80 \pm 0,09$
13	<i>Tolypothrix</i> K11	$3,75 \pm 0,19$	$3,33 \pm 0,17$
<b><i>B. subtilis</i> ATCC 6633</b>			
1	<i>Nostoc</i> M1	$2,31 \pm 0,11$	$0,45 \pm 0,02$
2	<i>Anabaena</i> M2	$2,31 \pm 0,11$	$0,45 \pm 0,02$
3	<i>Oscillatoria</i> M2	$0,91 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,02$
4	<i>Calothrix</i> M2	$<4,74 \pm 0,24$	$0,91 \pm 0,04$

5	<i>Oscillatoria</i> SP2	2,31±0,11	1,67±0,08
6	<i>Nostoc</i> T7	1,67±0,08	0,45±0,02
7	<i>Lyngbya</i> T7	2,31±0,11	1,67±0,08
8	<i>Nostoc</i> T18	0,91±0,04	0,45±0,02
9	<i>Oscillatoria</i> T18	0,91±0,04	0,45±0,02
<b><i>S. aureus</i> ATCC 25923</b>			
1	<i>Oscillatoria</i> M2	2,31±0,11	1,93±0,1
2	<i>Lyngbya</i> T7	1,67±0,08	1,30±0,06
3	<i>Cylindrospermum</i> K1	2,31±0,11	1,67±0,08
<b><i>P. mirabilis</i> ATCC 12453</b>			
1	<i>Nostoc</i> M1	4,12±0,21	2,86±0,14
2	<i>Oscillatoria</i> M2	2±0,1	0,91±0,04
3	<i>Phormidium</i> M1	1,30±0,06	0,91±0,04
4	<i>Calothrix</i> M2	2±0,1	0,91±0,04
5	<i>Cylindrospermum</i> K1	1,30±0,06	0,91±0,04
6	<i>Lyngbya</i> K10	2,31±0,11	0,91±0,04
<b><i>P. aeruginosa</i> ATCC 35544</b>			
1	<i>Calothrix</i> M2	<4,74±0,24	2,31±0,11
2	<i>Cylindrospermum</i> K1	2±0,1	1,30±0,06
<b><i>E. coli</i> ATCC 11229</b>			
1	<i>Lyngbya</i> T7	1,67±0,08	0,91±0,04

Imajući u vidu da cijanobakterije predstavljaju Gram- bakterije na osnovu građe ćelijskog zida, očekivano je da su Gram+ bakterije osjetljivije na ekstrakte cijanobakterija. Shodno tome, moguće je očekivati da će cijanobakterije u većoj meri proizvoditi supstance koje ne deluju na Gram negativne bakterije, odnosno koje nisu autotoksične (Simeunović, 2009). Do sličnih rezultata došli su takođe i Jaki i sar. (1999) koji su pokazali da je veći procenat (18.3 %) testiranih ekstrakata (metanolnih-lipofilnih i hidrofilnih) bilo aktivno na Gram pozitivne bakterije, dok je 5,8% bilo aktivno na Gram negativne bakterije. Silva-Stenico i sar. (2011) su pokazali da je 30% ekstrakata nekoliko testiranih cijanobakterijskih rodova bilo aktivno protiv Gram pozitivnih bakterija, dok je u slučaju Gram negativnih bakterija 17% testiranih sojeva ispoljilo antibakterijsku aktivnost.

U slučaju testiranih terestričnih cijanobakterijskih sojeva iz rodova *Nostoc* i *Anabaena* 41% testiranih sojeva ispoljilo je antibakterijsku aktivnost na Gram pozitivne bakterije (Svirčev i sar., 2008). Rezultati Svirčev i sar. (2008) u saglasnosti su sa nalazima Jaki i sar. (1999) koji su pokazali da je 48,8% testiranih cijanobakterijskih sojeva bilo sposobno da produkuje antimikrobna jedinjenja. U ovom radu broj sposobnih sojeva da produkuju jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću zavisio je od kombinacije cijanobakterijski – bakterijski soj. U slučaju najosetljivijeg Gr+ bakterijskog soja (*E. faecalis* ATCC 19433) 65% sojeva ispoljilo je antimikrobni efekat. Na *B. subtilis* ATCC 6633 45% testiranih sojeva ispoljilo je antibakterijsku aktivnost, dok je na *S. aureus* ATCC 25923 delovalo 15% sojeva. Silva-Stenico i sar. (2011) takođe su ustanovili da *B. subtilis* predstavlja veoma osjetljivu Gram pozitivnu bakteriju na koju je antimikrobni efekat ispoljilo čak 77% testiranih ekstrakata cijanobakterija. Sa druge strane, u slučaju Gram- bakterija sposobnost produkcije antimikrobnih jedinjenja u ovom radu uočena

je kod 30% sojeva u slučaju *P. mirabilis* ATCC 12453. Na *P. aeruginosa* ATCC 35544 delovalo je 10% sojeva, dok je na *E. coli* ATCC 11229 delovalo 5% sojeva.

Uočene razlike u osetljivosti između Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija takođe mogu ukazati i na različit permeabilitet jedinjenja cijanobakterija (Martins i sar., 2008). Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima prethodnih istraživanja da je penetracija aktivnih jedinjenja u Gr- bakterije otežana zbog prisustva daleko kompleksnije višeslojne strukture ćelijskog zida sa dodatnim lipopolisaharidima na spoljašnjoj površini ćelija u odnosu na Gr+ bakterije (Ördörg i sar., 2004). Martins i sar. (2008) su istakli da i pored netoksičnog efekta cijanobakterijskih ekstrakata na Gram negativne bakterije, postoji mogućnost da jedinjenja cijanobakterija menjaju permeabilitet spoljašnje ćelijske membrane. Posledično, ove promene bi mogle da pospeše unos jedinjenja sa antibakterijskim efektom, naročito hidrofobnih, kao što je pokazano za mikrocistin-RR (Dixon i sar., 2004). Štaviše, poznato je da određeni molekuli kao što su terpenoidi i fenoli mogu destabilizovati lipopolisaharidni omotač bakterija (Helander i sar., 1998). U prilog ovome govori i činjenica da su antibiotski efekti prouzrokovani posebnim jedinjenjima različitim od cijanotoksina (Campbell i sar., 1994; Lahti i sar., 1995; Østensvik i sar., 1998) ukazujući na raznovrsnost metaboličkih produkata cijanobakterija sa antibakterijskom aktivnošću. Za razliku od eukariota na koje bioaktivni molekuli cijanobakterija mogu da deluju toksično, BAM cijanobakterija koji deluju na prokariote imaju antibiotski efekat (Asthana i sar., 2006) i mogu pripadati nekoj od klasa jedinjenja kao što su alkaloidi, peptidi, terpenoidi, masne kiseline.

U odnosu na tip ekstrakta, metanolni ekstrakti testiranih cijanobakterija pokazali su se daleko efikasnijim u odnosu na heksanske ekstrakte. Imajući u vidu da metanol predstavlja polaran rastvarač a da je heksan nepolaran, dobijeni rezultati ukazuju da su jedinjenja cijanobakterija sa antibakterijskom aktivnošću pretežno polarna jedinjenja. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Ghasemi i sar. (2009) koji su pokazali da testirani nepolarni heksanski ekstrakti cijanobakterija nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost i da su jedinjenja sa antimikrobnim efektom uglavnom polarna jedinjenja. Pored toga, u ranijim istraživanjima isti autori su istakli da je antibakterijska aktivnost veća u supernatantima kultura i metanolnim ekstraktima (Ghasemi i sar., 2007). Sa druge strane, Mundt i sar. (2003) su pokazali da su n-heksanski ekstrakti dobijeni iz biomase laboratorijski kultivisane cijanobakterije *Oscillatoria redeki* ispoljili aktivnost na različite Gram pozitivne bakterije. U slučaju testiranih Gram pozitivnih bakterija u ovom radu, heksanski ekstrakti dva testirana cijanobakterijska soja ispoljili su inhibitorni efekat na *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*Phormidium* K15 i *Nostoc* T7) dok je na bakterijski soj *E. faecalis* ATCC 19433 delovao samo jedan cijanobakterijski soj, *Phormidium* K15. Sa druge strane, u slučaju Gram+ bakterije *B. subtilis* ATCC 6633 heksanski ekstrakti testiranih sojeva nisu ispoljili inhibitorni efekat. U slučaju Gram- bakterija, jedini bakterijski soj koji se pokazao osetljivim na heksanske ekstrakte bio je *P. mirabilis* ATCC 12453.

Pored uočenih razlika između 75% MeOH ekstrakata i heksanskih ekstrakata, rezultati Simeunović (2005) dobijeni testiranjem cijanobakterija izolovanih sa područja Vojvodine su pokazali da 75% metanolni ekstrakti pokazuju jači inhibitorni efekat u odnosu na 100% metanolne ekstrakte, ukazujući na prirodu antibakterijskih supstanci, koje se očigledno bolje izdvajaju iz ćelije vodenim 75% metanolom. Pored toga, preliminarna istraživanja antibakterijske aktivnosti tri različita tipa ekstrakata (metanolni, DMSO i vodeni ekstrakti)

cijanobakterijske vrste *Fischerella* sp. pokazala su da u poređenju sa DMSO i vodenim ekstraktima, samo metanolni ekstrakti cijanobakterija ispoljavaju antibakterijsku aktivnost (Asthana i sar., 2006). Do sličnih rezultata došao je i Skulberg (2000) koji je pokazao da metanolni ekstrakti ispoljavaju bolju antibakterijsku aktivnost, odnosno da je antibakterijska aktivnost posebno povezana sa lipofilnim ekstraktima (Mundt i sar., 2001). Takođe, Biondi i sar. (2008) su utvrdili da je najveća antibakterijska, antifungalna i citotoksična aktivnost dobijena u slučaju etil acetatnih ekstrakata cijanobakterijskih izolata.

Pored toga, selekcija odgovarajućeg medijuma kritičan je proces s obzirom da antimikrobna aktivnost u nekim slučajevima može biti povećana i do tri puta nakon optimizacije medijuma (Egorov, 1985). Primećena razlika u obimu produkcije sekundarnih metabolita kod cijanobakterija može biti pripisana sredinski uslovljenim iskorišćavanjem intermedijernih metabolita (Poliquin i sar., 2004). Tako su Caicedo i sar. (2011) pokazali da je najveća antimikrobna aktivnost cijanobakterija uočena nakon 3 nedelje kultivacije. Pored toga, prema Egorov (1985) maksimalna antimikrobna aktivnost postignuta je nakon dostizanja maksimalne produkcije biomase. Do sličnih rezultata došli su i Issa (1999) koji su pokazali da je maksimalna antimikrobna aktivnost kod testiranih cijanobakterija iz rodova *Oscillatoria* i *Calothrix* postignuta u post eksponencijalnoj fazi rasta, što je bio slučaj i sa vrstom *Synechococcus leopoliensis* (Noaman i sar., 2004). Imajući u vidu značaj faktora spoljašnje sredine na produkciju bioaktivnih metabolita kod cijanobakterija, Falch i sar. (1995) su istakli da sadržaj sekundarnih metabolita kao i biološka aktivnost cijanobakterija zavisi uglavnom od uslova sredine s obzirom da veliki broj biotičkih i abiotičkih faktora utiču na produkciju bioaktivnih komponenti (Abedin i Taha, 2008). Pokazano je da promene u temperaturi i nutrijentima utiču na produkciju enzima, antibakterijskih, antifungalnih, antikancerogenih jedinjenja u monokulturama cijanobakterija u laboratorijskim uslovima (Biondi i sar., 2008; Selvin i sar., 2009). U skladu sa tim, promene nekih od parametara uslova gajenje mogle bi potencijalno doprineti potentnijem antimikrobnom efektu sojeva testiranih u ovom radu. Posebno potentnim sojevima sa sposobnošću sinteze jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću pokazali su se sojevi *Oscillatoria* M2, *Calothrix* M2, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1.

Međutim, s obzirom da su u ovom radu testirani sirovi ekstrakti dobijeni rezultati ne ukazuju i ne definišu antibakterijske supstance već ukazuju na širok spektar antibakterijske aktivnosti testiranih cijanobakterija i njihov potencijal kao producenata antimikrobnih jedinjenja. Upravo zbog toga, u cilju identifikacije potencijalnih jedinjenja odgovornih za uočenu ispoljenu antibakterijsku aktivnost izvršena je karakterizacija masno kiselinskog sastava primenom gasne hromatografije GC-FID s obzirom na poznatu antibakterijsku aktivnost masnih kiselina. Pored toga, značaj prirodnih produkata sa antibakterijskim efektom ogleđa se u činjenici da zbog česte pojave neželjenih efekata povezanih sa upotrebom sintetičkih antimikrobnih jedinjenja, prirodna antimikrobna jedinjenja imaju ogroman terapijski potencijal (Prakash i sar., 2011). Na osnovu dobijenih rezultata u ovom radu, terestrične cijanobakterije šumskih ekosistema mogu biti značajan izvor jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću efikasnim naročito protiv Gram+ bakterija.

#### 4.8. Hemijska karakterizacija i određivanje sastava masnih kiselina nakon transesterifikacije sa bor(III)-fluoridom metodom gasne hromatografije (CG-FID)

Primenom metode gasne hromatografije GC-FID ispitivano je prisustvo ukupno 36 masnih kiselina u testiranim uzorcima cijanobakterija prikazanih u Tabeli 32 (Prilog 6). Na osnovu dobijenih rezultata od ukupnog broja testiranih masnih kiselina u uzorcima zemljišnih cijanobakterija identifikovano je ukupno 14 masnih kiselina (Tabela 32, Prilog 6).

Rezultati analize masno kiselinskog sastava testiranih cijanobakterija ukazuju da je najzastupljenija masna kiselina bila 18-to ugljenična linolna kiselina (LA) identifikovana kod svih 20 testiranih zemljišnih cijanobakterija (Tabela 33). Zbog posedovanja višestrukih dvostrukih veza, LA spada u polinezasićene omega-6 masne kiseline. Međutim, LA je daleko značajnija sa aspekta da pripada familiji esencijalnih masnih kiselina (18;2n6c) i dobijeni rezultati ukazuju da cijanobakterijski sojevi izolovani iz šumskih ekosistema mogu biti značajni producenti ove esencijalne masne kiseline. Procentualna zastupljenost LA kretala se u rasponu od 6,93% (*Anabaena* M2) do 58,94% (*Phormidium* T11) što je ujedno predstavljalo i najveću registrovanu vrednost u ovom radu. U poređenju sa terestričnim sojevima izolovanim iz različitih tipova zemljišta sa teritorije Vojvodine (*Anabaena* LC<sub>1</sub>B 19,59%, *Nostoc* S<sub>8</sub> 16,00%, *Nostoc* 2S<sub>3</sub>B 20,09% i *Nostoc* 2S<sub>1</sub> 15,64%) (Kovač i sar., 2014), terestrične cijanobakterije šumskih ekosistema pokazale su se kao potentniji producenti LA.

Masne kiseline koje su takođe dominirale i koje su bile zastupljene kod 19 cijanobakterijskih sojeva, bile su dve 18-to ugljenične masne kiseline, oleinska kiselina (18;1n9c) i  $\alpha$ -linoleinska kiselina (ALA, 18;3n3). Oleinska kiselina, mononezasićena masna kiselina koja spada u omega-9 masne kiseline, bila je zastupljena u najmanjem procentu kod soja *Anabaena* M2 (1,93%) dok je kod soja *Oscillatoria* T18 bila zastupljena u najvećoj količini (23,64%). Jedini cijanobakterijski soj kod koga nije detektovano prisustvo oleinske kiseline bio je *Nostoc* K15. U poređenju sa rezultatima Kovač i sar. (2014) *Oscillatoria* T18 (23,64%) se pokazala kao bolji producent oleinske kiseline u odnosu na najpotentniji soj u datoj studiji *Anabaena* LC<sub>1</sub>B (13,22%). U slučaju treće najzastupljenije masne kiseline  $\alpha$ -linolna kiselina (ALA), omega-3 masne kiseline (18;3n3), u svim testiranim sojevima identifikovano je prisustvo iste sa izuzetkom soja *Calothrix* SP2. Zastupljenost ALA kretala se od 2,58% (*Calothrix* M2) do 43,15% (*Tolypothrix* K11).

Pored karboksilnih kiselina sa 18-ugljenika dugim lancem, masne kiseline sa 16-ugljenika dugim lancem takođe su bile prisutne kod većine testiranih sojeva. Od ukupno 20 analiziranih zemljišnih sojeva cijanobakterija, palmitinska kiselina (16;0) kao i palmitoleinska kiselina (16;1) bile su zastupljene kod 17 testiranih sojeva. Palmitinska kiselina, zasićena masna kiselina iz koje tokom sinteze masnih kiselina nastaju duže masne kiseline, bila je prisutna kod svih testiranih sojeva sa izuzetkom tri soja (*Calothrix* SP2, *Phormidium* T11 i *Tolypothrix* K11). Zastupljenost palmitinske kiseline kretala se u opsegu od 17,66% (*Anabaena* SP2) do 32,11% (*Calothrix* M2). Rezultati Kovač i sar. (2014) su pokazali da se zastupljenost 16:0 kod testiranih zemljišnih sojeva kretala u opsegu od 12,23% (*Nostoc* S<sub>8</sub>) do 21,57% (*Anabaena* LC<sub>1</sub>B). U slučaju palmitoleinske kiseline, omega-7 mononezasićene masne kiseline, tri soja kod kojih nije utvrđeno prisustvo ove kiseline pripadala su rodu *Oscillatoria* (*Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18 i *Oscillatoria* SP2). U slučaju preostalih 17 sojeva kod kojih je identifikovano prisustvo palmitoleinske kiseline najmanja količina detektovana je kod soja *Phormidium* M1 (3,83%)



dok je najveća količina zabeležena kod soja *Anabaena* SP2 (34,66%). U odnosu na terestrične cijanobakterije sa teritorije Vojvodine kod kojih se zastupljenost palmitoleinske kiseline (16:1) kretala od 24,83% (*Nostoc* 2S<sub>3</sub>B) do 36,75% (*Nostoc* 2S<sub>1</sub>) (Kovač i sar., 2014) sojevi izolovani iz šumskih ekosistema testirani u ovom radu pokazali su se kao slabiji producenti.

Stearinska kiselina (zasićena masna kiselina sa 18 ugljenika dugim lancom 18:0) i lignocerinska kiselina (zasićena masna kiselina sa 24 ugljenika dugim lancom 24:0) bile su zastupljene kod 40% odnosno 35% testiranih sojeva. Prisustvo stearinske kiseline identifikovano je kod osam sojeva (*Anabaena* M2, *Calothrix* M2, *Oscillatoria* SP2, *Nostoc* T7, *Calothrix* SP2, *Phormidium* K15, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1). Međutim, u poređenju sa gore pomenutim češće prisutnim masnim kiselinama, stearinska kiselina je bila prisutna u nižim količinama koje su se kretale u opsegu od 0,92% (*Anabaena* M2) do 4,26% (*Calothrix* SP2). Dobijeni rezultati bili su u saglasnosti sa rezultatima Kovač i sar. (2014) koji su zabeležili da je stearinska kiselina bila prisutna kod testiranih zemljišnih sojeva u opsegu od 0,47% (*Nostoc* S<sub>8</sub>) do 3,11% (*Nostoc* 2S<sub>3</sub>B). U slučaju lignocerinske kiseline, prisustvo ove zasićene masne kiseline registrovano je kod 7 testiranih sojeva cijanobakterija. Cijanobakterijski sojevi kod kojih je identifikovano prisustvo lignocerinske kiseline bili su *Oscillatoria* M2, *Phormidium* M1, *Lyngbya* K10, *Nostoc* K15, *Nostoc* T18, *Phormidium* K15 i *Lyngbya* T7. Sadržaj lignocerinske kiseline kretao se od 1,64% (*Lyngbya* T7) do 9,73% (*Nostoc* K15).

Kod nešto manjeg broja sojeva (20% testiranih sojeva) identifikovano je prisustvo miristinske kiseline (zasićene masne kiseline sa 14 ugljenika dugim lancom 14:0) i trikozilne kiseline (zasićene masne kiseline sa 23 ugljenika dugim lancom 23:0). Prisustvo miristinske kiseline registrovano je u slučaju 4 cijanobakterijska soja (*Lyngbya* K10, *Phormidium* K15, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1). Kod datih sojeva, miristinska kiselina bila je prisutna u veoma malim količinama koje su se kretale u opsegu od 0,69% (*Cylindrospermum* K1) do 2,49% (*Lyngbya* K10). Kovač i sar. (2014) takođe su pokazali da je zastupljenost date kiseline bila veoma niska kod sojeva iz roda *Anabaena* (*Anabaena* LC1B - 0,54%) i *Nostoc* (*Nostoc* S<sub>8</sub> - 0,66%, *Nostoc* 2S<sub>3</sub>B - 0,66% i *Nostoc* 2S<sub>1</sub> - 0,68%). Cijanobakterijski sojevi testirani u ovoj tezi kod kojih je utvrđeno prisustvo trikozilne kiseline bili su *Lyngbya* K10, *Nostoc* T7, *Phormidium* K15 i *Lyngbya* T7. Kod datih cijanobakterijskih sojeva količine trikozilne kiseline kretale su se od 1,95% (*Nostoc* T7) do 13,54% (*Phormidium* K15).

Kod tri soja (*Tolypothrix* K11, *Phormidium* K15 i *Lyngbya* T7) identifikovano je prisustvo linoleinske kiseline (TFA) koja spada u omega trans 6-masne kiseline i koja predstavlja geometrijski izomer TA kiseline. Linoleinska kiselina bila je prisutna u opsegu od 1,14% (*Phormidium* K15 i *Lyngbya* T7) do 7,27% (*Tolypothrix* K11). Masne kiseline identifikovane kod samo dva soja cijanobakterija bile su  $\gamma$ -linoleinska kiselina (GLA) i eikozapentaenska kiselina (EPA).  $\gamma$ -linoleinska kiselina (GLA) (omega 6 masna kiselina 18:3n6c) identifikovana je kod sojeva *Calothrix* M2 (25,34%) i *Calothrix* SP2 (49,28%). Eikozapentaenska kiselina (polinezasićena masna kiselina 20:5n3) bila je prisutna u malim količinama kod sojeva *Phormidium* K15 (2,54%) i *Cylindrospermum* K1 (2,57%). Masne kiseline identifikovane samo kod jednog testiranog cijanobakterijskog soja bile su laurinska kiselina (12:0) i cis-10-pentadekanska kiselina (15:1). Laurinska kiselina, zasićena masna kiselina sa 12 ugljenika dugim lancom, identifikovana je samo kod soja *Tolypothrix* K15 (5,77%). Cis-10-pentadekanska kiselina, nezasićena masna kiselina sa 15 ugljenika dugim lancem, identifikovana je samo kod soja *Cylindrospermum* K1 (6,28%).

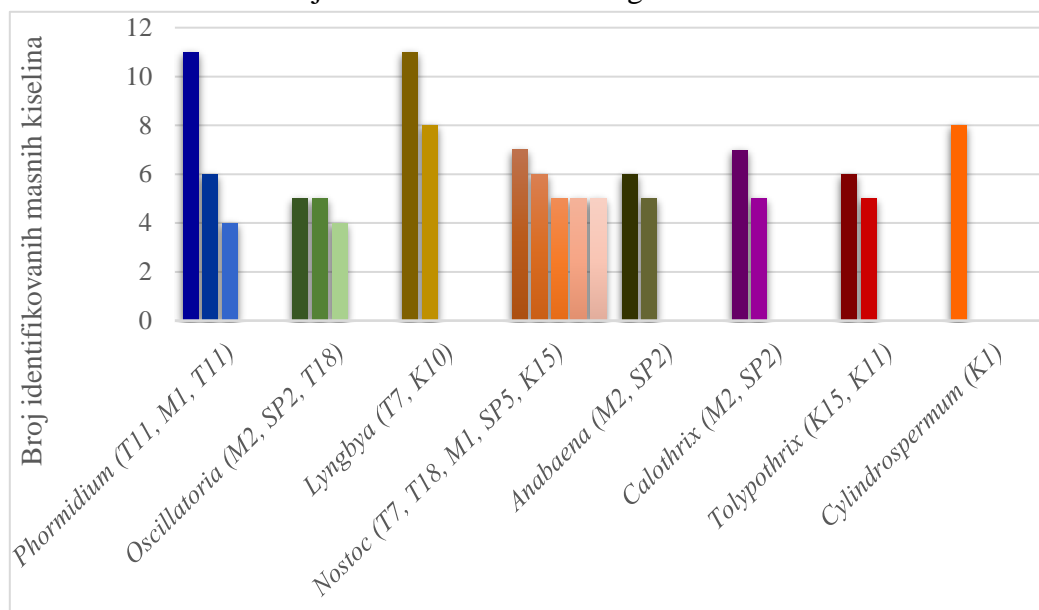
Dobijeni nalazi u skladu su sa rezultatima Temina i sar. (2007) koji su pokazali da su kod cijanobakterija najčešće prisutne upravo masne kiseline sa 16-ugljenika i 18-ugljenika dugim lancem poput palmitinske kiseline (16:0), palmitoleinske kiseline (16:1), stearinske kiseline (18:0) i oleinske kiseline (18:1). Sve pomenute masne kiseline takođe su identifikovane i kod terestričnih cijanobakterija šumskih ekosistema testiranih u ovom radu. Do sličnih rezultata došli su i Milovanović i sar. (2012) koji su pokazali da su masne kiseline sa 16 ugljenika dugim lancem (16:0 i 16:1) i masne kiseline sa 18 ugljenika dugim lancem (18:1, 18:2 i 18:3) predstavljale najznačajnije konstituente terestričnih vrsta cijanobakterijskih sojeva. Pored toga, rezultati Kovač i sar. (2014) su takođe pokazali da su najznačajniji konstituenti među analiziranim masnim kiselinama kod zemljišnih sojeva roda *Anabaena* i *Nostoc* masne kiseline sa 16 C atoma (16:0 i 16:1) kao i sa 18 C atoma (linolna kiselina 18:2n6c,  $\alpha$ -linolenska kiselina 18:3n3, oleinska kiselina 18:1n9c).

Tabela 33. Procentualna zastupljenost identifikovanih masnih kiselina kod testiranih zemljišnih sojeva cijanobakterija

	N M1*	P M1	A M2	O M2	C M2	O SP2	A SP2	C SP2	N SP5	L T7	N T7	P T11	N T18	O T18	C K1	L K10	T K11	T K15	N K15	P K15
Procentualna zastupljenost (%)																				
12;0**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,77	-	-
14;0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,79	-	-	-	-	0,69	2,49	-	-	-	1,19
15;1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,82	-	-	-	-	-
16;0	21,48	30,92	26,05	21,72	32,11	24	17,66	-	19,72	22,13	28,4	-	20,1	21,7	26,09	21,18	-	28,07	25,62	22,42
16;1	29,66	3,83	21,9	-	13	-	34,66	12,85	33,9	14,47	19,61	10	19,25	-	6,6	12,16	18,78	17,64	21	13,58
18;0	-	-	0,92	-	2,02	1,45	-	4,26	-	1,5	2,27	-	-	-	3,55	-	-	-	-	1,21
18;1n9c	3,01	22,46	1,93	20,78	2,53	19,99	3,44	4,04	3,77	2,2	4,17	11,01	7,54	23,64	12,3	18,12	3,75	4,99	-	3,08
18;2n6t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,14	-	-	-	-	-	-	7,27	-	-	1,14
18;2n6c	13,7	29,35	6,93	13,95	22,43	18,61	15,74	29,56	28,05	35,21	8,07	58,94	16	13,67	28,78	29,75	27	35,11	9,98	33,81
18;3n6c	-	-	-	-	25,34	-	-	49,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18;3n3	32,15	10,74	42,26	38,5	2,58	35,95	28,5	-	14,54	4,68	35,51	20,03	28,71	40,98	15,16	10,77	43,15	8,42	34,03	4,65
20;5n3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,54
23;0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,66	1,95	-	-	-	-	3,83	-	-	-	13,54
24;0	-	2,7	-	5,05	-	-	-	-	-	1,64	-	-	8,38	-	-	1,7	-	-	9,73	2,85

\*N M1 – *Nostoc* M1, A M2 – *Anabaena* M2, O M2 – *Oscillatoria* M2, C M2 – *Calothrix* M2, O SP2 – *Oscillatoria* SP2, A SP2 – *Anabaena* SP2, N SP5 – *Nostoc* SP5, L K10 – *Lyngbya* K10, T K15 – *Tolypothrix* K15, N K15 – *Nostoc* K15, N T7 – *Nostoc* T7, N T18 – *Nostoc* T18, O T18 – *Oscillatoria* T18, C SP2 – *Calothrix* SP2, P T11 – *Phormidium* T11, T K11 – *Tolypothrix* K11, P T11 – *Phormidium* T11, T K11 – *Tolypothrix* K11, P K15 – *Phormidium* K15, L T7 – *Lyngbya* T7, C K1 – *Cylindrospermum* K1

Na osnovu masno kiselinskog sastava urađenog GC-FID analizom dobijeni rezultati ukazali su da masno kiselinski profil predstavlja specifičnost svakog soja. Među testiranim sojevima kao najpotentniji istakli su se *Phormidium* K15 i *Lyngbya* T7 kod kojih je detektovano čak 11 masnih kiselina (Grafik 65). Bogatim prirodnim izvorom masnih kiselina pokazali su se i sojevi *Lyngbya* K10 i *Cylindrospermum* K1 kod kojih je zabeleženo prisustvo ukupno 8 masnih kiselina. U slučaju dva soja, *Calothrix* M2 i *Nostoc* T7, detektovano je prisustvo 7 masnih kiselina. U slučaju 4 cijanobakterijska soja (*Anabaena* M2, *Phormidium* M1, *Tolypothrix* K15 i *Nostoc* T18) identifikovano je ukupno 6 masnih kiselina. Kod većine cijanobakterijskih sojeva, uključujući *Nostoc* M1, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* SP2, *Anabaena* SP2, *Nostoc* SP5, *Nostoc* K15, *Calothrix* SP2 i *Tolypothrix* K11, identifikovano je 5 masnih kiselina. Cijanobakterijski sojevi sa najmanjim brojem detektovanih masnih kiselina bili su *Phormidium* T11 i *Oscillatoria* T18 kod kojih su identifikovane svega 4 masne kiseline.



Grafik 65. Broj identifikovanih masnih kiselina kod testiranih sojeva različitih rodova

Među sojevima istog roda, kod svih predstavnika roda *Nostoc* zabeleženo je prisustvo ALA (18:3n3) i odsustvo GLA (18:3n6). Masne kiseline koje su bile prisutne kod svih pripadnika roda *Nostoc* bile su 16:0, 16:1, 18:2n6c i 18:3n3. Na osnovu Kenyon-Murata klasifikacionog sistema, predstavnici roda *Nostoc* poput vrste *N. flagelliforme*, imaju tipičan masno kiselinski profil Grupe IIB što je dokazano prisustvom ALA (C18:3n3) i nedostatkom  $\gamma$ -linoleinske kiseline (GLA, C18:3n6) (Liu i sar., 2005). Dobijeni rezultati u saglasnosti su i sa rezultatima prethodnih istraživanja drugih vrsta iz roda *Nostoc* kod kojih je takođe pokazano prisustvo/odsustvo datih kiselina (Kenyon i sar., 1972; Sallal i sar., 1990; Caudales i Wells, 1992; Murata i sar., 1992; Ahlgren i sar., 1992). Do sličnih rezultata došli su i Vargas i sar. (1998) koji su zabeležili da cijanobakterije sa višim sadržajem ALA (12-35%) u ukupnom sadržaju masnih kiselina pripadaju rodu *Nostoc*. Sa druge strane, Vargas i sar. (1998) su identifikovali i prisustvo  $\gamma$ -linoleinske kiseline kod *Nostoc* sp. (Čile) i *Anabaenopsis* sp. s obzirom da prisustvo ove masne kiseline nije prethodno zabeleženo kod sojeva datih rodova ukazujući na sposobnost cijanobakterija da produkuju i ovu masnu kiselinu. Pored toga, za razliku od rezultata dobijenih u ovom radu Milovanović i sar. (2012) su uočili veći sadržaj 22:2 kod pripadnika roda *Nostoc* i *Anabaena* (u opsegu od 6,80% do 13,07%) čije prisustvo nije detektovano ni kod jednog soja u ovom radu.

Sa druge strane, među testiranim sojevima različitih rodova prisustvo GLA (18:3n6) bilo je specifično samo za sojeve iz roda *Calothrix* s obzirom da prisustvo date masne kiseline nije identifikovano kod drugih rodova testiranih u ovom radu. U poređenju sa rezultatima Milovanović i sar. (2012) koji su pokazali da je GLA bila prisutna kod vrste *Spirulina platensis* u količini 34,69% soj *Calothrix* SP2 testiran u ovom radu pokazao se boljim producentom GLA (49,28%). Dobijeni rezultati ukazuju da izolovani terestrični šumski sojevi roda *Calothrix* mogu da budu značajni producenti esencijalnih masnih kiselina kao što je 18:3n6.

U slučaju filamentoznih cijanobakterija koje su česti konstituenti zemljišnih mikrobnih zajednica Gugger i sar. (2002) su ustanovili da su ALA (18:3ω3) i stearidonska kiselina (SDA 18:4ω3) prisutne kod većine filamentoznih cijanobakterija. U ovom radu, identifikacija SDA nije rađena, ali je prisustvo 18:3n3 registrovano kod svih sojeva sa izuzetkom jednog soja (*Calothrix* SP2). U saglasnosti sa rezultatima Gacheva i sar. (2013) koji su pokazali da su dominantne masne kiseline kod vrste *Gloeocapsa* sp. bile palmitinska (16:0), linolna (18:2) i alfa-linoleinska (alfa-18:3) u ovom radu takođe je identifikovano prisustvo masnih kiselina kao što su 14:0, 16:0, 18:0 kod testiranih sojeva.

Imajući u vidu diverzitet masno kiselinskog sastava cijanobakterija Caudales i Wells (1992) kao i Kruger i sar. (1995) su ukazali na važnost masno kiselinskog profila u taksonomskoj identifikaciji cijanobakterija do nivoa roda. Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem 55 sojeva cijanobakterija pokazano je da ugljovodoničan sastav i masno kiselinski profil mogu biti korišćeni u hemotaksonomiji cijanobakterija čak i do nivoa vrste (Dembitsky i Srebnik, 2002; Řezanka i sar., 2003; Dembitsky i Rezanka, 2005). Takođe, Li i Watanabe (2001) su ukazali da bi 24 aksena soja planktonskog roda *Anabaena* trebalo da budu međusobno razdvojena na osnovu kompozicije masno kiselinskog sastava. Ispitivanja različitih vrsta roda *Nostoc* izolovanih iz različitih ekosistema (mora, reka, terestričnih staništa) kao i iz simbiotskih odnosa ukazali su na veliki diverzitet masno kiselinskog sastava pripadnika roda *Nostoc* (utvrđeno je prisustvo više od 80 masnih kiselina) (Temina i sar., 2007).

Međutim, treba napomenuti da je u slučaju roda *Nostoc* sadržaj masnih kiselina i njihova zastupljenost generalno prilično inertna pri čemu izmene masno kiselinskog sastava (i kvalitativne i kvantitativne) mogu nastati kao rezultat temperaturnih promena (Kenyon i sar., 1972; Sallal i sar., 1990; Vargas i sar., 1998). Naime, poznato je da masno kiselinski sastav mikroorganizama varira kao odgovor na temperaturne promene (Sushchik i sar., 2003; Teoh i sar., 2004), uslove osvetljenosti (Brown i sar., 1996) kao i da zavisi od faze rasta (Brown i sar., 1996; Gugger i sar., 2002). Temperatura kao jedan od glavnih sredinskih faktora bitno utiče na fiziološke i biohemijske karakteristike cijanobakterija (Davison, 1991; Robert, 2005). Štaviše, pokazano je da kod vrste *N. flagelliforme* temperaturne promene mogu uticati na stepen nezasićenosti masnih kiselina (Liu i sar., 2005). Yap i Chen (2001) su utvrdili da usled rasta u nepovoljnim uslovima, kao što je nedostatak nutrijenata i temperaturni stres, ugljenik sintetisan tokom fotosinteze akumulira se u neutralne lipide, za koje se smatra da sadrže velike količine ukupnih mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Do sličnih rezultata došli su i Liu i sar. (2005), ukazujući da uslovi rasta, naročito promene u temperaturi gajenja kao i drugi faktori (vlažnost, svetlost, i dr.) mogu uticati na proces desaturacije i elongacije lanca sa acil grupama u većoj meri preko povratne sprege enzima desaturaza i elongaza. Odnosno, izmene sastava glicerolipida i stepena nezasićenosti masnih kiselina mogu dovesti do promena u fiziološkom metabolizmu i adaptaciji na uslove spoljašnje sredine. Sa ekološke tačke gledišta,

veza između temperature i masno kiselinskog profila može delimično da reflektuje i interakciju organizma sa faktorima spoljašnje sredine (Liu i sar., 2005). Milovanović i sar. (2012) su pokazali da dodatak jedinjenja azota u medijum negativno utiče na totalni lipidni sastav kod terestričnih sojeva iz rodova *Nostoc* i *Anabaena* što je u saglasnosti i sa rezultatima Tedesco i Duerr (1989).

Ipak, Dijkman i sar. (2010) su istakli da su u većini slučajeva promene masno kiselinskog sastava limitirane samo do varijacija u relativnoj zastupljenosti masnih kiselina, ali ne menjaju masno kiselinski profil. Pored toga, genetička raznovrsnost cijanobakterija takođe ne treba da se zanemari pri interpretaciji rezultata masno kiselinskog sastava. Odnosno, sposobnost produkcije masnih kiselina zavisi i od prisustva odnosno odsustva gena odgovornih za produkciju određenih masnih kiselina. Cohen i sar. (1995) su istakli da je sposobnost cijanobakterija da sintetišu bilo omega-3 masne kiseline, stearidonsku kiselinu (moroktinska kis. 18:4omega3), ili omega-6 masne kiseline, GLA (18:3omega6), određena na osnovu prisustva specifičnih enzima i stoga njihova sinteza ne predstavlja samo odgovor na promene faktora spoljašnje sredine (Dijkman i sar., 2010).

U odnosu na udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, kod svih testiranih sojeva u ovom radu uočena je dominacija nezasićenih masnih kiselina (UFA) u odnosu na zasićene masne kiseline (SFA) (Tabela 34). Hu i sar. (2008) su takođe istakli da u slučaju cijanobakterija koje ne teže akumulaciji lipida u formi triglicerida nivo varijacije ukupnih masnih kiselina je smanjen. Pored toga, u slučaju dva soja, *Phormidium* T11 i *Tolypothrix* K11 prisustvo zasićenih masnih kiselina (SFA) nije detektovano i kod datih sojeva udeo UFA je iznosio 100%. U slučaju preostalih sojeva, udeo UFA kretao se od 58,8% (*Phormidium* K15) do 95,74% (*Calothrix* SP2). Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima Kovač i sar. (2014) koji su pokazali da je u slučaju filamentoznih zemljišnih sojeva poreklom iz Vojvodine udeo UFA iznosio od 65,89% do 80,28%. Prema Ahlgren i sar. (1992) pripadnici filamentoznih cijanobakterija poput roda *Nostoc*, sadrže značajne količine polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u odnosu na kokoidne cijanobakterije, ali u odnosu na eukariotske alge sadrže manje količine. U radu Milovanović i sar. (2012) pokazano je da je kod testiranih sojeva cijanobakterija poreklom iz različitih zemljišta odnos PUFA/SFA iznosio od 1,65 do 3,71.

Tabela 34. Udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina kod testiranih sojeva cijanobakterija

	M1*	M2	M2	M1	M2	SP2	SP2	SP5	K10	K15	K15	T7	T18	T18	SP2	T11	K11	K15	T7	K1
	N	A	O	P	C	O	A	N	L	T	N	N	N	O	C	P	T	P	L	C
Procentualna zastupljenost (%)																				
UFA	78,5 2	73,0 2	73,2 3	66,3 8	65,8 7	74,5 5	82,3 4	80,2 8	70,8 0	66,1 6	65,0 0	67,3 7	71,5 2	78,3 0	95,7 4	100	100	58,8	60,2 7	69,6 6
MUFA	32,6 7	23,8 3	20,7 8	26,2 9	15,5 2	19,9 9	38,0 9	37,6 8	30,2 8	22,6 3	20,9 9	23,7 9	26,7 9	23,6 4	16,9 0	21,0 1	22,5 4	16,6 6	16,6 7	25,7 2
PUFA	45,8 5	49,1 9	52,4 5	40,0 9	50,3 5	54,5 6	44,2 5	42,6 0	40,5 2	43,5 3	44,0 1	43,5 8	44,7 2	54,6 6	78,8 4	78,9 8	77,4 6	42,1 4	43,6	43,9 4
SFA	21,4 8	26,9 8	26,7 7	33,6 1	34,1 3	25,4 5	17,6 6	19,7 2	29,2 0	33,8 4	34,9 9	32,6 2	28,4 8	21,7 0	4,26	0	0	41,2	39,7 3	30,3 3

\*M1 N – M1 *Nostoc*, M2 A – M2 *Anabaena*, M2 O- M2 *Oscillatoria*, M2 C - M2 *Calothrix*, SP2 O – SP2 *Oscillatoria*, SP2 A – SP2 *Anabaena*, SP5 N – SP5 *Nostoc*, K10 L – K10 *Lyngbya*, K15 T – K15 *Tolypothrix*, K15 N – K15 *Nostoc*, T7 N – T7 *Nostoc*, T18 N – T18 *Nostoc*, T18 O – T18 *Oscillatoria*, SP2 C – SP2 *Calothrix*, T11 P – T11 *Phormidium*, K11 T – K11 *Tolypothrix*, T11 P – T11 *Phormidium*, K11 T – K11 *Tolypothrix*, K15 P – K15 *Phormidium*, T7 L – T7 *Lyngbya*, K1 C -K1 *Cylindrospermum*.  
 UFA - ukupne nezasićene masne kiseline (*unsaturated fatty acid* UFA); MUFA – mononezasićene masne kiseline (*monounsaturated fatty acid* MUFA); PUFA – polinezasićene masne kiseline (*polyunsaturated fatty acid* PUFA); SFA – zasićene masne kiseline (*saturated fatty acid* SFA)



Pored toga, masne kiseline značajne su i kao jedinjenja sa antimikrobnim efektom pri čemu otpornost bakterija na određenu masnu kiselinu zavisi od bakterijskog soja kao i od strukturnih karakteristika masne kiseline (Ruffel i sar., 2016). Galbraith i sar. (1971) su uočili da dužina lanca i broj dvostrukih veza kod masnih kiselina pozitivno utiče na njihov inhibitorni efekat na Gram pozitivne bakterije. U studiji Ruffel i sar. (2016) porast dvostrukih veza (od 18:1 do 18:3, 20:1 do 20:5 ili 22:1 do 22:6) uticao je na povećanje inhibicije rasta *S. aureus*. Pored toga, stepen nezasićenosti može objasniti antibakterijsku aktivnost nekih od najvažnijih masnih kiselina 22:2 (n-6), 18:3 (n-6) i 20:4 (n-6). Visok nivo inhibicije može biti rezultat dužine ugljenikovog lanca i broja dvostrukih veza (Ruffel i sar., 2016). Tako su alfa linolenska i stearinska kiselina poznate po svom antibakterijskom potencijalu (Ohta i sar., 1995; Mundt i sar., 2001).

Alfa linoleinska kiselina (GLA) izolovana iz cijanobakterijske vrste *Fischerella* sp. ispoljila je antimikrobni efekat na *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Salmonella typhi* (lokalni soj), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Enterobacter aerogenes* MTCC 2822 (Asthana i sar., 2006). Takođe, Gacheva i sar. (2013) su pokazali da je količina alfa linolenske i stearinske kiseline bila veća kod vrste *Gloeocapsa* sp. ukazujući na ulogu datih masnih kiselina u uočenoj antibakterijskoj aktivnosti. Mundt i sar. (2003) su istakli da su nezasićene hidrosilovane masne kiseline kao i linolenska kiselina uključene u reakcije odbrane cijanobakterija od drugih organizama koji se nalaze u okruženju. Masne kiseline su sposobne da menjaju permeabilnost ćelijske membrane, intereaguju sa proteinima i lipidima ćelijske membrane, inhibišu specijalne enzime ili da formiraju sloj oko ćelija. Svi ovi mehanizmi mogli bi doprineti/dovesti do bakteriostatske i/ili baktericidne aktivnosti i poboljšati preživljavanje cijanobakterija u okruženju (Mundt i sar., 2003).

Što se tiče mononezasićenih masnih kiselina, pokazano je da 16:1 ispoljava antibakterijski efekat, što nije bilo praćeno pozitivnom korelacijom između inhibicije i dužine ugljeničnog lanca i nezasićenja (Ruffel i sar., 2016). Pored toga, još jedan izuzetak predstavljaju zasićene masne kiseline 10:0 i 12:0 koje su takođe pokazale visoku antibakterijsku aktivnost (Desbois i Smith, 2010; Ruffel i sar., 2016). Varijacija u inhibiciji između masnih kiselina različitih dužina lanaca i nezasićenosti povezana je i sa rastvorljivošću i lipofilnosti (Galbraith i sar., 1971). Dobretsov i sar. (2011) su pokazali da polarni ekstrakti cijanobakterijskih „prevlaka“ ispoljavaju visoku antibakterijsku aktivnost pri čemu su GC-MS analize nepolarnih ekstrakata pokazale prisustvo zasićenih, nezasićenih masnih kiselina i polialkohola.

U ovom radu, pokazano je da među sojevima koji su ispoljili najpotentniju antibakterijsku aktivnost (*Oscillatoria* M2, *Calothrix* M2, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1) delujući na 4 referentna bakterijska soja, cijanobakterijski sojevi *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1 bili su takođe i jedni od najbogatijih i najpotentnijih producenata masnih kiselina. U slučaju soja *Lyngbya* T7, identifikovano je i kvantifikovano prisustvo 11 masnih kiselina. U slučaju soja *Cylindrospermum* K1 broj identifikovanih masnih kiselina iznosio je 8 ukazujući da su masne kiseline potencijalno mogle doprineti uočenoj antimikrobnoj aktivnosti kod datih sojeva. Ipak, mehanizmi antibakterijske aktivnosti masnih kiselina su i dalje nejasni (Ruffel i sar., 2016). Jedna hipoteza je da ćelijska membrana bakterija predstavlja primarno mesto delovanja masnih kiselina, i da uočen antimikrobni efekat predstavlja rezultat smanjenja aktivnosti elektron transportnog lanca i oksidativne fosforilacije u prisustvu masnih kiselina (Desbois i Smith, 2010). Veza između morfologije ugljeničnog masno kiselinskog lanca i inhibitorne prirode je

takođe uočena gde sličnost između masne kiseline i strukture bakterijske plazma membrane dovodi do povećane bakterijske inhibicije (Huang i sar., 2014). Pored toga, rezistencija bakterija na masne kiseline povezana je i sa povećanom sintezom lipopolisaharida u spoljašnjoj membrani bakterija (Royce i sar., 2013).

Na osnovu dobijenih rezultata, sve testirane cijanobakterije pokazale su se kao izuzetni producenti esencijalnih masnih kiselina kao što su linolna (18:2n6c) i  $\alpha$ -linoleinska (18:3n3) ukazujući na njihov ogroman biotehnoški potencijal. U slučaju linolne kiseline najpotentnijim sojem pokazao se *Phormidium* T11 (58,94%), dok se u slučaju  $\alpha$ -linoleinske kiseline najpotentnijim producentom pokazao soj *Tolypothrix* K11 (43,15%). Prema Pramanik i sar. (2011) biohemijske, fiziološke, i taksonomske osobine koje su pokazala zanimljiva odstupanja od poznatih karakteristika cijanobakterija ukazuju na zagarantovanu izolaciju aktivnih biomolekula iz takvih sojeva. Imajući u vidu da su svi sojevi izolovani iz šumskih ekosistema sa specifičnim klimatskim uslovima, metaboličke adaptacije svakako da predstavljaju osnovni mehanizam preživljavanja i prilagođavanja takvim staništima. Pored toga, dobijeni rezultati ukazuju da šumska staništa koja su još uvek nedovoljno istražena predstavljaju značajan rezervoar cijanobakterije sa izuzetno visokim sposobnostima produkcije važnih i esencijalnih biomolekula. S obzirom da su se neki od najpotentnijih sojeva sa antimikrobnom aktivnošću (*Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1) pokazali i kao najpotentniji producenti različitih tipova masnih kiselina dobijeni rezultati ukazuju da masne kiseline mogu biti potencijalno značajne i kao biološki aktivni metaboliti sa antibakterijskom aktivnošću. Buduća istraživanja svakako treba da budu usmerena na ispitivanje uticaja faktora spoljašnje sredine na produkciju masnih kiselina i ispitivanja njihovog antimikrobnog potencijala na veći broj Gr- i Gr+ bakterija.

#### 4.9. Određivanje antioksidativne aktivnosti cijanobakterija *in vitro*

##### 4.9.1. Rezultati određivanja kapaciteta „hvatanja“ DPPH• radikala

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ukazali su na različitim potencijal testiranih sojeva. U slučaju DPPH metode, antiradikalska aktivnost determinisana je promenom vrednosti apsorbanca uzorka rastvora ekstrakta koja je dovela do redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) slobodnih radikala. Među testiranim rodovima, nivo DPPH aktivnosti razlikovao se značajno između pripadnika različitih rodova (Prilog 7 Grafici 66-85) (ANOVA,  $F=76,15$ ,  $P=0,00$ ). U DPPH eseju, etanolni ekstrakti soja *Calothrix* M2 ispoljili su najefikasniju sposobnost „hvatanja“ DPPH• radikala sa  $IC_{50}$  vrednošću  $30,72 \pm 3,31$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 35). Efektivni „hvatači“ DPPH radikala bili su takođe i etanolni ekstrakti soja *Phormidium* M1, *Oscillatoria* SP2 i *Anabaena* M2 ( $IC_{50}=47,62 \pm 7,59$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $IC_{50}=47,69 \pm 3,96$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $IC_{50}=50,54 \pm 4,74$   $\mu\text{g/ml}$ ). Međutim, u slučaju sojeva *Oscillatoria* M2 i *Nostoc* M1, zabeležena je slabija aktivnost prema DPPH radikalima ( $IC_{50}=93,25 \pm 8,63$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50}=102,47 \pm 7,29$   $\mu\text{g/ml}$ ). U odnosu na sojeve kod kojih su zabeležene  $IC_{50}$  vrednosti, najslabiji potencijal redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) slobodnih radikala ispoljio je soj *Cylindrospermum* K1 ( $IC_{50}=357,19 \pm 3,75$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Sa druge strane, u slučaju preostalih 13 cijanobakterijskih sojeva zabeležena je niža antiradikalska aktivnost i kod datih sojeva dobijene su  $IC_{25}$  vrednosti. Odnosno, utvrđena je koncentracija ekstrakta pri kojoj dolazi do inhibicije 25% 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•)

slobodnih radikala. Među datim sojevima, najefikasniju sposobnost hvatanja DPPH· radikala ispoljio je soj *Lyngbya* T7 (14,18±1,41 µg/ml). Pored toga, u slučaju 4 soja (*Anabaena* SP2, *Oscillatoria* T18, *Nostoc* T7 i *Phormidium* K15) dobijene vrednosti za IC<sub>25</sub> bile su takođe ispod 100 µg/ml (IC<sub>25</sub>=73,43±2,68 µg/ml; IC<sub>25</sub>=79,06±10,08 µg/ml; IC<sub>25</sub>=80,04±2,55 µg/ml; IC<sub>25</sub>=81,23±1,11 µg/ml). Slabija aktivnost prema DPPH radikalima zabeležena je u slučaju soja *Nostoc* SP5 (IC<sub>25</sub>=145,86±3,91 µg/ml). U slučaju šest sojeva (*Nostoc* K15, *Phormidium* T11; *Tolypothrix* K11; *Nostoc* T18; *Calothrix* SP2 i *Lyngbya* K10) dobijene LC<sub>25</sub> vrednosti bile su iznad 200 µg/ml (IC<sub>25</sub>=202,7±10,29 µg/ml; IC<sub>25</sub>=219,27±0,97 µg/ml; IC<sub>25</sub>=239,21±1,14 µg/ml; IC<sub>25</sub>=245,26±8,0 µg/ml; IC<sub>25</sub>=257,0±2,70 µg/ml; IC<sub>25</sub>=276,27±2,03 µg/ml) ukazujući na nizak antiradikalni potencijal. Najslabiju sposobnost „hvatanja“ DPPH· radikala sa IC<sub>25</sub> vrednošću 348,03±5,36 µg/ml pokazao je soj *Tolypothrix* K15.

Na osnovu dobijenih rezultata za IC<sub>50</sub> vrednosti, sposobnost ekstrakata i sintetskog antioksidansa (BHT) da neutrališu DPPH radikale rasla je u sledećem redosledu: BHT<*Calothrix* M2< *Phormidium* M1< *Oscillatoria* SP2< *Anabaena* M2<*Oscillatoria* M2<*Nostoc* M1, ukazujući da testirani sojevi cijanobakterija imaju slabiju aktivnost u poređenju sa sintetičkim antioksidantom BHT (IC<sub>50</sub>=9,8±1,00 µg/ml). Sa druge strane, etanolni ekstrakt soja *Calothrix* M2 testiran u ovom radu bio je potentniji u odnosu na radikal hvatajuću aktivnost vodenih frakcija vrsta *Nostoc* sp. (41,81±2,56), *Nostoc muscorum* (45,24±2,78) i *Anabaena cylindrica* (84,91±4,89) (Hajimahmoodi i sar., 2010). Takođe, u poređenju sa rezultatima Babaoğlu Aydaş i sar. (2013) dobijenim za tri *Synechocystis* soja (IC<sub>50</sub>=54,59±2,2 µg/ml, IC<sub>50</sub>=56,79±1,8 µg/ml, IC<sub>50</sub>=65,16±1,4 µg/ml), *Leptolyngbya* sp. BASO700 (IC<sub>50</sub>=69,05±1,2 µg/ml) i *Oscillatoria* sp. BASO703 (IC<sub>50</sub>=78,43±2,4 µg/ml) 4 soja (*Calothrix* M2, *Phormidium* M1, *Oscillatoria* SP2 i *Anabaena* M2) testirana u ovoj studiji pokazala su veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala.

Tabela 35. Rezultati antiradikalne aktivnosti etanolnih ekstrakata sojeva dobijeni primenom DPPH metode

Testirani sojevi	IC <sub>50</sub> /IC <sub>25</sub> vrednosti (µg/ml)
<i>Nostoc</i> M1	LC <sub>50</sub> =102,47±7,29
<i>Phormidium</i> M1	LC <sub>50</sub> =47,62±7,59
<i>Oscillatoria</i> M2	LC <sub>50</sub> =93,25±8,63
<i>Calothrix</i> M2	LC <sub>50</sub> =30,72±3,31
<i>Anabaena</i> M2	LC <sub>50</sub> =50,54±4,74
<i>Oscillatoria</i> SP2	LC <sub>50</sub> =47,69±3,96
<i>Calothrix</i> SP2	LC <sub>25</sub> =257,09±2,70
<i>Anabaena</i> SP2	LC <sub>25</sub> =73,43±2,68
<i>Nostoc</i> SP5	LC <sub>25</sub> =145,86±3,91
<i>Nostoc</i> T7	LC <sub>25</sub> =80,04±2,55
<i>Lyngbya</i> T7	LC <sub>25</sub> =14,18±1,41
<i>Phormidium</i> T11	LC <sub>25</sub> =219,27±0,97
<i>Oscillatoria</i> T18	LC <sub>25</sub> =79,06±10,08
<i>Nostoc</i> T18	LC <sub>25</sub> =245,26±8,0
<i>Cylindrospermum</i> K1	LC <sub>50</sub> =357,19±3,75
<i>Lyngbya</i> K10	LC <sub>25</sub> =276,27±2,03
<i>Tolypothrix</i> K11	LC <sub>25</sub> =239,21±1,14
<i>Tolypothrix</i> K15	LC <sub>25</sub> =348,03±5,36
<i>Phormidium</i> K15	LC <sub>25</sub> =81,23±1,11
<i>Nostoc</i> K15	LC <sub>25</sub> =202,7±10,29

#### 4.9.2. Rezultati određivanja redoks kapaciteta FRAP metodom

U slučaju FRAP metode, antiradikalska aktivnost izračunata je na osnovu redukcije gvožđe-tripiridil triazin kompleksa u gvožđe-plavo-obojeni kompleks u prisustvu antioksidanasa. Redukujuća moć ekstrakata izražena je kao ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) po gramu suve mase. Rezultati su pokazali da između testiranih cijanobakterijskih sojeva nije uočena signifikantna razlika redoks kapaciteta (ANOVA,  $F=0,92$ ,  $P=0,34$ ). U slučaju FRAP metode, najpotentniji soj bio je *Cylindrospermum* K1 ( $28,58 \pm 0,53$  mg AAE/g) (Tabela 36). Pored pomenutog soja, potentnim sojevima pokazali su se i *Lyngbya* K10 ( $22,92 \pm 3,11$  mg AAE/g), kao i *Phormidium* M1 ( $22,48 \pm 2,18$  mg AAE/g) i *Oscillatoria* M2 ( $22,04 \pm 2,35$  mg AAE/g). U slučaju tri soja (*Anabaena* M2, *Nostoc* M1 i *Oscillatoria* SP2) ispoljena je slična aktivnost redukcije gvožđe-tripiridil triazin kompleksa ( $21,93 \pm 3,88$  mg AAE/g;  $21,50 \pm 2,21$  mg AAE/g;  $21,18 \pm$  mg AAE/g). Pored toga, u slučaju soja *Anabaena* SP2 dobijena vrednost mg ekvivalenta askorbinske kiseline/g suvog ostatka takođe je bila iznad 20 mg AAE/g ( $20,76 \pm 4,26$  mg AAE/g). Nešto niži redoks kapacitet imali su sojevi *Oscillatoria* T18 ( $19,93 \pm 4,65$  mg AAE/g) i *Tolypothrix* K15 ( $18,99 \pm 3,80$  mg AAE/g).

Za razliku od rezultata dobijenih u DPPH metodi, *Calothrix* M2 ispoljio je daleko slabiju redukcionu sposobnost ( $16,88 \pm 2,23$  mg AAE/g). Sličnu antiradikalsku aktivnost sa sojem *Calothrix* M2 ispoljila su i tri predstavnika iz roda *Nostoc* (*Nostoc* K15  $16,28 \pm 3,82$  mg AAE/g, *Nostoc* SP5  $16,55 \pm 4,39$  mg AAE/g i *Nostoc* T7  $16,33 \pm 3,68$  mg AAE/g). U slučaju cijanobakterijskih sojeva *Calothrix* SP2, *Lyngbya* T7, *Phormidium* T11, *Tolypothrix* K11 i *Phormidium* K15 dobijena vrednost iznosila je  $15,50 \pm 0,27$  mg AAE/g. Soj sa najmanjom redukcionom sposobnošću bio je *Nostoc* T18 ( $14,61 \pm 4,62$  mg AAE/g).

U poređenju sa sintetičkim antioksidantom BHT ( $25,32 \pm 2,50$  mg AAE/g) svi testirani sojevi cijanobakterija ispoljili su manji redukcionu kapacitet sa izuzetkom soja *Cylindrospermum* K1 ( $28,58 \pm 0,53$  mg AAE/g). U odnosu na rezultate Kepekçi i Saygideger (2012) dobijenim za metanolske ekstrakte ( $25,63 \pm 0,36$  mM AAE/g;  $35,57 \pm 1,03$  mM AAE/g) vrste *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* dobijene vrednosti u ovom radu kretale su se u opsegu od  $28,58 \pm 0,53$  mg AAE/g do  $14,60 \pm 4,6$  mg AAE/g ukazujući na niži redoks potencijal testiranih sojeva. U radu Pandey i Pandey (2008), maksimalni antioksidativni kapacitet ( $120,35$  mM AAE/g) primećen je u vodenim ekstraktima imobilisanih ćelijskih kultura *Nostoc lobatus* sa dodatkom P i Fe ukazujući na značaj suplemenata na povećanje produkcije antioksidanasa. U poređenju sa rezultatima Pandey i Pandey (2008), testirani terestrični cijanobakterijski sojevi izolovani iz šumskih ekosistema ispoljili su daleko niži antioksidativni kapacitet.

Tabela 36. Rezultati antiradikalske aktivnosti cijanobakterijskih sojeva dobijeni primenom FRAP metode

Testirani sojevi	Antiradikalska aktivnost (mg ekvivalenta askorbinska kiseline/g)
<i>Nostoc</i> M1	21,50±2,21
<i>Phormidium</i> M1	22,48±2,18
<i>Oscillatoria</i> M2	22,04±2,35
<i>Calothrix</i> M2	16,88±2,33
<i>Anabaena</i> M2	21,93±3,88
<i>Oscillatoria</i> SP2	21,18±4,19
<i>Calothrix</i> SP2	15,50±0,27
<i>Anabaena</i> SP2	20,76±4,26
<i>Nostoc</i> SP5	16,55±4,39
<i>Nostoc</i> T7	16,33±3,68
<i>Lyngbya</i> T7	15,50±0,27
<i>Phormidium</i> T11	15,50±0,27
<i>Oscillatoria</i> T18	19,93±4,65
<i>Nostoc</i> T18	14,61±4,62
<i>Cylindrospermum</i> K1	28,58±0,53
<i>Oscillatoria</i> K10	22,92±3,11
<i>Tolypothrix</i> K11	15,50±0,27
<i>Tolypothrix</i> K15	18,99±3,80
<i>Phormidium</i> K15	15,50±0,27
<i>Nostoc</i> K15	16,28±3,82

Na osnovu dobijenih rezultata, antiradikalska aktivnost testiranih sojeva razlikovala se u DPPH i FRAP metodi što je verovatno posledica raznovrsnih tipova antioksidativnih jedinjenja prisutnih u sirovim ekstraktima i različitih mehanizama antioksidativne aktivnosti. U slučaju DPPH metode najpotentnijim sojevima pokazali su se *Calothrix* M2, *Phormidium* M1, *Oscillatoria* SP2 i *Anabaena* M2. Sa druge strane, u slučaju FRAP metode sojevi sa najvećim redoks kapacitetom bili su *Cylindrospermum* K1, *Lyngbya* K10, *Phormidium* M1 i *Oscillatoria* M2. Prema Hajimahmoodi i sar. (2010) u DPPH eseju, druge funkcionalne grupe jedinjenja mogu biti odgovorne za antiradikalni efekat u odnosu na FRAP esej s obzirom na činjenicu da FRAP esej može reagovati sa antioksidansima koji sadrže gvožđe (II) i SH- grupe (Benzie i Strain, 1996) dok se u DPPH metodi koriste organski radikali (Chandrasekar i sar., 2006). Takođe, u cilju intenzivnog proučavanja antioksidativnog potencijala ekstrakata, ukupna antioksidativna aktivnost bi trebala da bude procenjena primenom različitih metoda s obzirom na činjenicu da antioksidativna aktivnost može da se manifestuje širokim spektrom delovanja (Beara i sar., 2012) i različiti antioksidativni mehanizmi bi trebali da budu uzeti u obzir (Goiris i sar., 2012). Stoga, različiti antioksidativni eseji bi trebali da budu urađeni dodatno za sve testirane sojeve u cilju detaljnije karakterizacije njihovog antioksidativnog kapaciteta.

S obzirom da su fikobiliproteini, posebno fikocijanin, poznati kao snažni antioksidansi (Bhat i Madyastha, 2000; Hirata i sar., 2000; Piñero Estrada i sar., 2001; Benedetti i sar., 2004; Huang i sar., 2007; Gantar i sar., 2012) ispitana je korelacija između fikocijanina i antioksidativne aktivnosti. Statistički, korelacija između sadržaja PC i antioksidativne aktivnosti u DPPH metodi kao i u FRAP metodi nije pronađena (Tabela 37). Ovi rezultati ukazuju da su druga jedinjenja prisutna u ekstraktima doprinela antioksidativnoj aktivnosti testiranih sojeva. Stoga, ne samo PC, već i druga jedinjenja trebalo bi da se razmatraju kada se koriste sirovi ekstrakti

cijanobakterija kao prirodan izvor antioksidanata. Prema Pumas i sar. (2011) antioksidativna aktivnost ekstrakata cijanobakterija rezultat je koordinisane aktivnosti fikobiliproteina, fenolnih jedinjenja kao i drugih antioksidativnih supstanci.

Tabela 37. *P* vrednost i Pearson-ov koeficijent korelacije između sadržaja fikocijanina i antioksidativne aktivnosti

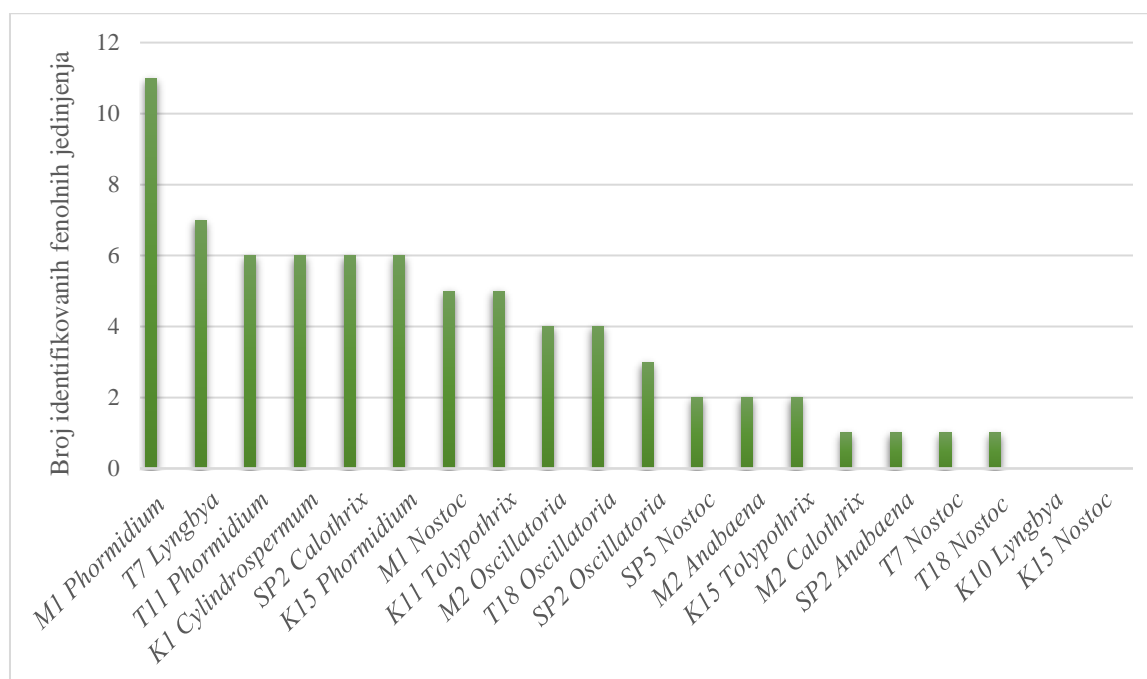
Antioksidativna aktivnost	Pearson-ov korelacioni koeficijent	<i>P</i> vrednost
Kapaciteta „hvatanja“ DPPH• radikala	0,213	0,855
Sposobnost redukcije gvožđe-tripiridil triazin kompleksa	0,481	0,132

S obzirom da mikroalge predstavljaju kompleksan izvor različitih jedinjenja u mnogim ekstraktima antioksidativna aktivnost nije blisko povezana sa specifičnim jedinjenjima već sa miksturama jedinjenja. Odnosno, biomasa mikroalgi može se smatrati kao višekomponentni antioksidativni sistem, koji je efektivniji upravo zbog aditivnih ili sinergističkih interakcija između različitih antioksidativnih jedinjenja (Gouveia i sar., 2006). Takođe, poznato je da su aditivni efekti fitohemikalija, bioaktivnih jedinjenja biljaka, odgovorni za potentnu antioksidativnu aktivnost s obzirom da predstavljaju kompleksnu miksturu jedinjenja sa biološkom aktivnošću (Liu, 2003). S obzirom na činjenicu da ekstrakti mikroalgi sadrže kompleksnu mešavinu antioksidanata u kojoj specifični antioksidanti mogu biti regenerisani drugim antioksidantom (Goiris i sar., 2012) antioksidativna aktivnost ne može biti objašnjena na osnovu analize specifičnih komponenata (Plaza i sar., 2010). Takođe, individualni antioksidansi mogu delovati preko multiplih mehanizama u jednom sistemu ili preko različitih pojedinačnih mehanizama u zavisnosti od reakcionog sistema (Singh i Singh, 2008). Na primer, ne samo alfa i beta-karoten već takođe i drugi karotenoidi (kao što su likopen, zeaksantin, lutein, ehinenon, astaksantin i kantaksantin) dobro opisani kod cijanobakterija, pokazuju antioksidativnu aktivnost i smatra se da interakcije među njima verovatno doprinose antioksidativnoj aktivnosti svake frakcije (Böhm i sar., 2002). Pored karotenoida, druga jedinjenja kao što su polinezasićene masne kiseline i polisaharidi uključujući egzopolimere mogu takođe da igraju važnu ulogu u antiradikalnoj aktivnosti (Chen, 1996; Chen i sar., 2005; Parwani i sar., 2014). Takođe, fenolna jedinjenja predstavljaju glavne “nosioc” antioksidativnog kapaciteta (Hajimahmoodi i sar., 2010; Kepekçi i Saygideger, 2012). Upravo zbog toga, u cilju utvrđivanja jedinjenja odgovornih za uočenu antiradikalnu aktivnost testiranih sojeva izvršena je hemijska analiza fenolnog sastava 70% EtOH ekstrakata primenom LC/MS-MS analize.

#### 4.10. Hemijska analiza fenolnog sastava cijanobakterija primenom LC/MS-MS analize

Nakon određivanja antioksidativne aktivnosti cijanobakterija *in vitro* sledeći korak podrazumevao je identifikaciju i kvantifikaciju određenih fenolnih jedinjenja prisutnih u etanolnim ekstraktima testiranih cijanobakterija s obzirom na činjenicu da data jedinjenja mogu da se ponašaju kao antioksidativni agensi. Kod 20 analiziranih cijanobakterijskih sojeva identifikovano je i kvantifikovano ukupno 21 jedinjenje (Tabela 38).

Među testiranim sojevima soj sa najvećom sposobnošću produkcije različitih fenolnih jedinjenja bio je *Phormidium* M1 kog koga je identifikovano prisustvo 11 fenolnih jedinjenja (Grafik 86). Drugi po redu soj koji se pokazao dobrim producentom fenolnih jedinjenja bio je soj *Lyngbya* T7 kod koga je identifikovano 7 fenolnih jedinjenja. U slučaju 4 cijanobakterijska soja (*Phormidium* T11, *Cylindrospermum* K1, *Calothrix* SP2 i *Phormidium* K15) identifikovano je prisustvo 6 jedinjenja. Kod dva soja, *Nostoc* M1 i *Tolypothrix* K11, detektovano je ukupno 5 fenolnih jedinjenja. U slučaju sojeva iz roda *Oscillatoria* detektovana su 4 fenolna jedinjenja (*Oscillatoria* M2 i *Oscillatoria* T18) odnosno 3 jedinjenja kod soja *Oscillatoria* SP2. Dva fenolna jedinjenja identifikovana su kod tri soja (*Anabaena* M2, *Nostoc* SP5 i *Tolypothrix* K15) dok je kod 4 soja (*Calothrix* M2, *Anabaena* SP2, *Nostoc* T7 i *Nostoc* T18) identifikovano samo jedno jedinjenje. U slučaju dva soja, *Lyngbya* K10 i *Nostoc* K15, prisustvo ispitivanih fenolnih jedinjenja nije detektovano.



Grafik 86. Broj identifikovanih fenolnih jedinjenja kod testiranih terestričnih cijanobakterija izolovanih iz šumskih ekosistema

Najzastupljenije fenolno jedinjenje koje je bilo prisutno kod 9 testiranih cijanobakterijskih sojeva (*Calothrix* M2, *Phormidium* M1, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* SP2, *Nostoc* SP5, *Tolypothrix* K15, *Cylindrospermum* K1, *Calothrix* SP2 i *Phormidium* K15), odnosno kod 45% testiranih 70% EtOH ekstrakata, bio je luteolin-7-O-glukozid (Tabela 38). Luteolin-7-O-glukozid je bio prisutan u najmanjoj koncentraciji kod soja *Nostoc* SP5 (0,0694 µg/g suve materije), dok je u najvećoj koncentraciji bio zastupljen kod soja *Oscillatoria* M2 (4,19 µg/g



suve materije). Pored luteolin-7-O-glukozida, među zastupljenijim fenolnim jedinjenjima bili su i bajkalin i kemferol. Prisustvo bajkalina i kemferola detektovano je u etanolnim ekstraktima 8 testiranih cijanobakterijskih sojeva. Procentualna zastupljenost pomenuta dva jedinjenja iznosila je 40%. U slučaju bajkalina, prisustvo ovog fenolnog jedinjenja detektovano je kod sojeva *Oscillatoria* SP2, *Nostoc* SP5, *Lyngbya* T7, *Phormidium* T11, *Cylindrospermum* K1, *Tolypothrix* K11, *Calothrix* SP2 i *Phormidium* K15. Kod soja *Oscillatoria* SP2 bajkalin je bio prisutan u najmanjoj koncentraciji (0,702 µg/g suve materije), dok je kod soja *Lyngbya* T7 registrovana najveća koncentracija (12,5 µg/g suve materije). Kemferol, identifikovan kod osam testiranih cijanobakterijskih sojeva (*Nostoc* M1, *Anabaena* M2, *Lyngbya* T7, *Phormidium* T11, *Cylindrospermum* K1, *Tolypothrix* K11, *Calothrix* SP2, *Phormidium* K15) bio je zastupljen u najmanjoj količini (1,08 µg/g suve materije) kod soja *Nostoc* M1 dok je kod soja *Lyngbya* T7 zabeležena najveća koncentracija datog jedinjenja (23,1 µg/g suve materije). Prisustvo hinske kiseline identifikovano je kod 35% odnosno 7 testiranih cijanobakterijskih sojeva (*Nostoc* M1, *Phormidium* M1, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* SP2, *Anabaena* SP2, *Nostoc* T7 i *Nostoc* T18). Hinska kiselina je bila zastupljena u najmanjoj količini (12,6 µg/g suve materije) kod soja *Oscillatoria* M2. Daleko veće koncentracije pomenute kiseline su registrovane u slučaju dva soja, *Nostoc* T7 (345 µg/g suve materije) i *Phormidium* M1 (502 µg/g suve materije).

Tri fenolna jedinjenja koja su bila zastupljena kod 30% testiranih sojeva, identifikovana u ekstraktima 6 cijanobakterijskih sojeva, bila su: krizoeriol, izoramnetin i amentoflavon. U slučaju krizoeriola cijanobakterijski sojevi kod kojih je detektovano prisustvo ove kiseline bili su *Lyngbya* T7, *Phormidium* T11, *Cylindrospermum* K1, *Tolypothrix* K11, *Calothrix* SP2 i *Phormidium* K15. Kod datih cijanobakterijskih sojeva, krizoeriol je bio detektovan u veoma malim količinama koje su se kretale u opsegu od 0,902 µg/g suve materije (*Phormidium* K15) do 1,97 µg/g suve materije (*Lyngbya* T7). Kod datih cijanobakterijskih sojeva izoramnetin je bio prisutan u daleko većim količinama koje su se kretale u rasponu od 117 µg/g suve materije (*Phormidium* K15) do 195 µg/g suve materije (*Lyngbya* T7). U odnosu na krizoeriol i izoramnetin, amentoflavon je bio prisutan u najvećoj koncentraciji kod datih cijanobakterijskih sojeva. Kod soja *Phormidium* K15 registrovana je najmanja količina amentoflavona (201 µg/g suve materije), dok je kod soja *Lyngbya* T7 dato jedinjenje identifikovano u izuzetno visokoj koncentraciji (1184 µg/g suve materije) što je ujedno predstavljalo i najveću zabeleženu vrednost u odnosu na sva identifikovana fenolna jedinjenja. Pored toga, u poređenju sa ostalim identifikovanim fenolnim jedinjenjima kvantifikovane koncentracije izoramnetina i amentoflavona bile su daleko veće i iznosile su preko 100 µg/g suve materije.

Vanilinska kiselina i eskuletin identifikovana su kod daleko manjeg broja testiranih etanolnih cijanobakterijskih ekstrakata. Prisustvo vanilinske kiseline i eskuletina identifikovano je kod tri testirana cijanobakterijska soja. U slučaju vanilinske kiseline, sojevi kod kojih je detektovano prisustvo ove kiseline bili su *Phormidium* M1, *Oscillatoria* M2 i *Oscillatoria* T18. Kod soja *Oscillatoria* T18 vanilinska kiselina je bila zastupljena u najmanjoj količini (43,9 µg/g suve materije) dok je kod soja *Oscillatoria* M2 registrovana najveća koncentracija ove kiseline (59,3 µg/g suve materije). Za razliku od vanilinske kiseline, eskuletin (detektovan u ekstraktima sojeva - *Nostoc* M1, *Tolypothrix* K15 i *Oscillatoria* T18) bio je prisutan u daleko manjim količinama. Registrovane koncentracije eskuletina kretale su se u rasponu od 2,24 µg/g suve materije (*Tolypothrix* K15) do 4,37 µg/g suve materije (*Nostoc* M1).

Pet fenolnih jedinjenja identifikovanih kod 10% testiranih ekstrakata (2 cijanobakterijska soja) bila su p-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehinska kiselina, p-kumarinska kiselina, rutin i apigenin. Kod dva cijanobakterijska soja (*Oscillatoria* T18 i *Nostoc* M1), registrovano je prisustvo p-hidroksibenzoeve kiseline i rutina. Kod oba soja, registrovane su iste koncentracije p-hidroksibenzoeve kiseline i rutina (5,65 µg/g suve materije *Oscillatoria* T18 i 10,6 µg/g suve materije *Nostoc* M1). Prisustvo protokatehinske kiseline detektovano je kod sojeva *Phormidium* M1 i *Oscillatoria* M2, pri čemu se koncentracija ove kiseline kretala u opsegu od 5,21 µg/g suve materije (*Phormidium* M1) do 8,15 µg/g suve materije (*Oscillatoria* M2). Za razliku od tri prethodno pomenuta fenolna jedinjenja, apigenin i p-kumarinska kiselina bili su zastupljeni u nižim koncentracijama. Apigenin je identifikovan kod dva soja u koncentracijama 1,21 µg/g suve materije (*Phormidium* T11) i 1,93 µg/g suve materije (*Lyngbya* T7). P-kumarinska kiselina je bila prisutan u nešto nižim koncentracijama (0,892 µg/g suve materije kod soja *Anabaena* M2 i 1,13 µg/g suve materije kod soja *Phormidium* M1). Preostalih 7 fenolnih jedinjenja (gentizinska kiselina, galna kiselina, 5-o-kafeoilhinska kiselina, kvercitrin, hiperozid, kvercetin-3-O-glukozid i apiin) identifikovani su samo kod 5% testiranih etanolnih ekstrakata, odnosno jednog testiranog cijanobakterijskog soja. U slučaju cijanobakterijskog soja *Phormidium* M1 identifikovano je prisustvo prvih 6 fenolnih jedinjenja, pri čemu je u najvećoj koncentraciji bila prisutna galna kiselina (84,9 µg/g suve materije), potom hiperozid (34,5 µg/g suve materije) i kvercetin-3-O-glukozid (26,6 µg/g suve materije). Sa druge strane, 5-o-kafeoilhinska kiselina, kvercitrin i gentizinska kiselina bile su prisutne u nižim koncentracijama kod datog soja (6,11 µg/g suve materije; 2,26 µg/g suve materije; 1,73 µg/g suve materije). Fenolno jedinjenje čije je prisustvo zabeleženo samo kod jednog cijanobakterijskog soja bio je apiin. Ovo fenolno jedinjenje identifikovano je kod soja *Lyngbya* T7 u koncentraciji 1,18 µg/g suve materije.

Tabela 38. Fenolna jedinjenja kvantifikovana kod testiranih sojeva cijanobakterija izražena u µg/g suve materije

Testirani sojevi	N M1	A M2	C M2	P M1	O M2	O SP2	A SP2	N SP5	T K15	L K10	N K15	N T7	O T18	N T18	L T7	P T11	C K1	T K11	C SP2	P K15
	µg/g suve materije																			
p-hidroksibenzoeva kis.	10.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Protokatehinska kis.	n.d.	n.d.	n.d.	5.21	8.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gentizinska kis.	n.d.	n.d.	n.d.	1.73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-kumarinska kis.	n.d.	0.892	n.d.	1.13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vanilinska kis.	n.d.	n.d.	n.d.	50.0	59.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Galna kis.	n.d.	n.d.	n.d.	84.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eskuletin	4.37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.24	n.d.	n.d.	n.d.	2.64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hinska kis.	33.0	n.d.	n.d.	502	12.6	25.8	17.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	345	n.d.	15.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bajkalin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.702	n.d.	0.796	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12.5	6.69	4.51	3.72	3.77	2.52
Kemferol	1.08	1.23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23.1	11.7	9.00	10.7	6.38	7.13
5-o-kafeoilhinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	6.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Luteolin-7-O-glukozid	n.d.	n.d.	1.47	1.73	4.19	0.801	n.d.	0.0694	0.136	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.904	n.d.	1.30	0.983
Kvercitrin	n.d.	n.d.	n.d.	2.26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hiperozid	n.d.	n.d.	n.d.	34.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercetin-3-O-Glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	26.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutin	10.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Apigenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.93	1.21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Krizoeriol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.97	1.45	1.13	0.967	0.905	0.902
Izoramnetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	195	147	132	128	120	117
Apiin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amentoflavon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1184	633	449	333	271	201

U poređenju sa rezultatima antioksidativnih *in vitro* testova, najpotentniji soj sa sposobnošću produkcije raznovrsnih fenolnih jedinjenja (*Phormidium* M1) kog koga je identifikovano prisustvo 11 fenolnih jedinjenja pokazao je i visoku redukcionu sposobnost u FRAP eseju ukazujući da su fenolna jedinjenja mogla potencijalno doprineti uočenoj antioksidativnoj aktivnosti. Najdominantnije fenolne kiseline pronađene kod soja *Phormidium* M1 bile su hinska kiselina, galna kiselina i vanilinska kiselina. U poređenju sa rezultatima Babaoğlu Aydaş i sar. (2013) za *Synechocystis* sp. BASO444 ( $7,4 \pm 1,3$  µg/g suve mase) i *Synechocystis* sp. BASO673 ( $9,0 \pm 1,4$  µg/g suve mase), kvantifikovana količina galne kiseline bila je značajno veća kod soja *Phormidium* M1 ( $84,9$  µg/g suve mase). Štaviše, u poređenju sa *Synechocystis* sp. BASO444 ( $0,1 \pm 0,036$  µg/g suve mase) i *Synechocystis* sp. BASO673 ( $0,1 \pm 0,03$  µg/g suve mase), i *Phormidium* M1 je takođe sadržao veću količinu i p-kumarinske kiseline ( $1,13$  µg/g suve mase). Kod ovog soja, protokatehinska kiselina ( $5,21$  µg/g suve mase) i 5-o-kafeoilhinska kiselina ( $6,11$  µg/g suve mase) bile su takođe prisutne, dok je sadržaj dve fenolne kiseline (gentizinske kiseline  $1,73$  µg/g suve mase; p-kumarinske kiseline  $1,13$  µg/g suve mase) bio značajno niži u odnosu na druge identifikovane fenolne kiseline.

Pored fenolnih kiselina, Onofrejová i sar. (2010) su istakli da nekoliko klasa flavonoida (izoflavonoidi, flavanoni, flavoni i dihidrohalkoni) mogu biti isto pronađeni kod mikroalgi i cijanobakterija. U ovoj studiji identifikovano je nekoliko flavonoid glukozida. Kod soja *Phormidium* M1 detektovano je 5 flavonoid glukozida pri čemu su hiperozid ( $34,5$  µg/g suve mase), kvercetin-3-o-glukozid ( $26,6$  µg/g suve mase) bili identifikovani u većoj količini u odnosu na druge glukozide (luteolin 7-o-glukozid, kvercitrin i rutin). Sa druge strane, u slučaju sojeva *Calothrix* M2, *Oscillatoria* M2 i *Nostoc* M1 samo jedno flavonoid glukozidno jedinjenje je identifikovano kod svakog soja (luteolin 7-o-glukozid kod soja *Calothrix* M2 i *Oscillatoria* M2, rutin kod soja *Nostoc* M1). U poređenju sa rezultatima Klejduš i sar. (2010) većina derivata benzojeve kiseline identifikovanih kod 4 slatkovodne vrste cijanobakterija (*Anabaena platenisis*, *Anabaena dolium*, *Cylindrospermum* sp., *Nostoc* sp.) bila je prisutna i kod nekih sojeva u ovom radu (p-hidroksibenzojeva kiselina – *Nostoc* M1; protokatehinska kiselina – *Phormidium* M1 i *Oscillatoria* M2; vanilinska kiselina kod soja *Phormidium* M1 i *Oscillatoria* M2).

Pored derivata benzojeve kiseline, derivati cinaminske kiseline su takođe veoma značajni kao osnovni prekursori u fenil-propanoid putu za sintezu polifenolnih jedinjenja. Međutim, derivati cinaminske kiseline kao i hidroksil benzaldehidi pronađeni kod slatkovodnih vrsta cijanobakterija (Klejduš i sar., 2010) nisu detektovani u ovom radu. Cinaminska kiselina i p-kumarinska kiselina su veoma važne jer predstavljaju ključne prekursore u sintezi različitih bioaktivnih fenola kod fotosintetičkih organizama (Onofrejová i sar., 2010). U ovom radu, cinaminska kiselina bila je odsutna kod svih testiranih ekstrakata cijanobakterija, dok je p-kumarinska kiselina identifikovana kod dva soja (*Anabaena* M2 i *Phormidium* M1). U poređenju sa fenolnim sastavom različitih ekstrakata vrste *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* (Abd El-Baky i sar., 2009), tri fenolne kiseline (galna kiselina, p-OH-benzojeva kiselina, vanilinska kiselina) detektovane su u ovom radu kod nekoliko sojeva (Tabela 38). U poređenju sa rezultatima Onofrejová i sar. (2010) dobijenim za slatkovodnu cijanobakteriju *Anabaena doliolum* i tri alge 4 detektovane fenolne kiseline su takođe identifikovane i u ovom radu (protokatehinska kiselina *Phormidium* M1 i *Oscillatoria* M2; p-hidroksibenzojeva kiselina *Nostoc* M1, *Oscillatoria* T18; vanilinska kiselina *Phormidium* M1, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18; p-kumarinska kiselina *Anabaena* M2 i *Phormidium* M1). Međutim, fenolne

kiseline kao što su 2,3-dihidroksibenzoeva kiselina, siringinska, salicilna, kofeinska i hlorogena kiselina pronađene u prethodnom istraživanju (Onofrejova i sar., 2010) nisu identifikovane u testiranim ekstraktima cijanobakterija šumskih ekosistema.

Na osnovu publikovanih rezultata, slatkovodne mikroalge sadrže veće količine fenolnih jedinjenja u odnosu na cijanobakterije (Klejdus i sar., 2010). S obzirom da su alge eukariotski organizmi smatra se da one imaju razvijenije metaboličke puteve sinteze fenola u odnosu na cijanobakterije (Onofrejová i sar., 2010). Ipak, imajući u vidu da su studije fenolnog profila uglavnom fokusirane na slatkovodne cijanobakterije i mikroalge, dobijeni rezultati su od velike važnosti i mogu doprineti budućim istraživanjima terestričnih cijanobakterija. Dalje, determinacija fenolnog sastava dala je uvid u deo metaboličkog kapaciteta testiranih sojeva, pri čemu se soj *Phormidium* M1 pokazao kao obećavajući izvor fenolnih kiselina kao što je hinska kiselina. Dalje, treba napomenuti da su istraživanja u pogledu fenolnog sastava zemljišnih cijanobakterija i dalje retka. Stoga, ovo istraživanje može ukazati na metaboličke mogućnosti ove veoma zanimljive grupe mikroorganizama koja može biti značajan izvor bioaktivnih prirodnih jedinjenja.

Rezultati ovih istraživanja su pokazali da terestrične cijanobakterije poseduju antioksidativnu aktivnost. Rezultati ukazuju na njihov potencijal kao izvora različitih jedinjenja koja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost, jer je svaki soj ispoljio različitu aktivnost u odnosu na primenjen metod. Na osnovu dobijenih rezultata, treba napomenuti da fenolna jedinjenja, koja su poznata kao dobri antioksidansi, mogu potencijalno imati uticaj na „hvatajuću“ aktivnost radikala u slučaju FRAP metode s obzirom da su neki od najpotentnijih sojeva u datom *in vitro* eseju (*Cylindrospermum* K1, *Phormidium* M1 i *Oscillatoria* M2) ujedno i najbogatiji fenolnim jedinjenjima. Imajući u vidu da su testirani terestrični sojevi poreklom iz šumskih ekosistema u kojima postoje izražene varijacije uslova spoljašnje sredine, faktori spoljašnje sredine mogli bi značajno uticati na produkciju fenola i antioksidativnu aktivnost. Upravo zbog toga, dodatna i detaljnija istraživanja uticaja faktora spoljašnje sredine na antioksidativnu aktivnost i fenolni sastav testiranih sojeva bila bi od značaja u budućim istraživanjima. Dobijeni rezultati mogu da služe kao polazna tačka za identifikaciju i drugih aktivnih jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću. Na kraju, dobijeni rezultati ukazuju da testirani sojevi cijanobakterija mogu biti bogat izvor fenolnih jedinjenja što ih čini interesantnim za dalje analize.

#### **4.11. Detekcija toksičnosti cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema**

U cilju ispitivanja sposobnosti produkcije toksina cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema sa teritorije Republike Srbije, toksičnost odabranih sojeva analizirana je primenom tri različita testa. Na osnovu rezultata ranijih istraživanja pokazano je da toksini cijanobakterija deluju na različite organizame, uključujući vertebrate i invertebrate kod kojih dovode do širokog spektra različitih negativnih efekata uključujući: akutne efekte (npr. smanjenu sposobnost preživljavanja, inhibiciju ishrane, paralizu), hronične efekte (npr. redukciju rasta i fertiliteta), biohemijske promene (utiču na aktivnost različitih enzima kao što su fosfataze, GST, AChE, proteaze) i promene u ponašanju (Ferrão-Filho i Kozlowsky-Suzuki, 2011).

U ovom radu testirani su akutni efekti toksičnosti cijanobakterijskih sojeva korišćenjem dva biotesta sa invertebratima (bioeseji sa račićima *Artemia salina* i test sa *Daphnia magna*) i jednim bioesejom sa vertebratima (DarT test sa embrionima *Danio rerio*). S obzirom da različite vrste zooplanktona ispoljavaju drugačiju senzitivnost na ćelije cijanobakterija i/ili rastvorene cijanotoksine (De Mott i sar., 1991; De Mott, 1999; Reinikainen i sar., 1999; Kyselková i Maršálek, 2000; D'ors i sar., 2013), u ovom radu korišćena su dva različita model organizma invertebrata (*A. salina* i *D. magna*). Pored toga, imajuću u vidu da toksični efekti cijanobakterijskih sekundarnih metabolita uglavnom pogađaju bazalne metaboličke puteve u ćelijama kičmenjaka koji se ne manifestuju kod zooplanktona (Hisem i sar., 2011) toksičnost izolovanih sojeva analizirana je i primenom DarT testa sa embrionima zebrića (*Danio rerio*) kao model organizma za vertebrate.

#### 4.11.1. *Artemia salina* bioesej

U bioeseju *A. salina* testirana su dva tipa ekstrakata, 75% metanolni i DMSO ekstrakti. U slučaju 75% metanolnih ekstrakata, većina testiranih sojeva ispoljila je toksičan efekat na račiće nakon 48h izlaganja (Prilog 8 Grafici 87-102) sa izuzetkom 4 soja kod kojih nisu uočeni toksični efekti (*Calothrix* SP2, *Lyngbya* T7, *Anabaena* M2, *Anabaena* SP2) (Tabela 39). Među testiranim sojevima, najtoksičnijim sojem pokazao se *Nostoc* T7 kod koga je zabeležena najniža LC<sub>50</sub> vrednost nakon 24h i 48h izlaganja (LC<sub>50</sub>=1097,24 µg/ml i LC<sub>50</sub>=624,83 µg/ml). Pored pomenutog soja, sojevi koji su takođe ispoljili značajan toksičan efekat u ovom radu bili su i *Lyngbya* K10 (LC<sub>50</sub>=2871,19 µg/ml) i *Cylindrospermum* K1 (LC<sub>50</sub>=3141,56 µg/ml). Značajan toksičan efekat nakon 48h uočen je kod sojeva *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18 i *Nostoc* K15 (LC<sub>50</sub>=1441,25 µg/ml; LC<sub>50</sub>=1874,01 µg/ml; LC<sub>50</sub>=1912,45 µg/ml). U poređenju sa rezultatima Kyselková i Maršálek (2000) dobijenim za toksične frakcije tri vodena ekosistema, kod kojih su se LC<sub>50</sub> vrednosti kretale u opsegu od 6,8 do 12,9 mg/ml, sojevi testirani u ovom radu ispoljili su veći toksičan efekat. Do sličnih rezultata došli su i D'ors i sar. (2013) koji su pokazali da su nakon 24h ekstrakti soja *Microcystis aeruginosa* bili toksični za *Artemia nauplii* u dozno-zavisnom i soj-specifičnom maniru kao i da se kod roda *Microcystis* uočavaju varijacije u toksičnosti između individualnih vrsta ili sojeva. I u ovom radu registrovana je dozno zavisna i vremenski zavisna toksičnost sojeva, kao i soj specifičnost ovog svojstva.

U poređenju sa rezultatima Metcalf i sar. (2002) dobijenim za čist toksin cilindrospermopsin (tokom 72h LC<sub>50</sub> vrednostima su opadale od 8,1 µg/ml do 0,71 µg/ml) sojevi testirani u ovom radu ispoljili su daleko slabiju toksičnost. U slučaju različitih varijanti mikrocinina Lee i sar. (1999) su pokazali da su se nakon 24h izlaganja račića toksinima LC<sub>50</sub> vrednosti kretale u opsegu od 12,7 µg/ml (MCYST-RA) do 22,3 µg/ml (MCYST-LR). U poređenju sa rezultatima Lee i sar. (1999) i Metcalf i sar. (2002) dobijenim za čiste toksine (cilindrospermopsin i varijante mikrocinina), testirani metanolni ekstrakti terestričnih cijanobakterija izolovanih iz šumskih ekosistema ispoljili su daleko slabiji toksičan efekat. Međutim, prema McElhiney i Lawton (2005) bioesej *A. salina* nije specifičan za mikrocinine i na njega značajno mogu uticati i druga jedinjenja prisutna u uzorku ukazujući na neophodnost korišćenja i drugih bioeseja kao i sofisticiranih analitičkih metoda detekcije toksičnosti.



Za razliku od prethodno pomenutih sojeva, u slučaju 8 manje toksičnih sojeva nakon 48h dobijene su LC<sub>25</sub> vrednosti. Među sojevima kod kojih su detektovane LC<sub>25</sub> vrednosti bili su *Tolypothrix* K11 (LC<sub>25</sub>=984,99 µg/ml) i *Phormidium* T18 (LC<sub>25</sub>=535,95 µg/ml). Sa druge strane, u slučaju 4 testirana cijanobakterijska soja (*Calothrix* SP2, *Lyngbya* T7, *Anabaena* M2, *Anabaena* SP2) vrednosti za LC<sub>25</sub> i LC<sub>50</sub> nisu dobijene. Odnosno, kod datih sojeva mortalitet račića je bio ispod 20% nakon 48h izlaganja ukazujući na njihovu nisku toksičnost.

Tabela 39. Dobijene LC<sub>25</sub> ili LC<sub>50</sub> vrednosti za 75% metanolne ekstrakte u bioeseju *A. salina*

Testirani sojevi	LC <sub>25</sub> vrednosti (48h)	LC <sub>50</sub> vrednosti (48h)	LC <sub>50</sub> vrednosti (24h)
<i>Nostoc</i> M1	n.d.*	n.d.	601,39±14,55 µg/ml
<i>Phormidium</i> M1	2080,79±24,05 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> M2	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> M2	1441,50±12,66 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> M2	n.d.	1441,25±3,81 µg/ml	n.d.
<i>Oscillatoria</i> SP2	n.d.	2094,34±8,48 µg/ml	n.d.
<i>Anabaena</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> SP5	1361,17±4,28 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T7	n.d.	624,83±3,11 µg/ml	1097,24±4,04 µg/ml
<i>Lyngbya</i> T7	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> T11	535,95±6,19 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T18	996,87±4,96 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> T18	n.d.	1874,01±1,76 µg/ml	n.d.
<i>Cylindrospermum</i> K1	n.d.	2800±3,13 µg/ml	3141,56±5,02 µg/ml
<i>Lyngbya</i> K10	n.d.	2675,18±7,08 µg/ml	2871,19±6,35 µg/ml
<i>Tolypothrix</i> K11	984,99±3,88 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K15	2253,62±6,77 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> K15	1272,65±4,67 µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> K15	n.d.	1912,45±4,69 µg/ml	n.d.

\*n.d. – nije detektovano

Pored metanolnih ekstrakata, u ovom radu ispitan je i efekat DMSO ekstrakata 20 cijanobakterijskih sojeva na račiće *A. salina*. Za razliku od 75% metanolnih ekstrakata kod kojih je toksičan efekat na *A. salina* ispoljilo čak 16 testiranih cijanobakterijskih sojeva (80% sojeva), u slučaju DMSO ekstrakata toksičan efekat ispoljilo je svega 5 testiranih sojeva (30% sojeva) (Tabela 40). Međutim kao i u slučaju 75% MeOH ekstrakata kod DMSO ekstrakata takođe je uočen porast mortaliteta sa povećanjem vremena izlaganja račića (Prilog 8 Grafici 103-107). Među testiranim DMSO ekstraktima, najtoksičniji soj bio je *Nostoc* T7 (LC<sub>50</sub>=950,43±6,16 µg/ml). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za 75% MeOH ekstrakte s obzirom da je među testiranim sojevima metanolni ekstrakt soja *Nostoc* T7 bio najtoksičniji. Pored soja *Nostoc* T7, u slučaju DMSO ekstrakata LC<sub>50</sub> vrednosti dobijene su i za sojeve *Cylindrospermum* K1 i *Anabaena* M2 koji su ispoljili niži toksičan efekat na račiće (LC<sub>50</sub>=2721,19±8,12 µg/ml i LC<sub>50</sub>=3027,50±2,77 µg/ml). Sa druge strane, u slučaju dva soja roda *Nostoc*, *Nostoc* SP5 i *Nostoc* T18, LC<sub>50</sub> vrednosti nisu registrovane. Kod pomenuta dva soja dobijene su LC<sub>25</sub> vrednosti koje su iznosile 2513,18±4,96 µg/ml (*Nostoc* SP5) odnosno 2967,25±10,80 µg/ml (*Nostoc* T18).



Dobijeni rezultati ukazuju da je metanol bolji rastvarač toksičnih jedinjenja cijanobakterija u odnosu na DMSO. U slučaju 3 cijanobakterijske soje (*Calothrix* SP2, *Lyngbya* T7, *Anabaena* SP2) 75% MeOH i DMSO ekstrakti nisu delovali letalno na račiče. Na osnovu dobijenih rezultata *Calothrix* SP2, *Lyngbya* T7 i *Anabaena* SP2 pokazali su se kao netoksični sojevi u bioeseju *A. salina*.

Tabela 40. Dobijene LC<sub>25</sub> ili LC<sub>50</sub> vrednosti za DMSO ekstrakte u bioeseju *A. salina*

Testirani sojevi	LC <sub>50</sub> ili LC <sub>25</sub> * vrednosti (48h)	LC <sub>50</sub> ili LC <sub>25</sub> * vrednosti (24h)
<i>Nostoc</i> M1	n.d.*	n.d.
<i>Phormidium</i> M1	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> M2	LC <sub>50</sub> =2721,19±8,12 µg/ml	LC <sub>50</sub> =2921,72±11,23 µg/ml
<i>Calothrix</i> M2	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> M2	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> SP2	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> SP2	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> SP2	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> SP5	LC <sub>25</sub> =2513,18±4,96 µg/ml*	LC <sub>25</sub> =3080,05±7,51 µg/ml*
<i>Nostoc</i> T7	LC <sub>50</sub> =950,43±6,16 µg/ml	LC <sub>25</sub> =1502,31±8,21 µg/ml*
<i>Lyngbya</i> T7	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> T11	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T18	LC <sub>25</sub> = 2967,25±10,80 µg/ml *	LC <sub>25</sub> =3262,42±11,11 µg/ml*
<i>Oscillatoria</i> T18	n.d.	n.d.
<i>Cylindrospermum</i> K1	LC <sub>50</sub> =3027,50±2,77 µg/ml	LC <sub>50</sub> =3128,19±2,98 µg/ml
<i>Lyngbya</i> K10	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K11	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K15	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> K15	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> K15	n.d.	n.d.

\*n.d. – nije detektovano

Na ispoljenu toksičnost u velikoj meri utiče izbor ekstrakcionog sredstva s obzirom da su se 75% metanolni ekstrakti testiranih sojeva pokazali toksičnijim u odnosu na DMSO ekstrakte ukazujući na prirodu toksičnih metabolita. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima Sivonen i Jones (1999) koji su zabeležili da individualne vrste ili sojevi cijanobakterija ispoljavaju različit nivo toksičnosti. Pored toga, isti autori naglasili su da u slučaju nekih vrsta cijanobakterija variranje u toksičnosti može da bude i do tri reda veličine (Sivonen i Jones, 1999) ukazujući na uticaj ekstrakcionog sredstva na ispoljenu toksičnost cijanobakterija. Takođe, Lopes i sar. (2010) su pokazali da među različitim tipovima ekstrakata (vodeni, metanoli, heksanski) testiranih cijanobakterijskih sojeva u bioeseju *A. salina* vodeni ekstrakti su ispoljili najveći toksičan efekat.

Na produkciju toksina u velikoj meri utiče i faza rasta i uslovi kultivacije. Cijanotoksini se oslobađaju u vodu ili medijum tokom starenja ćelija ili ćelijske smrti i lize, pre nego kao rezultat neprekidne ekskrecije (James i Fawell, 1991; Gupta i sar., 2001; Babica i sar., 2006). Izuzetak predstavlja toksin cilindrospermopsin kod koga se više koncentracije često mogu naći u rastvorenoj formi tj. ekstracelularno s obzirom da u normalnim uslovima rasta dolazi do njegovog „curenja“ iz ćelija (Norris i sar., 2001; Falconer i Humpage, 2006; Wormer i sar., 2009). Msagati i sar. (2006) su istakli da pored faze rasta temperaturne promene takođe

indukuju varijacije u koncentraciji toksina. Tačnije, različite temperature mogu biti u korelaciji sa različitim hemijskim formama produkovanih toksina (Katircioğlu i sar., 2004). Na primer, pri temperaturama ispod 25°C *Anabaena* sp. proizvodi mikrocistin-LR, umesto mikrocistina-RR koji se prvenstveno sintetisuje pri višim temperaturama (Msagati i sar., 2006).

Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da testirani terestrični cijanobakterijski sojevi poseduju sposobnost produkcije jedinjenja sa toksičnim efektom na račiće *A. salina* u dozno-zavisnom i vremenski zavisnom maniru, kao i da toksičnost predstavlja soj-specifično svojstvo. Za razliku od metanolnih ekstrakata, DMSO ekstrakti daleko manjeg broja sojeva ispoljio je toksičan efekat na račiće ukazujući na prirodu toksičnih jedinjenja. Štaviše, dobijeni rezultati su ukazali da potencijalna toksična jedinjenja cijanobakterija predstavljaju prvenstveno polarna jedinjenja s obzirom da je veći toksičan efekat uočen u slučaju polarnih metanolnih ekstrakata. Kod određenog broja cijanobakterijskih sojeva nije zabeležen značajan toksičan efekat (mortalitet račića bio je ispod 20%) ukazujući da su dati sojevi netoksični. Međutim, u cilju boljeg razumevanja potencijalnog ekotoksikološkog uticaja terestričnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema, toksičnost je dalje testirana primenom testa sa vrstom *Daphnia magna* (akutnog imobilizacionog testa) s obzirom da se dati bioesej koristi kao rutinska metoda u ekotoksikološkim studijama u saglasnosti sa OECD smernicama.

#### 4.11.2. *Daphnia magna* bioesej

Pored bioeseja sa *A. salina*, toksičan potencijal testiranih cijanobakterijskih sojeva analiziran je i u testu sa *D. magna*. U slučaju ovog testa, uginulim jedinkama smatrane su one jedinke kod kojih je uočeno odsustvo pokretljivosti. Dobijeni rezultati su pokazali da je mali broj cijanobakterijskih sojeva (3 soja) ispoljio toksičnost u primenjenom testu (Prilog 8 Grafici 108-110). Nakon 48h izlaganja DMSO ekstraktima zabeležene LC<sub>25</sub> vrednosti su se kretale od 5,83±0,04 µg/ml (*Tolypothrix* K15) do 112,45±4,49 µg/ml (*Calothrix* M2). U slučaju preostalih sojeva testiranih u ovom radu LC<sub>25</sub> vrednosti nisu dobijene s obzirom da je mortalitet neonata bio nizak (od 5% do 20%) ukazujući na nisku toksičnost sojeva. U poređenju sa rezultatima Liu i sar. (2011) dobijenim za *M. aeruginosa* gde je mortalitet neonata iznosio od 76,67% do 86,67% DMSO ekstrakti cijanobakterijskih sojeva testirani u ovom radu ispoljili su daleko nižu toksičnost. U poređenju sa rezultatima dobijenim za soj *Microcystis aeruginosa* u testu sa *Daphnia similis* gde je detektovana LC<sub>50</sub> vrednost iznosila 186,61 mg/L nakon 24h (Sotero-Santos i sar., 2006) terestrični sojevi testirani u ovom radu ispoljili su slabiji toksičan efekat. U odnosu na LC<sub>50</sub> vrednosti dobijene za 4 soja vrste *C. raciborskii* izolovana iz jezera Balaton (2,20 mg algalne mase suvog ostatka/ml; 2,29 mg algalne mase suvog ostatka/ml; 1,52 mg algalne mase suvog ostatka/ml i 4,21 mg algalne mase suvog ostatka/ml) (Ács i sar., 2013) sojevi testirani u ovom radu takođe su se pokazali manje toksičnim prema vrsti *D. magna*.

Pored pomenutih cijanotoksina (mikrocistina i cilindrospermopsina) takođe je pokazano da BMAA redukuje mobilnost (nakon 48 h IC<sub>50</sub>=40 µg/L) i utiče na životne karakteristike kod dafnija (Lüring i sar., 2011). Do sličnih rezultata došli su i Ferrão-Filho i sar. (2010) koji su приметили da nakon približno 0,5-3 časova izlaganja dafnija uzorcima vode iz jezera koja je sadržala toksične cijanobakterije dolazi do paralize jedinki. Međutim, isti autori su istakli da nakon prebacivanja dafnija u kontrolni medijum dolazi do skoro kompletnog oporavka plivajuće aktivnosti koja se postiže nakon 24h časa. Ferrão-Filho i sar. (2008) su ukazali da uočeni efekti kod dafnija koji dovode do paralize mišića odgovornih za plivajuće pokrete

dafnija predstavljaju rezultat toksičnog efekta saksitoksina. Takođe, u slučaju sojeva *C. raciborskii* (NPLP-1) bez sposobnosti produkcije saksitoksina efekti na mobilnost nisu uočeni (Ferrão-Filho i sar., 2008). S obzirom da nakon zamene medijuma sa kontrolnim medijumom dolazi do oporavka i uspostavljanja normalnih pokreta efekti saksitoksina smatraju se reverzibilnim (Haney i sar., 1995; Ferrão-Filho i sar., 2010). Međutim, za razliku od saksitoksina smatra se da mikrocistini ne dovode do paralize i reverzibilnog efekta s obzirom da je mehanizam delovanja mikrocistina veoma različit od mehanizma delovanja saksitoksina (Ferrão-Filho i sar., 2000; Reinikainen i sar., 2001). Pored uticaja na pokretljivosti, Nogueira i sar. (2004) su pokazali da filamentozne cijanobakterije poput vrste *Aphanizomenon issatschenkoi* ispoljavaju toksičan efekat preko uticaja na rast *D. magna*. Soares i sar. (2009) su ustanovili da su rast tela i stopa rasta populacije dafnija bili smanjeni usled većeg prisustva (75-100%) *C. raciborskii* i zaključili da nedostatak energije, ali ne i toksičnost, može biti dominantan faktor koji utiče na rast račića.

U slučaju kompleksnih uzoraka cvetanja cijanobakterijske biomase Smutná i sar. (2014) su ustanovili da su se LC<sub>50</sub> vrednosti kretale u opsegu od 126,3 do 1200 mg suve mase/L. Do sličnih rezultata došli su i Tarczyska i sar. (2001) koji su pokazali da su u slučaju sirovih uzoraka biomase cijanobakterijskog cvetanja i prečišćenih ekstrakata LC<sub>50</sub> vrednosti iznosile od 23 mg suve mase/L do 2121 mg suve mase/L. Rezultati Kyselková i Maršálek (2000) su pokazali da su se u testu sa *Daphnia pulex* u slučaju frakcija tri različita vodena ekosistema LC<sub>50</sub> vrednosti kretale u rasponu od 2,01 do 6,06 mg/ml nakon 24h. U poređenju sa gore pomenutim istraživanjima, terestrični cijanobakterijski sojevi izolovani iz šumskih ekosistema analizirani u ovom radu ispoljili su daleko nižu toksičnost na dafnije.

Pored cijanotoksina drugi bioaktivni molekuli skoro opisani kod cijanobakterija kao što su jedinjenja sa estrogenim efektom i drugi endokrini ometači (Štěpánková i sar., 2011; Sychrová i sar., 2012) mogu doprineti uočenim negativnim efektima kod dafnija. Tako su Arzate-Cardenas i sar. (2010) ustanovili da mortalitet *D. magna* nije bio u korelaciji sa koncentracijom cijanotoksina mikrocistina produkovanih od strane *Microcystis* sojeva. Pored toga, Smutná i sar. (2014) su istakli da su efekti primećeni i kod akutnog i kod hroničnog testa bili nezavisni od sadržaja mikrocistina ukazujući da bi druga jedinjenja cijanobakterija (lipolisaharidi, različiti peptidi i depsi-peptidi, polarni alkaloidni metaboliti ili drugi neidentifikovani metaboliti) mogla biti važna u sveobuhvatnoj ekotoksičnosti kompleksnih cvetanja cijanobakterija. Takođe, u cilju odbrane od "predatorstva dafnija" pokazano je da *Microcystis* proizvodi i druga toksična jedinjenja, osim mikrocistina, poput aeruciklamida B i D, cijanopeptolina B i mikrociklamida 7806A (Sadler i von Elert, 2014b). Smutná i sar. (2014) su pokazali da biomasa cijanobakterija utiče na reprodukciju kod dafnija inhibirajući fertilitet za 50% pri koncentraciji 15 mg suve mase/L ukazujući da su cvetanja cijanobakterija u prirodnim uslovima veoma toksična za zooplankton (hronično i akutno).

U odnosu na rezultate dobijene u bioeseju *A. salina* daleko manji broj sojeva ispoljio je toksično delovanje u testu sa *D. magna* što bi mogao biti rezultat efikasnijih mehanizama zaštite kod dafnija. Prema Ortiz-Rodríguez i Wiegand (2010) oksidativna zaštita je efikasnija kod neonata u odnosu na odrasle jedinke pri čemu u prisustvu mikrocistina dolazi do povećanja aktivnosti antioksidativnog enzima katalaze (CAT) što doprinosi ublažavanju oksidativnog stresa. Shodno tome, uočen nizak toksičan efekat u ovom radu delom bi mogao biti objašnjen i efikasnim sistemom eliminacije/neutralizacije cijanotoksina preko mehanizma oksidativne zaštite dafnija.

Pored toga, Dao i sar. (2010) su istakli da dafnije mogu da razviju „tolerantnost“ prema cijanobakterijskim toksinima. Do sličnih rezultata došli su i Gustafsson i Hansson (2004) koji su istakli da toksini manje utiču na populacije *D. magna* koje su u svojim prirodnim staništima izložene čestim pojavama toksičnih cijanobakterija. Prema Sarnelle i sar. (2010), populacije dafnija koje su imale prethodan kontakt sa toksičnim cijanobakterijama mogu da pokažu pozitivan prirodni priraštaj. Štaviše, pokazano je da dafnije poseduju sposobnost lokalne adaptacije na toksične cijanobakterije i sposobnost „supresije“ formiranja cvetanja cijanobakterija (Lyu i sar., 2015).

Za razliku od rezultata dobijenih u prethodnim istraživanjima, rezultati Chen i sar. (2005) su pokazali da mikrocistini prisutni u malim koncentracijama nemaju štetan efekat, ali takođe ni stimulatívni efekat na dafnije. U slučaju prisustva toksina u većim koncentracijama i tokom dužeg vremenskog perioda dolazi do smanjenja enzimske aktivnosti (GST, glutation) antioksidativnog sistema najverovatnije prouzrokovanog usled detoksifikacije prisutnih toksina (Chen i sar., 2005). Biotransformacije i antioksidativni enzimi omogućavaju *D. magna* preživljavanje u prisustvu MC-LR do određene koncentracije (Ortiz-Rodríguez i Wiegand, 2010). Prema Sadler i von Elert (2014a,b) GST je kod dafnija uključen u odgovor na oksidativni stres pre nego specifičnu detoksifikaciju MCs, i rezultati istih autora su ukazali na postojanje efikasnih transportnih mehanizama koji uklanjaju nekonjugovane MC-LR. Međutim, Chen i sar. (2005) su konstatovali da izloženost velikim dozama mikrocistina tokom dužeg vremenskog perioda ima letalan efekat na vrstu *Daphnia magna*.

Na osnovu rezultata dobijenih u testovima sa invertibratima, pokazano je da neki od testiranih sojeva cijanobakterija poseduju sposobnost produkcije toksičnih jedinjenja sa letalnim efektima na račiće. Pored toga, u slučaju bioeseja *A. salina* 75% metanolni ekstrakti većine sojeva pokazali su se naročito potentnim. Sa druge strane, u slučaju DMSO ekstrakata uočen je manji toksičan efekat u oba testa. Shodno tome, sledeći korak u radu bio je ispitivanje toksičnosti cijanobakterijskih sojeva na embrione zebrića kao model organizma za vertebrate.

#### 4.11.3. *Danio rerio* bioesej

Toksičnost DMSO ekstrakata cijanobakterijskih sojeva testirana je u DarT testu sa embrionima vrste *Danio rerio*. Kao ekstrakciono sredstvo korišćen je DMSO s obzirom da je u testovima sa embrionima riba dimetil sulfoksid (DMSO) najčešće korišćen rastvarač iz nekoliko razloga: 1) veoma niska toksičnost, 2) DMSO ne podržava rast bakterija ili gljiva u test sistemu, 3) DMSO poseduje sposobnost penetracije kroz biološke membrane (horion) bez značajnijeg oštećenja njihovog integriteta i strukture i time služi kao pogodan nosač za unos i apsorpciju hemikalija u embrion koji se razvija (Kais i sar., 2013). Apсорpcija (pored distribucije, metabolizma i ekskrecije) predstavlja ključni faktor koji utiču na toksičnost jedinjenja (Yang i sar., 2009). Upravo zbog toga, odabir odgovarajućeg ekstrakcionog sredstva i sposobnost unosa hemikalija u embrion predstavlja veoma bitan faktor imajući u vidu da sva jedinjenja nemaju istu sposobnost penetracije kroz horion zebrića (Milan i sar., 2003).

Nakon 48h izlaganja DMSO ekstraktima cijanobakterijskih sojeva krajnje letalne tačke bile su: koagulacija oplođenih jaja, nedostatak kontrakcije embriona, nedostatak odvajanja pupoljka repa od žumančane kese i odsustvo srčane aktivnosti. Na osnovu dobijenih rezultata, u bioeseju za zebričama DMSO ekstrakti 6 cijanobakterijskih sojeva su ispoljili toksičan efekat na embrione (Prilog 8 Grafici 111-116). Među testiranim sojevima najtoksičnijim su se pokazali *Cylindrospermum* K1 ( $LC_{50}=29,3 \mu\text{g/ml}$ ) i *Nostoc* T18 ( $LC_{50}=108,42 \mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 41). U slučaju 4 soja toksičnost je izražena preko  $LC_{25}$  vrednosti pri čemu su sojevi *Oscillatoria* M2 i *Oscillatoria* T18 bili potentniji ( $25,63 \mu\text{g/ml}$  i  $34,97 \mu\text{g/ml}$ ) u odnosu na sojeve *Nostoc* T7 ( $49,68 \mu\text{g/ml}$ ) i *Nostoc* K15 ( $64,07 \mu\text{g/ml}$ ).

Tabela 41. Rezultati  $LC_{50}$  ili  $LC_{25}$  vrednosti dobijeni primenom DarT testa

Testirani sojevi	$LC_{25}$ vrednosti (48h)	$LC_{50}$ vrednosti (48h)
<i>Nostoc</i> M1	n.d.*	n.d.
<i>Phormidium</i> M1	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> M2	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> M2	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> M2	25,63 $\mu\text{g/ml}$	n.d.
<i>Calothrix</i> SP2	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> SP2	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> SP2	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> SP5	n.d.	n.d.
<i>Cylindrospermum</i> K1	n.d.	29,3 $\mu\text{g/ml}$
<i>Lyngbya</i> K10	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K11	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K15	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> K15	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> K15	64,07 $\mu\text{g/ml}$	n.d.
<i>Lyngbya</i> T7	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> T11	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T7	49,68 $\mu\text{g/ml}$	n.d.
<i>Oscillatoria</i> T18	34,97 $\mu\text{g/ml}$	n.d.
<i>Nostoc</i> T18	n.d.	108,42 $\mu\text{g/ml}$

\*n.d. – nije detektovano

Dobijeni rezultati su ukazali da neki od testiranih cijanobakterija izolovanih iz šumskih ekosistema poseduju sposobnost produkcije jedinjenja sa teratogenim efektom na embrione zebričica. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima Oberemm i sar. (1999) koji su utvrdili da se značaj korišćena embriona ogleda u činjenici da u odnosu na juvenilni ili adultni stupanj razvoja, tokom ranog životnog ciklusa ribe mogu biti daleko osetljivije na cijanotoksine zbog smanjene mobilnosti/pokretljivosti u cilju izbegavanja kontaminanata. Generalno, u ranim fazama života izloženost cijanotoksinima, poput mikrocistina, izaziva na dozno-zavistan način smanjenje preživljavanja i stope rasta kao i histopatološke efekte (proširene i neprozirne žumančane kese, malu glavu, zakrivljenog tela i repa, hepatobilijarne abnormalnosti, ultrastrukturne promene hepatocita, poremećaje srčanog pulsa) (Malbrouck i Kestemont, 2006). Pokazano je da mikrocistini mogu da dovedu do poremećaja u razvoju, smanjenju stope „izleganja“ embriona, malformacija embriona kao i do nastanka oksidativnog stresa usled akumulacije toksina u srcu jedinki (Oberemm i sar., 1997; Wiegand i sar., 1999; Liu i sar., 2002; Jacquet i sar., 2004; Wang i sar., 2005; Zhang i sar., 2008). U slučaju MC-LR, smatra se da srce predstavlja potencijalnu metu i da MC-LR indukovana apoptoza može dovesti do



blokiranja cirkulacije smanjenjem srčanog ritma ometajući time rani razvoj embriona. MC-LR indukovana razvojna toksičnost kod embriona može biti delimično objašnjena ROS-indukovanim apoptozom (Zeng i sar., 2014). Sa druge strane, u slučaju MC-RR smatra se da uočena razvojna toksičnost poput zastoja rasta i smanjenja srčane aktivnosti kod embriona nastaje najverovatnije usled endokrinog poremećaja tiroidne žlezne (Xie i sar., 2015).

Pored toga, u slučaju mikrocistina pokazano je da postoji mogućnost transfera akumuliranog mikrocistina sa majke na potomstvo (Zeng i sar., 2014). Rezultati Liu i sar. (2014) su utvrdili da izlaganje roditelja zebrića MC-LR dovodi do oštećenja jetre i očigledno utiče na rast i funkciju imunog sistema F1 potomstva kao rezultat „prenosa“ toksičnog efekta mikrocistina sa roditelja na potomstvo. U slučaju odraslih jedinki, mikrocistini se akumuliraju uglavnom u jetri, ali se takođe mogu naći i u mišićima i utrobi (Malbrouck i Kestemont, 2006) ukazujući da su toksični efekti cijanotoksina poput mikrocistina specifični za svaki stupanj razvoja (Liu i sar., 2002; Jacquet i sar., 2004). Pored toga, kod adultnih jedinki mikrocistini deluju na stopu rasta i osmoregulaciju, povećavaju aktivnost enzima jetre u serumu i srčanu frekvenciju, modifikuju ponašanje i ispoljavaju histopatološke efekte u različitim organima (jetra, creva, bubrezi, srce, slezina ili škrge) (Malbrouck i Kestemont, 2006).

Sa druge strane, za razliku od mikrocistina, studije toksičnog efekta cilindrospermopsina na ribe, kako *in vivo* tako i *in vitro*, i dalje su veoma oskudne (Gutiérrez-Praena i sar., 2011). Puerto i sar. (2014) su naglasili da iako je opšte poznato da cilindrospermopsin predstavlja ozbiljnu pretnju bezbednosti vode za piće, akutni toksični testovi sa ribama su i dalje retki. Uprkos kosmopolitskom rastrostranjenu CYN u akvatičnim sistemima, svega par studija je rađeno vezano za akumulaciju i toksične efekte CYN kod riba (Sotton i sar., 2015). Pored toga, Sotton i sar. (2015) su istakli da u dosadašnjim radovima vezanim za CYN, biološki efekti CYN na embrione riba izuzetno su retki iako upravo jaja i embrioni riba predstavljaju najviše izložene i najosetljivije stadijume imajući u vidu da je CYN prisutan prvenstveno ekstracelularno. Prema Sotton i sar. (2015) ispitivanje bioloških efekata CYN na embrionalni stupanj razvoja kod riba rađeno je samo u jednoj studiji. Berry i sar. (2009) su pokazali da je injektovanje CYN direktno u embrione zebrića letalno, ali da ne dovodi do inhibicije specifičnih puteva u razvoju. U slučaju dodavanja ekstrakata slatkovodnih cijanobakterijskih vrsta producenata CYN (*Cylindrospermopsis raciborskii* i *Aphanizomenon ovalisporum*) u medijum, pored povećanog mortaliteta uočeni su i poremećaji u razvoju ukazujući da drugi metaboliti prisutni u ekstraktima inhibiraju razvoj embriona zebrića (Berry i sar., 2009).

U saglasnosti sa nalazima Berry i sar. (2009) dobijenim za ekstrakte *C. raciborskii*, rezultati ovog rada takođe su pokazali da DMSO ekstrakt cijanobakterijskog soja *Cylindrospermum* K1 dovodi do teratogenog efekta embriona zebrića. Štaviše, među svim testiranim sojevima najtoksičniji efekat u ovom radu uočen je upravo kod soja *Cylindrospermum* K1 ukazujući da pored vodenih sojeva roda *Cylindrospermopsis* terestrični pripadnici roda *Cylindrospermum* takođe mogu biti značajni producenti jedinjenja sa teratogenim efektima na embrione zebrića. Međutim, s obzirom da su testiranim ekstrakti soja *Cylindrospermum* K1 a ne čisti toksini poput CYN ili MC-LR, uočeni efekti ne mogu se pripisati njihovom dejstvu bez detaljnijih analiza ekstrakata primenom hemijskih analitičkih metoda. Pored toga, Sotton i sar. (2015) su istakli da zbog izuzetne hidrofилnosti toksina prolazak molekula CYN kroz horion može da bude smanjen ukazujući da bi druga jedinjenja mogla da predstavljaju negativni faktor koji utiče na razvoj embriona i preživljavanje.

Pietsch i sar. (2001) su istakli značaj korišćena „sirovih“ cijanobakterijskih ekstrakata u ekotoksikološkim studijama ukazujući da su u bioesejima sa različitim organizmima (mikroalgom - *Scenedesmus armatus*; makrofitom - *Ceratophyllum demersum*; invertebratima - *Chaoborus crystallinus*, vertebratima - *Danio rerio*) potentniji toksični efekti zabeleženi u slučaju „sirovih“ ekstrakata u poređenju sa čistim cijanobakterijskim toksinima korišćenim u ekvivalentnim koncentracijama. Pored toga, isti autori su ukazali na značaj testiranja „sirovih“ ekstrakata s obzirom na činjenicu da je u uzorcima vode „cvetanja“ cijanobakterija prisutna upravo mešavina različitih jedinjenja (Pietsch i sar., 2001). Pored toksina prilikom pojave cvetanja cijanobakterija detektovano je prisustvo derivata retinoinske kiseline (Wu i sar., 2012, 2013). Signaling retinoinske kiseline (RA) esencijalan je za normalan razvoj vertebrata i visoko je konzervisan između različitih vrsta (Rhinn i Dollé, 2012). Upravo zbog toga, mnogi autori smatraju da malformacije primećene kod zebrića koje nisu mogle biti objašnjene dejstvom mikrocistina i cilindrospermopsina mogu biti rezultat dejstva retinoinske kiseline (Oberemm i sar., 1997; Berry i sar., 2009; Ács i sar., 2013).

Takođe, sinergizam i aditivni efekti mogu doprineti uočenim rezultatima. Tako su mortalitet embriona i malformacije kod embriona bili indukovani većim koncentracijama ekstrakta *Aphanizomenon gracile* za koje je pokazano da ne sadrži mikrocistine ukazujući na prisustvo drugih jedinjenja sa toksičnim efektom (Jonas i sar., 2015). Prisustvo jedinjenja sa retinoid-sličnom aktivnošću uočeno je kod cijanobakterijskih vrsta *P. agardhii* i *A. gracile* (Jonas i sar., 2015). Analizirajući bioaktivna jedinjenja tri cijanobakterijske vrste (*Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* i *Aphanizomenon gracile*) Jonas i sar. (2015) su konstatovali da je teratogenost kod zebrića najverovatnije povezana sa retinoidima, i da tradicionalno analizirani cijanotoksin mikrocistin najverovatnije nije odgovoran za uočene efekte. Pored toga, pokazano je da za razliku od ekskudata zelene vrste alge *Desmodesmus quadricaudus* ekskudati dve vrste cijanobakterija (*Microcystis aeruginosa* i *Cylindrospermopsis raciborskii*) prouzrokuju različite teratogene efekte kod zebrića (npr. deformacije repa, kičme i usta) i utiču na rast embriona zebrića (Jonas i sar., 2014). Shodno tome, Jonas i sar. (2015) su ukazali da se jedinjenja sa estrogenim efektom i retinoid-slična jedinjenja mogu pojaviti simultano kod cijanobakterija odnosno, sinergistički efekti između različitih jedinjenja treba da budu uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata toksičnosti (Sotton i sar., 2015).

Walton i sar. (2014) su pokazali da indol alkaloidi izolovani iz roda *Fischerella* i drugih članova *Stigonemataceae* koji su prethodno prvenstveno bili povezivani sa antimikrobnom i antialgalnom aktivnošću takođe ispoljavaju i teratogeni efekat na embrione zebrića. Pored toga, skorašnji rezultati Jaja-Chimedza i sar. (2017) su pokazali da su tri hemijski srodna karotenoida iz grupe ksantofil glikozida (miksol 2'-glukozid, 4-ketomsikol 2'-glukozid i 4-hidroksimiksol 2'-glukozid), izolovana iz dva soja *C. raciborskii* ispoljila teratogeni efekat na embrione zebrića. Zajedno sa retinoidnom kiselinom karotenoidi su takođe prepoznati kao "pro-retinoidi" koji predstavljaju metaboličke proizvode oksidativnog „cepanja“ karotenoida. Shodno tome, karotenoidi predstavljaju ključne medijatore razvoja embriona sa potentnim teratogenim efektima na zebriće (Jaja-Chimedza i sar., 2017). Upravo zbog činjenice da cijanobakterije imaju sposobnost produkcije širokog spektra jedinjenja sa potencijalno toksičnim efektima, Jonas i sar. (2015) su istakli da je u slučaju uočenog teratogenog efekta često veoma teško odrediti koja su tačno jedinjenja odgovorna imajući u vidu kompleksnost cijanobakterijskih ekstrakata.



Međutim, i pored brojnih prednosti upotrebe DarT eseja (brz embrionalni razvoj, velika produkcija jaja; jednostavnost metode) kao *in vivo* teratogenog testa nedostaci ovog eseja su:

1) Smanjenja apsorpcija veoma lipofilnih supstanci ili supstanci veoma velikih molekulskih masa usled prisustva horiona koji obavija embrion čineći otežanom detekciju proteratogenog potencijala testiranih jedinjenja zbog čega je preporučeno da vreme izlaganja embriona bude produženo nakon „izleganja“ embriona, na primer od 48h do 96h, kako bi potencijalni toksični efekti mogli biti vidljivi (Henn i Braunbeck, 2011; Busquet i sar., 2014);

2) Zbog toksičnosti mikrozoma na embrione riba vreme kontakta sa test jedinjenjima je ograničeno na 1 čas, odnosno embrioni riba su izloženi supstanci koja se testira samo tokom kratkog vremenskog perioda razvoja (Busquet i sar., 2008);

3) DarT test ne obezbeđuje informacije o mehanizmu delovanja koji dovodi do toksičnih efekata. Ovi nedostaci mogu biti prevaziđeni posmatranjem promene u ekspresiji gena kao krajnje tačke (Voelker i sar., 2007). Pored toga, imajući u vidu da se štetni efekti toksina manifestuju na molekularnom nivou, toksikogenomičkim pristupima mogu se identifikovati visoko senzitivni mehanizmi koji mogu ukazati na dugoročne štetne efekte (Corvi, 2002).

Sumiranjem i poređenjem rezultata dobijenih primenom tri različita testa, među testiranim organizmima najveći broj analiziranih cijanobakterija delovao je račiće *A. salina*, potom na *Danio rerio*. Najotpornijim na ekstrakte cijanobakterija pokazale su se dafnije kod kojih su zabeleženi najmanji negativni efekti na imobilizaciju jedinki (Tabela 42). Do sličnih rezultata došli su i Tarczynska i sar. (2001) koji su pokazali da su se među tri korišćena biotesta (*Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna* i *Spirostomum ambiguum*) najmanje senzitivnim organizmima pokazale dafnije. U istom radu, senzitivnost organizama na cijanobakterijske ekstrakte opadala je u sledećem nizu: *S. ambiguum* > *T. Platyurus* > *D. magna*. Pored toga, isti autori su pokazali da je veća toksičnost u bioesejima zabeležena kod sirovih ekstrakata cvetanja cijanobakterija u odnosu na prečišćene ekstrakte (Tarczynska i sar., 2001). Sa druge strane, u radu Kyselková i Maršálek (2000) među testiranim organizmima najsenzitivnije su bile dafnije. U radu Kyselková i Maršálek (2000) u tri bioeseja senzitivnost testiranih vrsta opadala je u sledećem redosledu: *Daphnia pulex* > *Artemia salina* > *Tubifex tubifex*. Dobijeni rezultati ukazuju da različiti model organizmi ispoljavaju drugačiju senzitivnost kao i da uočeni toksičan potencijal cijanobakterijskih sojeva zavisi i od kombinacije cijanobakterija – test organizam.

Na osnovu dobijenih rezultata, 40% testiranih sojeva ispoljilo je toksičan efekat u dva bioeseja pri čemu je svaki soj ispoljio specifičnost u odnosu na test organizam (Tabela 42). Sojevi koji su ispoljili negativan toksičan efekat na dva različita modela organizma bili su *Calothrix* M2, *Oscillatoria* M2, *Cylindrospermum* K1, *Tolypothrix* K15, *Nostoc* K15, *Nostoc* T7, *Oscillatoria* T18 i *Nostoc* T18. Sa druge strane, u slučaju 9 testiranih sojeva mortalitet jedinki veći od 25% odnosno 50% uočen je samo u jednom bioeseju. Sojevi koji su delovali toksično na samo jednu grupu organizama (račiće, dafnije ili zebrice) bili su *Phormidium* M1, *Anabaena* M2, *Oscillatoria* SP2, *Nostoc* SP5, *Lyngbya* K10, *Tolypothrix* K11, *Phormidium* K15, *Lyngbya* T7 i *Phormidium* T11. U slučaju tri soja (*Calothrix* SP2, *Anabaena* SP2 i *Lyngbya* T7), toksičan efekat nije uočen ni u jednom od pomenuta tri testa ukazujući da su dati sojevi netoksični.

Tabela 42. Rezultati LC<sub>50</sub> ili LC<sub>25</sub> vrednosti dobijeni primenom tri različita testa

Testirani sojevi	<i>A. salina</i> (48h)	<i>D. magna</i> (48h)	<i>D. rerio</i> (48h)
<i>Nostoc</i> M1	n.d.*	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> M1	2080,79** µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> M2	2721,19* µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Calothrix</i> M2	2162,25** µg/ml	112,45** µg/ml	n.d.
<i>Oscillatoria</i> M2	2161,87* µg/ml	n.d.	25,63** µg/ml
<i>Calothrix</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oscillatoria</i> SP2	3372,44* µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Anabaena</i> SP2	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> SP5	14014,39* µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Cylindrospermum</i> K1	4480,91* µg/ml	n.d.	29,3* µg/ml
<i>Lyngbya</i> K10	3448,52* µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K11	1335,13** µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Tolypothrix</i> K15	3380,1** µg/ml	5,83** µg/ml	n.d.
<i>Phormidium</i> K15	2,91* µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> K15	2867,95* µg/ml	n.d.	64,07** µg/ml
<i>Lyngbya</i> T7	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phormidium</i> T11	0,95** µg/ml	n.d.	n.d.
<i>Nostoc</i> T7	624,83* µg/ml	68,79** µg/ml	49,68** µg/ml
<i>Oscillatoria</i> T18	2811,03* µg/ml	n.d.	34,97** µg/ml
<i>Nostoc</i> T18	1478,81** µg/ml	n.d.	108,42* µg/ml

LC<sub>50</sub>\* vrednostiLC<sub>25</sub>\*\* vrednosti

\*n.d. – nije detektovano

Međutim, s obzirom da su u ovom radu u sva tri bioeseja testirani „sirovi“ ekstrakti, uočeni toksični efekti ne mogu biti pripisani odgovarajućem jedinjenju ukazujući na neophodnost dodatnih analiza u budućnosti primenom analitičkih metoda poput HPLC, LC/MS u cilju identifikacije jedinjenja odgovornih za uočene efekte. Ipak, Ferrão-Filho i Kozłowsky-Suzuki (2011) su istakli da karakterizacija tačnog toksičnog metabolita uzročnika negativnih efekata često može biti otežana s obzirom na sposobnost cijanobakterijskih sojeva da proizvode više od jednog toksičnog metabolita. Do sličnih rezultata došli su i Kyselková i Maršálek (2000) koji su ukazali da ispitivanje sirovih ekstrakata cijanobakterija može biti problematično zbog prisustva i drugih jedinjenja koja su generalno netoksična (npr. organskih kiselina, amino-kiselina, jona, pigmenata i proteina) koja ukoliko su prisutna u visokim koncentracijama mogu da utiču na fizičko-hemijske karakteristike test medijuma (npr. pH vrednost medijuma ili sadržaj kiseonika). Maršálek i Bláha (2000) su istakli da test organizmi mogu da reaguju veoma osetljivo na promene u medijumu i u takvim slučajevima primećeni efekti ne moraju nužno biti povezani sa prisustvom ili količinom cijanobakterijskih toksina.

Pored toga, Novakova i sar. (2012) su istakli da mogućnost sinergističkog delovanja između različitih metabolita cijanobakterija i njihove interakcije sa drugim toksičnim jedinjenjima koja mogu da se akumuliraju u testiranim uzorcima ne bi trebala da se zanemari. Na primer, pokazano je da lipopolisaharidi (LPS) ispoljavaju potencijalan sinergistički efekat sa mikrocistinima kod dafnija (Pires i sar., 2011) i kod zebrića (Best i sar., 2002). Takođe, Smutná i sar. (2014) ukazali su da prisustvo LPS redukuje stopu detoksikacije mikrocistina pospešujući toksičan efekat istih. Pored toga, Ács i sar. (2013) su sugerisali da toksični efekti dobijeni za kompleksne cijanobakterijske uzorke u mnogim rutinski korišćenim bioesejima ne mogu uvek biti direktno povezani sa produkcijom nekih preovlađujućih toksina cijanobakterija (mikrocistina, cilindrospermopsina, anatoksina i dr.). Odnosno, ovi efekti mogu biti prouzrokovani dodatnim, manje istraženim toksičnim metabolitima sintetisanim od strane cijanobakterija, ili metabolitima koji čak iako sami nisu toksični, mogu modifikovati efekte preovlađujućih toksina (Oberemm i sar., 1997; Pietsch i sar., 2001; Buryskova i sar., 2006; Falconer, 2007; Ács i sar., 2013).

Na kraju, rezultati ovog rada dobijeni primenom tri različita biotesta su pokazali da terestrični cijanobakterijski sojevi izolovani iz šumskih ekosistema Republike Srbije poseduju sposobnost produkcije toksičnih jedinjenja. Pored toga, sposobnost produkcije toksina uočena je kod svih osam rodova (*Nostoc*, *Calothrix*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*) pri čemu je ispoljen toksičan efekat svakog soja bio specifičan u odnosu na test organizam. U slučaju *A. salina* bioeseja najtoksičnijim sojevima pokazali su se *Nostoc* T7, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18 i *Nostoc* K15. Takođe, na ispoljenu toksičnost u *A. salina* bioeseju uticao je i izbor rastvarač korišćen za ekstrakciju bioaktivnih metabolita sa toksičnim potencijalom ukazujući da jedinjenja odgovorna za ispoljen toksičan efekat najverovatnije pripadaju grupi polarnih jedinjenja s obzirom da su potentniju aktivnost pokazali metanolni u odnosu na DMSO ekstrakte. U slučaju *D. magna* testa sojevi sa najpotentnijom aktivnošću bili su *Tolypothrix* K15, *Nostoc* T7 i *Calothrix* M2. U bioeseju sa embrionima zebrića, soj sa najpotentnijim teratogenim efektom bio je *Cylindrospermum* K1.

Imajući u vidu da je većina istraživanjima o toksičnim efektima cijanobakterija vezana za vodene ekosisteme i pojavu „cvetanja“ cijanobakterija, ispitivanja toksičnosti terestričnih sojeva su od izuzetnog značaja. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, terestrični sojevi šumskih ekosistema su pokazali sposobnost produkcije biološki aktivnih jedinjenja odnosno cijanotoksina. Pored toga, rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da ispoljen toksičan efekat zavisi prvenstveno od kombinacije cijanobakterijski soj - test organizam. Odnosno, isti sojevi cijanobakterija ne ispoljavaju istu toksičnost na različite organizme. Upravo zbog toga, dalja istraživanja usmerena na terestrične ekosisteme od izuzetne su važnosti u cilju identifikacije i karakterizacije sojeva sa sposobnošću produkcije toksina i njihovog uticaja na živi svet.

#### 4.12. qPCR metoda i ispitivanje efekta ekstrakta odabranog cijanobakterijskog soja na ekspresiju 11 gena uključenih u signalne puteve kod model organizma *Danio rerio*

Imajući u vidu nedostatke DarT testa (limitirana apsorpcija veoma lipofilnih supstanci ili supstanci veoma velikih molekulskih masa, ograničeno vreme kontakta sa test jedinjenjem, ne obezbeđivanje informacija o mehanizmu delovanja koji dovodi do toksičnih efekata), nakon 6 dana izlaganja embriona ekstraktima soja *Cylindrospermum* K1 (koji je pokazao najpotentniju aktivnost u DarT testu) praćena je promena ekspresije 11 gena (*bip*; *xbp1*; *cat*; *sod*; *vtg1*; *per1a*; *nr1d1*; *cry5*; *p53*; *cyp1a1*; *ahr2*) uključenih u regulaciju sledećih procesa: ER stres, oksidativni stres, endokrine procese, neurofiziološke procese, metabolizam ksenobiotika i apoptozu. Kao housekeeping gen korišćen je *rpl* s obzirom da su rezultati prethodnih istraživanja pokazali da dati gen predstavlja dobru internu referencu. Prema McCurley i Callard (2008) karakteristike koje bi idealni referentni gen trebalo da poseduje su: stabilna ekspresija u uzorcima iz različitih individua i različitih tkiva, stabilna ekspresija tokom različitih razvojnih i životnih ciklusa kao i pri različitim eksperimentalnim tretmanima. Pored *rpl*, jedni od najčešće korišćenih housekeeping gena kod zebrića su i *bactin1*, *gapdh*, *18s*, *elfa*, *b2m*, *g6pd* itd. (McCurley i Callard, 2008).

DMSO je korišćen kao ekstrakciono sredstvo s obzirom na njegovu efikasnost rastvarača širokog opsega jedinjenja, polarnih i nepolarnih jedinjenja (Kligman, 1965), što ga čini čestim izborom za upotrebu u toksikološkim studijama (Hallare i sar., 2006). Pored toga, korišćena koncentracija DMSO iznosila je 0,1% što je bilo u saglasnosti sa preporučenom koncentracijom koja bi trebala da se koristi pri radu sa zebrićama s obzirom da pri datoj koncentraciji nikakvi defekti u razvoju zebrića nisu primećeni (Hallare i sar., 2006). Na osnovu dobijenih rezultata, testirani ekstrakt cijanobakterijskog soja *Cylindrospermum* K1 ispoljio je različit efekat na ekspresiju analiziranih gena. U slučaju gena uključenih u regulaciju neurofizioloških (*per1a*, *nr1d1*, *cry5*) i endokrinih procesa (*vtg*) ekstrakt soja *Cylindrospermum* K1 uticao je na promenu njihove ekspresije. Sa druge strane, u slučaju preostalih analiziranih gena nije uočena promena ekspresije ukazujući da ekstrakt soja *Cylindrospermum* K1 nije uticao na regulaciju procesa u koje su dati geni uključeni (apoptozu - *p53*, oksidativni stres - *sod*, *cat*, ER stres - *bip*, *xbp1* i metabolizam ksenobiotika - *cyp1a1*, *ahr2*).

Testirani ekstrakt cijanobakterijskog soja *Cylindrospermum* K1 ispoljio je uticaj na promene u ekspresiji *vtg1* gena, uključenog u endokrine procese (Slika 43). Značajna up-regulacija *vtg* gena uočena je pri koncentraciji 1:12.000 ukazujući da soj *Cylindrospermum* K1 poseduje sposobnost produkcije jedinjenja sa estrogenom aktivnošću s obzirom da up-regulacija *vtg* gena ukazuje na izloženost estrogenim supstancama (Rogers i sar., 2011). Rezultati dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja koja su ukazala na sposobnost jedinjenja produkovanih od strane cijanobakterija da intereaguju sa intracelularnim receptorima (Kaya i sar., 2011; Rogers i sar., 2011; Wu i sar., 2012, 2013) čija aktivacija dovodi do pokretanja signalnih puteva uključenih u regulaciju reprodukcije i razvoja vertebrata (Janosek i sar., 2006).

Estrogena jedinjenja se karakterišu sposobnošću vezivanja i aktiviranja estrogenih receptora koji pripadaju familiji steroidnih receptora (Bradley i Zacharewski, 1998). Interesantno je da jedinjenja koja ispoljavaju estrogeni efekat mogu biti hemijski vrlo raznovrsna: ER agonisti (imaju sličnu strukturu sa estrogenima) i ER-aktivna jedinjenja (imaju različitu hemijsku strukturu) (Janosek i sar., 2006). Estrogeni receptori (ER) uključeni su u metaboličke,

morfološke i promene ponašanja tokom reprodukcije i utiču na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, razvoj i homeostazu (Štěpánková i sar., 2011). Štěpánková i sar. (2011) su pokazali da eluati sredinskih uzoraka cijanobakterija ispoljavaju estrogenu efekt što ukazuje na prisustvo i hidrofobnih i hidrofobnih jedinjenja u uzorcima cijanobakterija sposobnih da modulišu ER signaling. Rogers i sar. (2011) su utvrdili da vrsta *Microcystis aeruginosa* može biti prirodan izvor jedinjenja sa estrogenim potencijalom s obzirom da je kod embriona zebrica izloženih liofiliziranim ćelijama date vrste došlo do up-regulacije vitelogenin gena (*vgt*) (koji se nalaze pod kontrolom ER). U istom radu, up-regulacija *vgt* gena nije uočena kod embriona zebrica izloženih čistom toksinu MC-LR ukazujući da su druga jedinjenja odgovorna za uočen efekat. Takođe, Jonas i sar. (2015) su pokazali da fitoplanktonske vrste cijanobakterija (*Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Aphanizomenon gracile*) proizvode estrogen-slična, retinoid-slična i/ili druga teratogena jedinjenja, koja mogu biti oslobođena u vodenu sredinu i uticati na razvoj organizama.

Tako, nodularin i mikrocistin-provodeće vrste (*Nodularia spumigena*, *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*) utiču na reprodukciju i razvoj oocita kod vodenih invertebrata (Trubetskova i Haney, 2006; Kozlowsky-Suzuki i sar., 2009). Oziol i Bouad`cha (2010) su utvrdili da bi estrogenu mehanizam nodularina-R i mikrocistina-LR mogao biti posredovan preko fosforilacije signalnih puteva koji u odgovarajućoj koncentraciji aktiviraju estrogenu receptore bez prisustva liganada. Drugi mogući mehanizam estrogenog potencijala ovih cijanotoksina može biti preko oksidativnog stresa i produkcije ROS koji mogu značajno da utiču na signalne proteine uključujući transkripcione faktore (Morel i Barouki, 1998; Sychrová i sar., 2012). Pored toga, negativan efekat cijanobakterija na reprodukciju, plodnost, razvoj oocita, preživljavanje i ishranu primećen je i kod zooplanktona (Korpinen i sar., 2006; Kozlowsky-Suzuki i sar., 2009). Na ovaj način, produkti oslobođeni tokom cvetanja cijanobakterija mogu da utiču na hormonalnu kontrolu vodenih organizama (Jonas i sar., 2015).

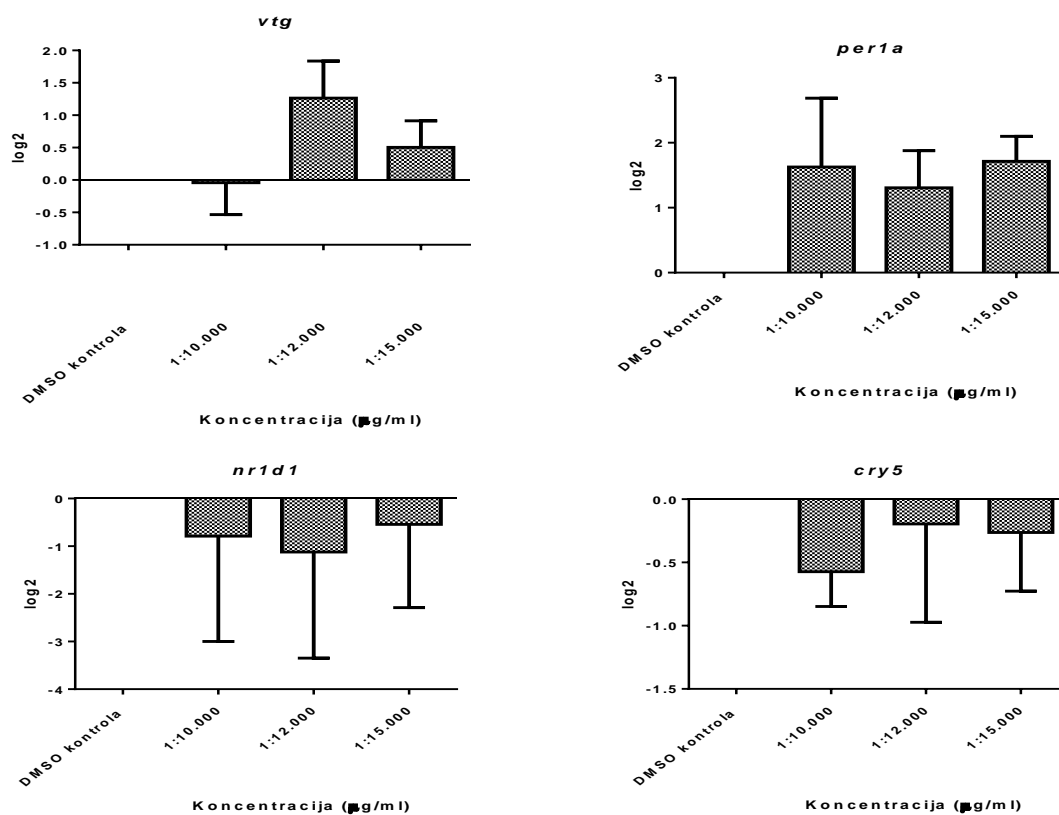
Pored uticaja na estrogenu receptore, cijanobakterije mogu da utiču i na androgenu receptore (AR). Ekstrakti kompleksnih cijanobakterijskih uzoraka ispoljavaju veći estrogenu potencijal i veću interferenciju sa androgenim signalnim putem u poređenju sa ekstraktima pojedinačnih cijanobakterijskih vrsta (Štěpánková i sar., 2011). Štaviše, Sychrová i sar. (2012) su pokazali da ekstracelularna jedinjenja cijanobakterija ispoljavaju veći estrogenu potencijal u odnosu na intracelularna jedinjenja. Najveći estrogenu efekat uočen je kod ekskudata *M. aeruginosa* sa EEQ (17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) ekvivalentna EEQ) vrednošću skoro 10-puta većom u odnosu na druge vrste cijanobakterija (*Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon klebahnii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii*). U slučaju intracelularnih jedinjenja, najveći estrogenu efekat uočen je kod vrste *Aphanizomenon gracile* (Sychrová i sar., 2012). U ovom radu testiran je sirov ekstrakt soja *Cylindrospermum* K1 ukazujući da dati soj može da proizvodi širok spektar biološki aktivnih jedinjenja od kojih neka pokazuju efekat sličan estrogenu.

Sem poremećaja endokrine regulacije steroidnih receptora (ER i AR), Yan i sar. (2012) su istakli da cijanotoksini poput MC-LR ispoljavaju endokrinu toksičnost kod zebrica i da utiče na transkripciju gena hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine dovodeći do MC-LR indukovano poremećaja štitne žlezde. Izlaganje embriona zebrica MC-LR dovodi do down-regulacije transkripcije tri gena, koji kodiraju tiroidne receptore, na dozno zavistan način kao i up i down-regulacije ekspresije *deio1* i *deio2* gena (jodotironin deiodinaze). U slučaju varijante



mikrocistina MC-RR, Zhao i sar. (2011) su pokazali da on značajno smanjuje ekspresiju brojnih proteina uključenih u energetske metabolizam, deobu ćelija, sintezu proteina, održavanje citoskeleta, odgovor na stres i replikaciju DNK. Međutim, potencijal cijanobakterijskih jedinjenja da utiču na signalne puteve drugih važnih endokrinih receptora (poput glukokortikoidnih receptora koji regulišu gene uključene u razvoj, metabolizam, stres i imuni odgovor) i dalje je nedovoljno ispitan (Odermatt i Gummy, 2008; Jonas i sar., 2015).

Pored sposobnosti soja *Cylindrospermum* K1 da proizvodi jedinjenja sa estrogenim efektom, takođe je pokazano da ekstrakt datog soja deluje i na ekspresiju gena uključenih u cirkadijalni ritam (Slika 43). U ovom radu uočena je dozno-zavisna down-regulacija *nr1d1* gena, dok je u slučaju gena *per1a* došlo do up-regulacije ekspresije. Do sličnih rezultata došli su i Faltermann i sar. (2014) koji su pokazali da su najpogođeniji putevi kod zebrića bili sistemi prepoznavanja i popravke DNK oštećenja, cirkadijalni ritam, odgovor na svetlo i metabolizam hema (uzimajući u obzir da je transkripciona promena reflektovana promenom aktivnosti genskog produkta). Cirkadijalni ritam regulisan je kompleksnim interakcijama transkripciono-translacionog i postranslacionog sistema povratne sprege (Vatine i sar., 2011). Transkripcioni procesi u retini uključeni u vizuelnu percepciju nalaze se pod regulacijom *nr1d1* gena (Mollema i sar., 2011) pri čemu epifiza predstavlja centralni fotoreceptorni organ. S obzirom da cirkadijalni ritam kontroliše brojne ćelularne i fiziološke procese Faltermann i sar. (2014) su ukazali da poremećaj regulacije unutrašnjeg internog sata ima dalji uticaj na dodatne puteve i procese, uključujući hormonalne puteve.

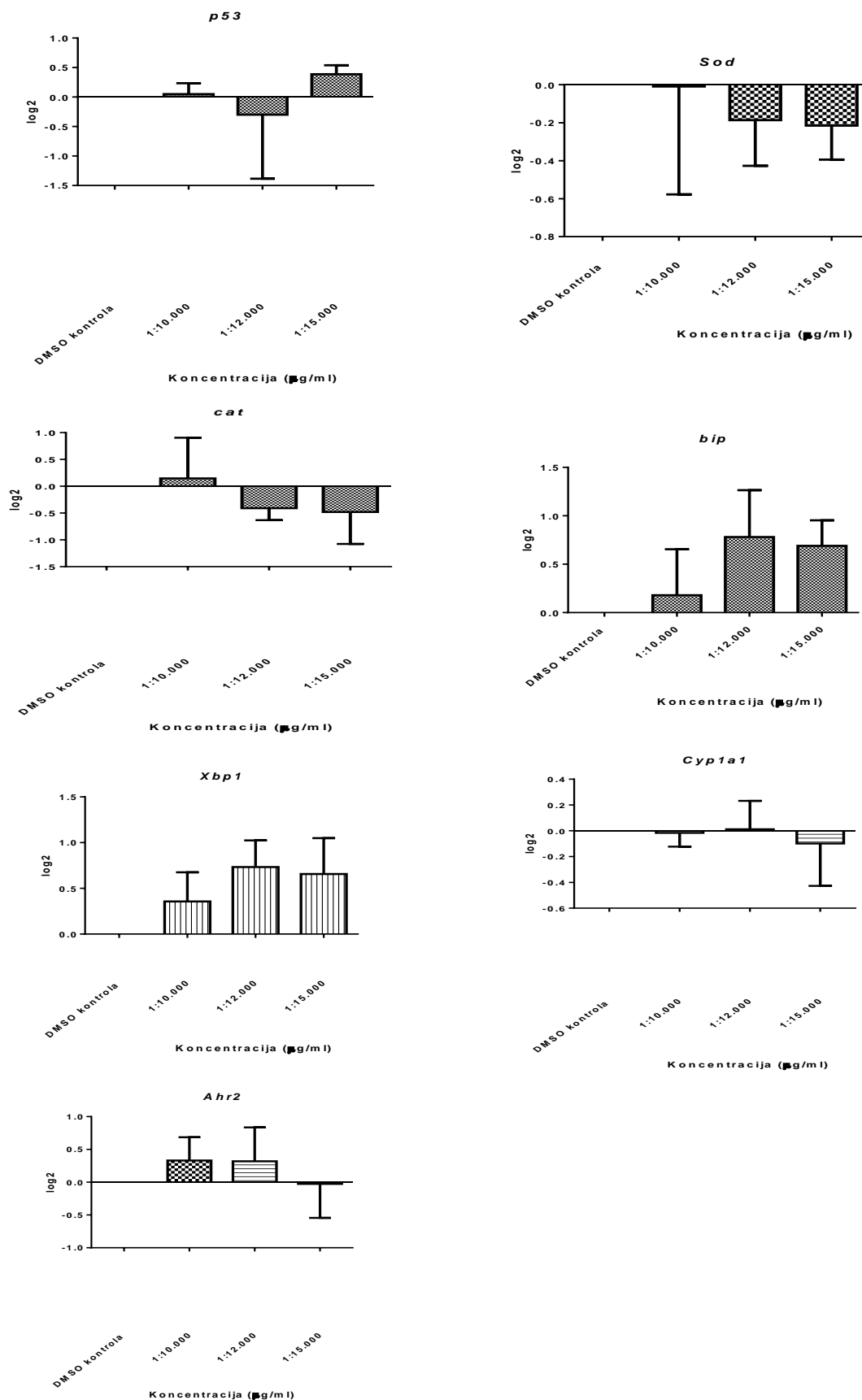


Slika 43. Efekti različitih koncentracija ekstrakta soja *Cylindrospermum* K1 na ekspresiju gena uključenih u endokrine (*vtg*) i neurofiziološke procese (*per1a*, *nr1d1*, *cry5*)

Za razliku od gena uključenih u cirkadijalni ritam i endokrine procese, ekstrakt cijanobakterijskog soja *Cylindrospermum* K1 nije doveo do statistički značajne promene u ekspresiji gena uključenih u signalne puteve metabolizma ksenobiotika (*cyp1a1*, *ahr2*) (Slika 44). Transkripcija *cyp1a* gena koji pripada citohrom P450 familiji izoenzima kontrolisana je nuklearnim aril-hidrokarbonskim receptorom (AhR) za koji se vezuju poliaromatične i druge supstance. Receptor-ligand kompleks vezuje se za specifičan region u okviru promotora, takozvani dioksin odgovorni element (DRE) i indukuje transkripciju gena. Kao i u slučaju *cyp1a* gena, ekspresija *ahr* gena takođe je regulisana sa DRE elementima (Safe, 1995; Voelker i sar., 2007). U slučaju gena *cyp1a*, nakon izlaganja embriona ligandima koji se vezuju za AhR, ključni regulator enzima uključenih u metaboličke procese (faza I i II), dolazi do povećanja ekspresije gena (Olivares i sar., 2013).

U slučaju gena uključenih u oksidativni odgovor (*cat*, *sod*) takođe nije uočena značajnija promena u ekspresiji (Slika 44) ukazujući da nije došlo do poremećaja redoks statusa kod embriona s obzirom da su promene u ekspresiji antioksidativnih gena dovoljan metod za uočavanje značajnih poremećaja redoks statusa (Timme-Laragy i sar., 2009). Takođe, u slučaju gena uključenih u ER stres (*bip*, *xbp1*) značajnija promena ekspresije gena nije detektovana. Za razliku od rezultata dobijenih za ekstrakt soja *Cylindrospermum* K1 gde nije uočen efekat na gene ER stresa, Qi i sar. (2016) su pokazali da jedan od mehanizama koji dovodi do nastanka razvojne toksičnosti cijanotoksina (poput MC-LR) je i preko aktivacije ER stresa aktiviranjem MAPK8/Bcl-2/Bax signalnog puta i kaspaza-zavisnog apoptotičkog puta kod embriona zebrića. U ovom radu, značajnija up ili down-regulacija ekspresije gena nije uočena ni u slučaju *p53* gena uključenog u apoptozu (Slika 44). P53 predstavlja multifunkcionalan nuklearni fosfoprotein koji funkcioniše kao transkripcioni transaktivator u apoptozi, DNK popravci, i putevima supresije tumora. Za razliku od rezultata dobijenih u ovom radu, Zeng i sar. (2014) su pokazali da su nivo transkripcije i ekspresija *p53* bili značajno indukovani, ukazujući da *p53* može imati ključnu ulogu u MC-LR indukovanoj apoptozi tokom ranih stupnjeva razvoja zebrića. P53 indukuje apoptozu preko up-regulacije transkripcije pro-apoptotičnih gena i down-regulacije anti-apoptotičnih gena, uključujući gene *bcl-2* familije (Perfettini i sar., 2004). Up-regulacija pro-apoptotičnih gena (*bax* i *bid*) i down-regulacija anti- apoptotičnih gena *bcl-2* familije (*bcl-2*) ukazuje da MC-LR može indukovati apoptozu preko p53-Bax-Bcl-2 puta kod embriona zebrića. Pored toga, prethodne studije pokazale su da Bid-Bax-Bcl-2 predstavlja glavni put MC-LR indukovane apoptoze (Chen i sar., 2005).





Slika 44. Efekti različitih koncentracija ekstrakta soja *Cylindrospermum* K1 na ekspresiju gena uključenih u apoptozu (*p53*), oksidativni stres (*sod*, *cat*), ER stres (*bip*, *xbp1*) i metabolizam ksenobiotika (*cyp1a1*, *ahr2*)

Još jedan bitan signalni put uključen u MC-LR indukovanu apoptozu je i kaspaza signalni put (Xiong i sar., 2009). Transkripcija i aktivnost gena kaspaza-3, kaspaza-8 i kaspaza-9 bili su značajno povećani tokom ranih faza razvoja zebrića ukazujući da p53-Bax-Bcl-2 put zajedno sa kaspaza-zavisnim apoptotskim putem imaju glavnu ulogu u MC-LR indukovanoj apoptozi kod embriona u razvoju (Zeng i sar., 2014). Kaspaze pripadaju porodici proteaza i podjeljene su u inicijatorne kaspaze (prva grupa – kaspaze 8,9 i 12) koje aktiviraju downstream egzekutivne kaspaze (druga grupa – kaspaze 3,6 i 7) koje su odgovorne za degradaciju celularnih proteina (Hotchkiss i Nicholson, 2006; Inoue i sar., 2009). Za razliku od pomenutih istraživanja, *Cylindrospermum* K1 nije delovao statistički značajno na promenu ekspresije *p53* gena uključenog u apoptozu ukazujući da bi drugi geni poput kaspaza mogli predstavljati bolji izbor u budućim istraživanjima.

Na kraju važno je napomenuti da ekstrakti cijanobakterija mogu imati daleko veći biološki efekat u odnosu na određenu koncentraciju poznatog cijanotoksina kao rezultat prisustva često neidentifikovanih supstanci i/ili interakcije među konstituentima koji se nalaze u ekstraktu (Sychrová i sar., 2012). Na primer, neki produkti cijanobakterija mogu povećati unos toksina (Oberemm i sar., 1999), inhibisati detoksifikacione enzime (Best i sar., 2002) ili mogu imati sinergističke efekte (Leao i sar., 2010). Često cijanobakterijski sirovi ekstrakti ispoljavaju daleko toksičniji efekat u poređenju sa čistim cijanotoksinima (Oberemm i sar., 1999; Palikova i sar., 2007; Sychrová i sar., 2012). Na primer, Štěpánková i sar. (2011) su istakli da pored aditivnih efekata, sinergizam između različitih jedinjenja može biti posredovan različitim mehanizmima uključujući modulaciju stope unosa ili metabolizma bioaktivnih supstanci uzrokujući veći estrogenski potencijal. Shodno tome, u slučaju kompleksnih ekstrakata sigurno postoje i druge važne supstance sa estrogenom aktivnošću koje mogu značajno da moduliraju toksičnost mikrocistina i shodno tome doprinesu totalnom toksičnom efektu (Štěpánková i sar., 2011).

Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da terestrični soj *Cylindrospermum* K1 poseduju sposobnost modulacije bioloških procesa kod zebrića poput cirkadijalnog ritma kao i sposobnost produkcije jedinjenja sa estrogenim efektom. Dobijeni rezultati od izuzetnog su značaja s obzirom da je produkcija jedinjenja sa estrogenim efektom uglavnom vezana za vodene ekosisteme i podaci vezani za zemljišne sojeve ne postoje. U cilju rasvetljavanja i identifikacije jedinjenja odgovornih za uočene promene u ekspresiji gena hemijske analitičke metode neophodne su za buduće analize u cilju kvantifikacije i identifikacije jedinjenja sa estrogenim efektom kao i jedinjenja koja intereaguju sa genima uključenim u cirkadijalni ritam. Pored toga, ispitivanje uticaja preostalih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema na ekspresiju analiziranih gena kao i na ekspresiju drugih gena (npr. *bax*, *bid*, *bcl-2* uključenih u apoptozu) svakako da će predstavljati fokus budućih istraživanja.

#### 4.13. Utvrđivanje toksigeničnosti cijanobakterija i detekcija prisutva *mcy* gena PCR metodom

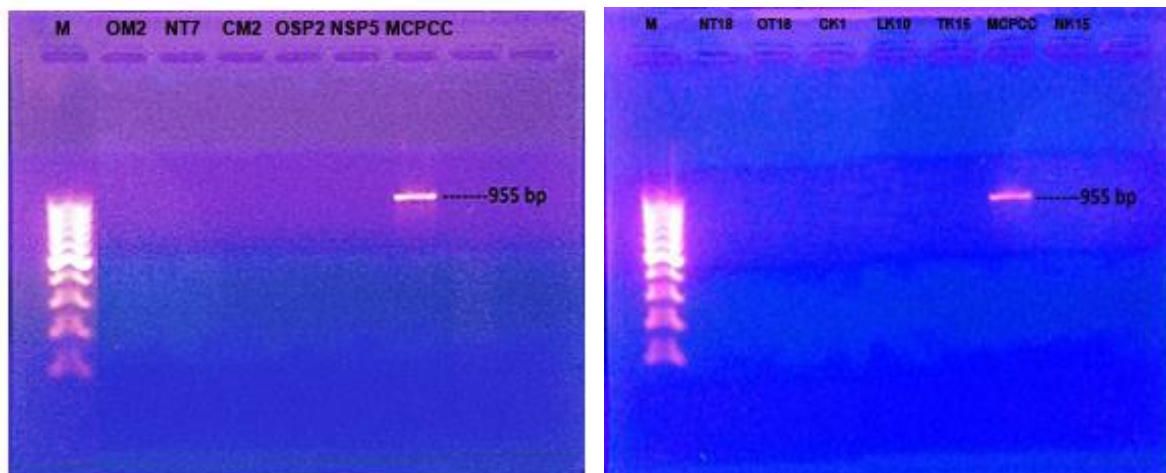
Na osnovu rezultata dobijenih primenom tri različita testa pokazano je da neki terestrični sojevi cijanobakterija izolovani iz šumskih ekosistema poseduju sposobnost produkcije jedinjenja sa toksičnim efektom na račiće *A. salina*, dafnije i zebrice. U cilju identifikacije potencijalno toksičnih jedinjenja odgovornih za uočenu toksičnost, dalja karakterizacija sojeva podrazumevala je ispitivanje toksigeničnosti sojeva primenom PCR metode. Među cijanotoksinima, mikrocistini predstavljaju jedne od najčešće proučavanih toksina. Sa tog aspekta, toksičnost terestričnih cijanobakterija veoma često je zanemarena iako i slobodno-živeće zemljišne cijanobakterije kao i cijanobakterije koji žive u simbiozi sa gljivama predstavljaju moguće producente mikrocistina (Oksanen i sar., 2004; Hrouzek i sar., 2011; Kaasalainen i sar., 2012). Upravo zbog toga, u cilju utvrđivanja sposobnosti sinteze mikrocistina kao jedne od najzastupljenijih grupa cijanotoksina, primenom PCR metode urađena je validacija prisustva 2 gena iz *mcy* genskog klastera uključenog u produkciju toksina mikrocistina kod terestričnih sojeva izolovanih iz šumskih staništa.

Imajući u vidu da se u okviru genskog klastera za sintezu mikrocistina nalazi nekoliko gena, kod odabranog broja testiranih sojeva utvrđivanje toksigeničnosti izvršeno je za dva gena (*mcyB* i *mcyE*) s obzirom da se *mcyB* i *mcyE* geni najčešće koriste kao molekularni markeri za detekciju mikrocistin produkujućih sojeva. Prema Nonneman i Paul (2002) amplifikacija *mcyB* gena smatra se brzom alatkom za identifikaciju toksičnih i netoksičnih sojeva cijanobakterija. Sa druge strane, *mcyE* gen je uključen u sintezu jedinstvene amino kiseline Adda i u formiranje veze između Adda i D-glutamata (Tillett i sar., 2000; Rouhiainen i sar., 2004). Adda i D-glutamat su esencijalni za toksičnost mikrocistina sa veoma malim strukturnim promenama između različitih varijanti mikrocistina (Sivonen i Jones, 1999). Pored toga, smatra se da horizontalni genski transfer nije imao puno uticaja na *mcyE* gen što ga čini dobrim markerom (Tillett i sar., 2000; Rantala i sar., 2004). Upravo zbog svega navedenog, za utvrđivanje toksigeničnosti terestričnih cijanobakterijskih sojeva korišćeni su *mcyB* i *mcyE* gen.

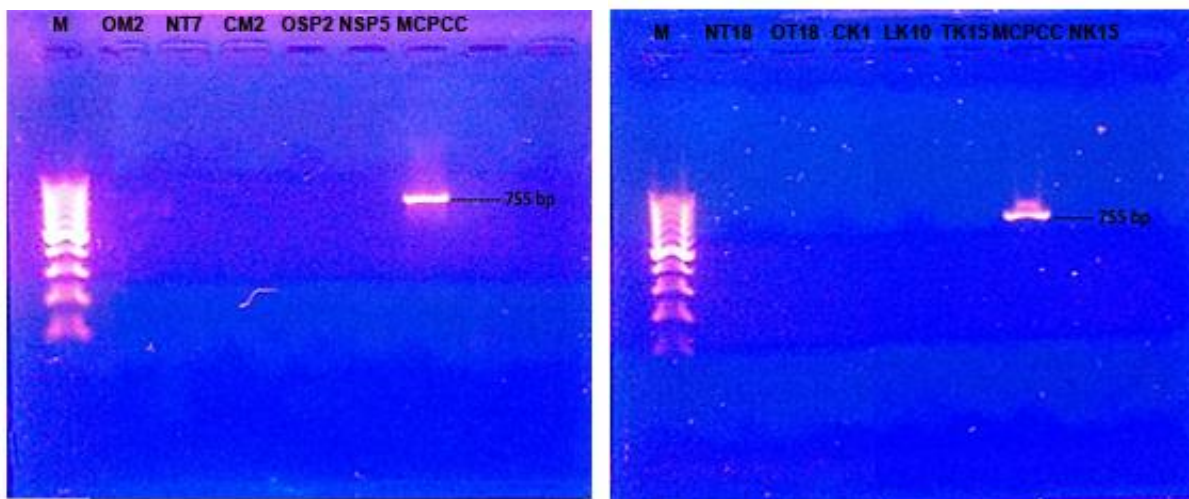
Kod filamentoznih cijanobakterija izolovanje čiste DNK može predstavljati veliki problem (Wu i sar., 2000; Kaczyńska i sar., 2013) zbog prisustva omotača koji se ponašaju kao barijera za enzimsku reakciju lizozima na ćelijski zid (Philippis i Vincenzini, 1998). Ekstrakcija genomske DNK je komplikovana s obzirom da cijanobakterije imaju višeslojni ćelijski zid i omotač sa spoljašnje strane ćelijskog zida i liziranje ćelije predstavlja odlučujući korak u efikasnosti ekstrakcije DNK (Singh i sar., 2011). Pored toga, efikasnost samog postupka izolacije i purifikacije DNK varira od jedne do druge vrste (Fiore i sar., 2000) ukazujući na neophodnost optimizacije specifičnih metoda (Morin i sar., 2010). Većina procedura koja obezbeđuje eliminaciju jedinjenja kontaminanata prisutnih u omotačima cijanobakterija dovodi do nastanka lezija DNK molekula zbog čega tako izolovan genetički materijal može biti nepodesan za dalje analize (Kaczyńska i sar., 2013). Shodno tome, u ovom radu izolacija DNK rađena je bez primene kitova, pri čemu se metoda sa fenol:hloroformom pokazala kao veoma efikasna za izolaciju genomske DNK.

Na osnovu dobijenih rezultata, proizvodi lančane reakcije polimerizacije *mcyB* i *mcyE* gena provereni pomoću agarozne gel elektroforeze, nisu bili detektovani kod testiranih cijanobakterijskih sojeva. Sa druge strane, u slučaju korišćenog referentnog soja *Microcystis*

PCC 7806 koji je producent mikrocistina veličine detektovanih produkata *mcyB* i *mcyE* gena iznosile su 955 bp i 755 bp ukazujući na njihovu uspešnu amplifikaciju. Odnosno, dobijeni rezultati ukazuju da reakcija polimerizacije *mcyB* i *mcyE* gena upotrebom odgovarajućih prajmera, razvijena od strane Ouahid i sar. (2005), nije bila pozitivna ni u jednom od testiranih sojeva, dok je referentni soj *Microcystis* PCC 7806, korišćen kao pozitivna kontrola, pokazao uspešnu amplifikaciju oba navedena gena (Slika 45 i 46 – *mcyB* gen, Slika 47 i 48 – *mcyE* gen).



Slike 45. i 46. Rezultati amplifikacije dobijeni za *mcyB* gen (OM2 – *Oscillatoria* M2, NT7 – *Nostoc* T7, CM2 – *Calothrix* M2, OSP2 – *Oscillatoria* SP2, NSP5 – *Nostoc* SP5, MCPCC – *Microcystis* PCC 7806, NT18 – *Nostoc* T18, OT18 – *Oscillatoria* T18, CK1- *Cylindrospermum* K1, LK10 – *Lyngbya* K10, TK15 – *Tolypothrix* K15, LK10 – *Lyngbya* K10, TK15 – *Tolypothrix* K15, MCPCC – *Microcystis* PCC 7806, NK15 – *Nostoc* K15)



Slika 47. i 48. Rezultati amplifikacije dobijeni za *mcyE* gen (OM2 – *Oscillatoria* M2, NT7 – *Nostoc* T7, CM2 – *Calothrix* M2, OSP2 – *Oscillatoria* SP2, NSP5 – *Nostoc* SP5, MCPCC – *Microcystis* PCC 7806, NT18 – *Nostoc* T18, OT18 – *Oscillatoria* T18, CK1- *Cylindrospermum* K1, LK10 – *Lyngbya* K10, TK15 – *Tolypothrix* K15, LK10 – *Lyngbya* K10, TK15 – *Tolypothrix* K15, MCPCC – *Microcystis* PCC 7806, NK15 – *Nostoc* K15)

Do sličnih rezultata došli su i Kumar i sar. (2011) koji su pokazali da je među testiranim cijanobakterijama poreklom iz nekoliko eutrofnih jezera sa teritorije Indije prisustvo *mcy* gena detektovano samo u slučaju roda *Microcystis*. Sa druge strane, Kaasalainen i sar. (2012) su pokazali da 12% testiranih uzoraka roda *Nostoc* izolovanih iz lišaja poseduje gene za biosintezu mikrocistina. Pored toga, kod terestričnih simbiotskih predstavnika roda *Nostoc* izolovano je preko 50 hemijskih varijanti mikrocistina, od kojih se mnoge varijante veoma retko registruju kod slobodnoživećih cijanobakterija, ukazujući na diverzitet različitih varijanti mikrocistina kod simbiotskih zemljišnih cijanobakterija roda *Nostoc*. U slučaju *mcyE* genske sekvence dobijene iz različitih vrsta simbiotskih zemljišnih cijanobakterija pokazana je velika varijabilnost, ukazujući na značajnu genetsku raznolikost (Kaasalainen i sar., 2012). Sa druge strane, u ovom radu produkti amplifikacije *mcyB* i *mcyE* gena nisu dobijeni kod svih cijanobakterijskih predstavnika ukazujući da su druga jedinjenja umesto mikrocistina najverovatnije odgovorna za uočene toksične efekte u bioesejima, što svakako zahteva dalja ispitivanja u cilju identifikacije toksina.

Pored toga, prema Rantala i sar. (2004) geni za sintezu mikrocistina bili su daleko zastupljeniji kod predačkih cijanobakterija i tokom evolucije došlo je do njihovog totalnog ili delimičnog gubitka kod nekih rodova što je uzrok trenutne sporadične distribucije ovih gena. Potencijalan gubitak gena za sintezu mikrocistina kod mnogih vrsta tokom evolucije ukazuje da je pritisak održavanja ovih gena smanjen u mnogim sredinama (Babica i sar., 2006). Rouhiainen i sar. (2004) smatraju da ovaj kontinuirani evolutivni proces predstavlja razlog nepostojanja konzistentne funkcije mikrocistina s obzirom da tačna funkcija mikrocistina još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Shodno tome, nasumična distribucija gena za sintezu cijanopeptida među filogenetskim spektrom cijanobakterija može biti posledica lateralnog genskog transfera ili drevnog porekla ne-ribozomalnih sintetičkih puteva. U prilog činjenici da putevi biosinteze mikrocistina predstavljaju drevne puteve ukazuje i podatak filogenetske podudarnost 16S rRNK gena i gena za sintezu mikrocistina, sugerišući na istovremenu evoluciju oba gena (Rantala i sar., 2004). Procenjuje se da su geni za sintezu mikrocistina stari oko 3,5 milijardi godina (Hrouzek i sar., 2011).

Takođe, u slučaju *mcy* genskog klastera, broj kopija prisutnih gena zavisi dosta i od toga u kojoj fazi rasta se nalazi soj. Kod soja *M. aeruginosa* tokom tranzicije iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta dolazi do umnožavanja gena za mikrocistine skoro 10 puta (Kurmayer i Kutzenberger, 2003). Do sličnih rezultata došli su i drugi autori u slučaju sojeva roda *Anabaena* i *Microcystis* (Vaitomaa i sar., 2003; Yoshida i sar., 2008) ukazujući da ćelije cijanobakterija poseduju multiple genome (Labarre i sar., 1989; Becker i sar., 2002). Sa druge strane, u nekoliko studija pokazano je da uprkos prisustvu *mcy* genskog klastera kod analiziranih sojeva prisustvo toksina nije potvrđeno analitičim metodama (Mankiewicz-Boczek i sar., 2006; Saker i sar., 2007; Bittencourt-oliveira i sar., 2010). Prema Bittencourt-Oliveira i Molica (2003) genotip odgovoran za produkciju toksina nije uvek ekspresovan. Ballot i sar. (2010) su takođe zabeležili da su neki sojevi bili pozitivni na prisustvo *sxtA* gena, iako varijante saksitoksina nisu detektovane primenom HPLC masene spektrometrije. Moustafa i sar. (2009) predložili su da su neki sojevi vrste *Anabaena circinalis*, poznatog producenata saksitoksina, izgubili sposobnost produkcije toksina tokom vremena, dovodeći do koegzistiranja produkujućih i neprodukujućih sojeva toksina u okruženju. Ballot i sar. (2010) su takođe ukazali da pozitivni *sxtA* sojevi mogu izgubiti deo genskog klastera uključenog u produkciju saksitoksina.



Sa fiziološke tačke gledišta, sredinske varijable kao što su temperatura i svetlost takođe utiču na količinu produkovanih mikrocistina (Sivonen, 2009; Kurmayer, 2011). U skladu sa tim, Hrouzek i sar. (2011) su ukazali na to da bi sposobnost produkcije toksina kod terestričnih sojeva roda *Nostoc* mogla da varira između različitih klimatskih režima. Kaasalainen i sar. (2012) su pokazali da je produkcija toksina najčešće utvrđena kod simbiotskih vrsta iz lišaja poreklom iz vlažnih, umerenih regiona kao što su Argentina, Norveška, Škotska i Oregon. U nekim sredinama, česta pojava toksičnih sojeva može biti povezana sa visokim „pritiskom“ predatora u staništima i odgovorom cijanobakterija na prisustvo istih (Rickards i sar., 1999; Berry i sar., 2004; Biondi i sar., 2004). Faktori spoljašnje sredine mogu dovesti do varijacije u obrazcu ekspresije *mcy* gena i produkcije toksina (Kaebernick i sar., 2000; Sevilla i sar., 2008). Takođe, rezultati Hrouzek i sar. (2011) su pokazali da između terestričnih *Nostoc* sojeva poreklom iz tropskih sredina i izolata iz umerenih i kontinentalnih klimatskih područja postoji signifikantna razlika u toksičnosti. Visoka pojava toksičnih sojeva u umerenim i kontinentalnim klimatskim zonama u skladu je sa literaturnim podacima s obzirom da su mnogi toksini poput kriptoficina, nostofungicina, aeruginoguanidina i kalotriksina izolovani iz cijanobakterija poreklom iz datih klimatskih uslova (Kajiyama i sar., 1998; Rickards i sar., 1999; Ishida i sar., 2002; Biondi i sar., 2004).

U slučaju tropskih izolata glavne grupe toksina najčešće produkovane od strane vrsta iz rodova *Tolypothrix*, *Scytonema* i *Nostoc* bile su mirabimidi, indokarbamazoli i scitoficini kao i veoma aktivan tolitoksin (Knübel i sar., 1990; Carmeli i sar., 1991a, 1991b). Pored toga, smanjen broj detektovanih toksičnih izolata poreklom iz tropskih staništa može biti rezultat smanjene produkcije sekundarnih metabolita nastale tokom izolacije i održavanja sojeva u veštačkim laboratorijskim uslovima. Produkcija toksičnih jedinjenja je sredinski zavistan karakter i sojevi sposobni da produkuju toksična jedinjenja favorizovani su u određenim uslovima. Takođe, sinteza metabolita u skladu je sa potencijalom sintetičkog aparata cijanobakterija i sa funkcijom koju produkovana toksična jedinjenja imaju (Hrouzek i sar., 2011).

U terestričnim ekosistemima, cijanotoksini produkovani od strane cijanobakterija predstavljaju potencijalni izvor toksina za životinje. Kaasalainen i sar. (2012) su ukazali da bi preko divljači cijanotoksini putem lanca ishrane mogli ispoljiti štetna dejstva i na ljude. Pored toga, sisari kao što su poljski miš, veverice, i preživari koji se hrane lišajima (Li, 2007; Asplund i Gauslaa, 2008; Gauslaa, 2008; Fischer i sar., 2010; Nybakken i sar., 2010) takođe mogu biti izloženi toksičnim i često smrtonosnim efektima cijanotoksina. Upravo zbog toga, analiza prisustva potencijalno toksičnih sojeva u terestričnim staništima je izuzetno važna. Rezultati ovog rada su pokazali da terestrične cijanobakterije izolovane iz slabo okarakterisanih šumskih ekosistema poseduju sposobnost produkcije bioaktivnih jedinjenja sa toksičnim efektima na invertebrate i vertebrate. Odsustvo dva gena iz *mcy* genskog klastera ukazuje da su najverovatnije druga jedinjenja pored mikrocistina mogla doprineti uočenim toksičnim efektima u bioesejima. Svakako da su neophodna detaljnija ispitivanja toksigeničnosti sojeva u cilju preciznijeg određivanja tipa toksičnih jedinjenja.

Dobijeni rezultati u skladu su sa nalazima Rantala i sar. (2004) koji su istakli da cijanobakterije često poseduju sposobnost produkcije i drugih različitih ne-ribozomalnih oligopeptida, koji mogu imati funkcije slične mikrocistinima i time kompenzovati njihov gubitak. S obzirom da mikrocistini očigledno nisu jedini peptidni toksini specifične građe produkovani od strane cijanobakterija, uloga drugih neribozomalno sintetisanih oligopeptida takođe bi trebala da se

uzme u obzir (Babica i sar., 2006). Shodno svemu tome, detaljnije analize prisustva drugih gena odgovornih za produkciju drugih tipova toksina (npr. neurotoksina i dr.) kao i drugih jedinjenja sa toksičnim delovanjem, pored utvrđivanja prisustva preostalih gena iz *mcy* genskog klastera, svakako da će u budućim istraživanjima doprineti identifikaciji jedinjenja odgovornih za uočene toksične efekte u bioesejima.



## 5. ZAKLJUČAK

- ❖ Rezultati dobijeni u ovom radu su ukazali na diverzitet zemljišnih cijanobakterija šumskih staništa ispitivanih planinskih područja kao i na njihov metabolički diverzitet, odnosno potencijal produkcije različitih bioaktivnih jedinjenja što je u saglasnosti sa postavljenim hipotezama i ciljevima rada.
- ❖ Tokom istraživanja na području četiri planinska sistema (Fruška gora, Stara planina, Kopaonik i Tara) ukupno je izolovano i iskultivisano **69** zemljišnih cijanobakterijskih sojeva. Na osnovu taksonomski važnih odlika identifikovano je i okarakterisano **20** cijanobakterijskih sojeva za koje je utvrđeno da pripadaju sledećim rodovima: *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* i *Phormidium*. Najveći broj izolovanih sojeva pripadao je filamentoznim rodovima *Phormidium* (23) i *Nostoc* (15).
- ❖ Identifikacija izolovanih cijanobakterija primenom molekularnog markera 16S rRNK u većini slučajeva (90%) je potvrdila preliminarnu identifikaciju rodova na osnovu morfoloških kriterijuma. U slučaju dva soja identifikovana kao pripadnici roda *Tolypothrix* na osnovu morfoloških karakteristika BLAST program nije pronašao sličnost sekvenci ni sa jednom vrstom iz datog roda.
- ❖ Produkcija biomase kod odabranih testiranih cijanobakterijskih sojeva zavisila je od primenjenih uslova kultivacije. Utvrđeno je da su azot, glukoza i saharoza delovali u pravcu stimulacije produkcije biomase kod velikog broja sojeva (90% sojeva, 45% sojeva, 75% sojeva). Najveća produkcija biomase od 2967,42 µg/mL detektovana je kod soja *Calothrix* M2 u prisustvu azota u medijumu. Kod soja *Nostoc* T18 zabeleženo je najveće povećanje produkcije biomase u prisustvu glukoze od 5,8 puta (1,5 g/L glukoze) i 8,71 puta (3 g/L glukoze), kao i u prisustvu saharoze u medijumu 2,64 puta (1,5 g/L saharoze) i 2,58 (1,5 g/L saharoze).
- ❖ Kod većine cijanobakterijskih sojeva u testiranim uslovima su prvenstveno registrovani plavi fikobilinski pigmenti - PC i APC, čiji je sadržaj varirao u zavisnosti od soja i uslova kultivacije. Konstatovano je da je u prisustvu glukoze sadržaj fikobiliproteina povećan kod 14 sojeva, a primenom saharoze kod 15 sojeva.
- ❖ Ispitivanjem sadržaja ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze i ksiloze) konstatovano je prisustvo sva tri monosaharida kod svih sojeva pri čemu je svaki soj imao specifičan ugljeno-hidratni profil. Sadržaj monosaharida kod svih testiranih sojeva opadao je u sledećem redosledu glukoza > fruktoza > ksiloza. Izuzetnu sposobnost produkcije heksoza i pentoza ispoljila su tri soja *Nostoc* M1, *Phormidium* T11 i *Calothrix* M2.
- ❖ Antibakterijska aktivnost intracelularnih ekstrakata registrovana je kod 16 testiranih cijanobakterijskih sojeva i zavisila je od kombinacije cijanobakterijski-bakterijski soj i tipa primenjenog ekstrakta. U odnosu na heksanske ekstrakte, metanolni ekstrakti su pokazali veću efikasnost, ukazujući na prirodu bioaktivnih jedinjenja sa antibakterijskim delovanjem. Veći broj testiranih sojeva ispoljio je uticaj na Gr+

bakterije. Najefikasnijim su se pokazali 75% MeOH ekstrakti cijanobakterijskih sojeva *Oscillatoria* M2, *Calothrix* M2, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1 koji su ispoljili antibakterijsku aktivnost na 4 testirane bakterije. Među testiranim bakterijskim kulturama najosjetljiviji je bio soj *E. faecalis* ATCC 19433 na koji je delovalo 13 cijanobakterijskih sojeva.

- ❖ Masno kiselinski sadržaj cijanobakterijskih sojeva varirao je u zavisnosti od soja. Najznačajniji konstituenti testiranih cijanobakterijskih sojeva bile su 18-to i 16-to ugljenične masne kiseline poput linolne kiseline i  $\alpha$ -linoleinske. Najveći sadržaj linolne kiseline detektovan je kod sojeva *Phormidium* T11 (58,94%) i *Tolypothrix* K11 (43,15%) što ukazuje na sojeve kao potencijalno značajne izvore esencijalnih masnih kiselina. U odnosu na udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, kod svih sojeva uočena je dominacija nezasićenih masnih kiselina u odnosu na zasićene masne kiseline.
- ❖ Antioksidativna aktivnost detektovana je kod svih testiranih cijanobakterijskih sojeva. U DPPH eseju, etanolni ekstrakti soja *Calothrix* M2 ispoljili su najefikasniju sposobnost „hvatanja“ DPPH radikala ( $IC_{50}=30,72\pm 3,31$   $\mu\text{g/ml}$ ). U slučaju FRAP metode, najveću redukujuću moć imao je etanolni ekstrakt soj *Cylindrospermum* K1 ( $28,58\pm 0,53$  mg AAE/g). Odsustvo korelacije između sadržaja fikocijanina i antioksidativne aktivnosti ukazuje da su druga jedinjenja prisutna u ekstraktima doprinela antiradikalskoj aktivnosti.
- ❖ Hemijskom analizom fenolnog sastava kod analiziranih cijanobakterijskih sojeva identifikovano je i kvantifikovano ukupno 21 fenolno jedinjenje. Fenolni sastav je varirao u zavisnosti od soja, a najčešće detektovana fenolna jedinjenja bila su luteolin-7-O-glukozid, bajkalin i kemferol. Soj sa najznačajnijom sposobnošću produkcije fenolnih jedinjenja bio je *Phormidium* M1 kod koga je identifikovano prisustvo 11 fenolnih jedinjenja. Najdominantnije fenolne kiseline pronađene kod soja *Phormidium* M1 bile su hinska kiselina (502  $\mu\text{g/g}$  suve materije), galna kiselina (84,9  $\mu\text{g/g}$  suve materije) i vanilinska kiselina (50  $\mu\text{g/g}$  suve materije).
- ❖ Testiranjem toksičnosti intracelularnih ekstrakata u biotestovima *A. salina*, *D. magna* i *D. rerio* ukupno 40% testiranih sojeva ispoljilo je toksičan efekat. U svim slučajevima je konstatovana dozna zavisnost, kao i vremenska zavisnost u ispoljavanju toksičnosti. Najtoksičnijim sojem se pokazao soj *Nostoc* T7 koji je ispoljio toksičnost u sva tri testa. Među tri različita testa bioesej *A. salina* i DarT test pokazali su se kao osjetljivije metode za detekciju ukupne toksičnosti cijanobakterijskih uzoraka. U odnosu na 75% MeOH ekstrakte, DMSO ekstrakti ispoljili su slabiju toksičnost ukazujući na prirodu toksičnih metabolita. U slučaju biotesta *A. salina* najtoksičnijim sojevima pokazali su se *Nostoc* T7, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18 i *Nostoc* K15. Cijanobakterijski sojevi koji su ispoljili najpotentniju aktivnost u biotestu *D. magna* bili su *Tolypothrix* K15, *Nostoc* T7 i *Calothrix* M2. U biotestu sa embrionima zebrića soj sa najznačajnijim teratogenim efektom bio je *Cylindrospermum* K1.
- ❖ U pogledu uticaja cijanobakterijskih ekstrakata na ekspresiju gena kod model organizma *D. rerio* testirani soj, *Cylindrospermum* K1, ispoljio je sposobnost modulacije bioloških procesa poput cirkadijalnog ritma kao i sposobnost produkcije

jedinjenja sa estrogenim efektom. Dobijeni rezultati od izuzetnog su značaja s obzirom da je testirani soj ispoljio efekat na ekspresiju gena koji učestvuju u važnim fiziološkim procesima kod test organizma, ispoljavajući potencijalno genotoksičan efekat. U cilju rasvetljavanja i identifikacije jedinjenja odgovornih za uočene promene u ekspresiji gena analitičke metode neophodne su za buduće analize u cilju kvantifikacije i identifikacije jedinjenja sa estrogenim efektom kao i jedinjenja koja intereaguju sa genima uključenim u cirkadijalni ritam.

- ❖ Rezultati analize toksigeničnosti testiranih cijanobakterijskih sojeva su pokazali da geni *mcyB* i *mcyE* koji su uključeni u produkciju cijanotoksina mikrocistina nisu detektovani ni u jednom od testiranih sojeva. Odsustvo dva gena iz *mcy* genskog klastera ukazuje na to da su druga jedinjenja odgovorna za uočen toksični efekat u primenjenim biotestovima.
- ❖ Dobijeni rezultati ukazuju na značaj ispitivanja zemljišnih cijanobakterija, s obzirom na to da su rezultati ovog rada ukazali na velik metabolički diverzitet ispitivanih sojeva i izražen potencijal produkcije različitih bioaktivnih jedinjenja.

## 6. LITERATURA

- 1) **Abarzua**, S., Jakubowski, S., Eckert, S., Fuchs, P. (1999): Biotechnological investigation for the prevention of marine biofouling II. Blue-green algae as potential producers of biogenic agents for the growth inhibition of microfouling organisms. *Botanica Marina* 42: 459–465.
- 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) **Abed**, R.M., Golubic, S., Garcia-Pichel, F., Camoin, G.F., Sprachta, S. (2003): Characterization of microbialite-forming cyanobacteria in a tropical lagoon: Tikehau Atoll, Tuamotu, French Polynesia. *Journal of Phycology* 39: 862–73.
- 4) **Abed**, R.M., Palinska, K.A., Camoin, G., Golubic, S. (2006): Common evolutionary origin of planktonic and benthic nitrogen-fixing oscillatoriacean cyanobacteria from tropical oceans. *FEMS Microbiology Letters* 260: 71–177.
- 5) **Abed**, R.M.M., Dobretsov, S., Sudesh, K. (2009): Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 106(1): 1-12.
- 6) **Abedin**, R.M.A., **Taha**, H.M. (2008): Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Placket-Burman design for antimicrobial activity of spirulina platensis. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3: 22-31.
- 7) **Acea**, M.J., Prieto-Fernández, A., Diz-Cid, N. (2003): Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. *Soil Biology and Biochemistry* 35(4): 513–524.
- 8) **Ackermann**, G.E., **Paw**, B.H. (2003): Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders. *Frontiers in Bioscience* 8: d1227–d1253.
- 9) **Ács**, A., Kovács, A.W., Csepregi, J.Z., Törő, N., Kiss, G., Győri, J., Vehovszky, A., Kováts, N., Farkas, A. (2013): The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 70C: 98-106.
- 10) **Adams**, D.G., **Duggan**, P.S. (1999): Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* 144: 1-33.
- 11) **Adams**, D.G., **Duggan**, P.S. (2008): Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *The Journal of Experimental Botany* 59: 1047-1058.
- 12) **Ahlgren**, G., Gustafsson, I.-B., Boberg, M. (1992): Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *Journal of Phycology* 28: 37-50.
- 13) **Ahmed**, M., Stal, L.J., Hasnain, S. (2010): Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants. *Plant and Soil* 336: 363–375.
- 14) **Aldai**, N., Murray, B.E., Najera, A.I., Troy, D.J., Osoro, K. (2005): Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1073–1083.
- 15) **Altschul**, S.F., et al. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- 16) **Alvarenga**, D.O., Rigonato, J., Zanini Braco, L.H., Fiore, M.F. (2015): Cyanobacteria in mangrove ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 24: 799–817.
- 17) **Anagnostidis**, K., Komárek, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. *Oscillatoriales*. *Archiv für Hydrobiologie* 80: 327-472.
- 18) **APHA** (1992): Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- 19) **Arima**, H., Horiguchi, N., Takaichi, S., Kofuji, R., Ishida, K.-I., Wada, K., Sakamoto, T. (2011): Molecular genetic and chemotaxonomic characterization of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* and its neighboring species. *FEMS Microbial Ecology* 79: 34-45.
- 20) **Arnalds**, O., **Kimble**, J. (2001): Andisols of deserts in Iceland. *Soil Science Society of America Journal* 65(6): 1778-1786.
- 21) **Arzate-Cardenas**, M.A., Olvera-Ramirez, R., Martinez-Jeronimo, F. (2010): *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology* 19 (6): 1157–1165.
- 22) **Asplund**, J., **Gauslaa**, Y. (2008): Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. *Oecologia* 155(1):93-99.
- 23) **Asthana**, R.K. (2006): Antibacterial potential of c-linolenic acid from *Fischerella sp.* colonizing Neem tree bark. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 443–448.
- 24) **Asthana**, R.K., Srivastava, A., Singh, A.P., Deepali, Singh, S.P., Nath, G., Srivastava, R., Srivastava, B.S. (2006): Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella sp.* isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. *Journal of Applied Phycology* 18: 33–39.
- 25) **Babaoglu Aydaş**, S., Ozturk, S., Aslm, B. (2013): Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chemistry* 136: 164–169.
- 26) **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(4): 2333-2342.
- 27) **Babica**, P., Bláha, L., Maršálek, B. (2006): Exploring the natural role of microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42: 9–20.

- 28) Babu, B., Wu, J., T. (2008): Production of natural butylated hydroxytoluene as an antioxidant by freshwater phytoplankton. *Journal of Phycology* 44: 1447–1454.
- 29) Ballot, A., Fastner, J., Wiedner, C. (2010): Paralytic shellfish poisoning toxin producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 76(4): 1173–1180.
- 30) Bandyopadhyay, A., Elvitigala, T., Welsh, E., Stockel, J., liberton, M., Min, H., Sherman, L.S., Pakrasi, H.B. (2011): Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria. *mBio* 2(5). pii: e00214-11. doi:10.1128/mBio.00214-11.
- 31) Banni, M., Chouchene, L., Said, K., Kerkeni, A., Messaoudi, I. (2011): Mechanisms underlying the protective effect of zinc and selenium against cadmium-induced oxidative stress in zebrafish. *Biomaterials* 24: 981-92
- 32) Barthès, B., Roose, E., (2002): Aggregate stability as an indicator of soil susceptibility to runoff and erosion; validation at several levels. *Catena* 47: 133–149.
- 33) Bashan, Y., Puente, M.W., Myrold, D.D., Toledo, G. (1998): *In vitro* transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* 26: 165–170.
- 34) Bay, G. (2013): Symbioses Between Cyanobacterial Communities and Feather Mosses in Boreal Forests and Consequences for Dinitrogen Fixation. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Umeå 2013, pp. 80.
- 35) Beara, I., Lesjak, M., Četojević-Simin, D., Orčić, D., Janković, T., Anačkov, G., Mimica-Dukić, N. (2012): Phenolic profile, antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic activities of endemic *Plantago reniformis* G. Beck. *Food Research International* 49: 501–507.
- 36) Beattie, K.A., Kaya, K., Sano, T., and Codd, G.A. (1998). Three dehydrobutyrine-containing microcystins from Nostoc. *Phytochemistry* 47: 1289– 1292.
- 37) Becher, P.G., Beuchat, J., Gademann, K., Jüttner, F. (2005): Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from *Nostoc* 78-12A. *Journal of Natural Products* 68: 1793–1795.
- 38) Becher, P.F., Keller, S., Jung, G., Sussmuth, R.D., Juttner, F. (2007): Insecticidal activity of 12-epi-hapalindole J isonitrile. *Phytochemistry* 68(19): 2493–2497.
- 39) Becker, S., Fahrbach, M., Boger, P., Ernst, A. (2002): Quantitative tracing by Taq nuclease assays of a *Synechococcus* ecotype in a highly diversified natural population. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4486-4494.
- 40) Beier, C., Eckerstenb, H. (1998): Modelling the effects of nitrogen addition on soil nitrogen status and nitrogen uptake in a Norway spruce stand in Denmark. *Environmental Pollution* 102: 409–414.
- 41) Belnap, J., Gardner, J.S. (1993): Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Great Basin Naturalist* 53:40–47.
- 42) Belnap, J., Gillette, D.A. (1997): Disturbance of biological soil crust: impacts on potential wind erodability of sandy desert soils in Utah, USA. *Land Degradation and Development* 8: 355-362.
- 43) Belnap, J., Lange, O.L. (Eds.) (2001): Biological soil crusts: Structure, function, and management. Ecological Studies: Vol. 150. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- 44) Belnap, J., Prasse, R., Harper, K.T. (2001): Influence of biological soil crusts on soil environments and vascular plants. In J. Belnap, & O. L. Lange (Eds.), Biological soil crusts: Structure, function, and management. Ecological Studies: Vol. 150 (pp. 281–300). Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- 45) Belnap, J. (2003): The world at your feet: Desert biological soil crusts. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:181–189.
- 46) Belnap, J., Hawkes, C.V., Firestone, M.K. (2003): Boundaries in miniature: Two examples from soil. *Bioscience* 53: 739–749.
- 47) Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F. (2004): Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences* 75: 2353–2362.
- 48) Bennett, A., Bogorad, L. (1973): Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58: 419–435.
- 49) Bentley, B.L., Carpenter, E.J. (1984): Direct transfer of newly-fixed nitrogen from free-living epiphyllous microorganisms to their host plant. *Oecologia* 63:109–113.
- 50) 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.
- 51) Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N., Stal, L.J. (1997): N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 19(3): 139-185.
- 52) Bergman, L., Ran, D.G.A. (2008): Cyanobacterial–plant symbioses: signalling and development, in: A. Herrero, E. Flores (Eds.), *The Cyanobacteria, Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 447–473.
- 53) Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P. (2003): Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* 154: 157–164.
- 54) Berry, J.P., Gantar, M., Gawley, R.E., Wang, M., Rein, K.S. (2004): Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from freshwater species of *Lyngbya* isolated from Florida Everglades. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 139:231-238.
- 55) Berry, J.P., Gibbs, P.D.L., Schmale, M.C., Saker, M.L. (2009): Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicol* 53(2): 289–299.



- 56) Best, J.H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F.B., Metcalf, J.S., Codd, G.A. (2002): Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 60: 223–231.
- 57) Bhadury, P., Wright, P.C. (2004): Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta* 219: 561–578.
- 58) Bhat, V.B., Madyastha, K.M. (2000): C-phycoerythrin: a potent peroxyl radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275: 20–25.
- 59) Bichara, D., Calcaterra, N.B., Arranz, S., Armas, P., and Simonetta, S.H. (2013): Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. *Journal of applied toxicology* 34(2): 214–9.
- 60) Billi, D., Potts, M. (2000): Life without water: responses of prokaryotes to desiccation. in: K.B. Storey, J.M. Storey (Eds.), *Environmental Stressors and Gene Responses*. Elsevier, Amsterdam, pp. 182–192.
- 61) Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith, G.D., Tredici, M.R. (2004): Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3313–3320.
- 62) Biondi, N., Tredici, M., Taton, A., Wilmotte, A., Hodgson, D., Losi, D., Marinelli, F. (2008): Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. *Journal of Applied Microbiology* 105: 105–115.
- 63) Birkemoe, T., Liengen, T. (2000): Does collembolan grazing influence nitrogen fixation by cyanobacteria in the high arctic? *Polar Biology* 23: 589–592.
- 64) Bittencourt-oliveira, M.C., Molica, R. (2003): Cianobactéria Invasora – Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. *Revista Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento* 30: 82–90.
- 65) Bittencourt-oliveira, M.C., Santos, D.M.S., Moura, A.N. (2010): Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using molecular method. *Brazilian Journal of Biology* 70(4): 1005–1010.
- 66) Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B. (2009): Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. *Interdisciplinary toxicology* 2(2): 36–41.
- 67) Bláhová, L., Oravec, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., Šimek, Z., Bláha, L. (2009): The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon* 53: 519–524.
- 68) Blaženčić, J. (2000): *Sistematika algi*, IV izdanje. NNK Internacional, Beograd, 298 str.
- 69) Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N.L., Ferruzzi, M.G., Schwartz, S.J. (2002): Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 221–226.
- 70) Borges, H.L.F., Branco, L.H.Z., Martins, M.D., Lima, C.S., Barbosa, P.T., Lira, G.A.S.T., Bittencourt-Oliveira, M.C., Molica, R.J.R. (2015): Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil. *Harmful Algae* 43: 46–57.
- 71) Börner, T., Dittmann, E. (2005). Molecular biology of cyanobacterial toxins. Genetic basis of microcystin production. In *Harmful Cyanobacteria*, Chapter 2.. Edited by Jef Huisman, Hans C.P. Matthijs and Petra M. Visser. Published by Springer, The Netherlands. ISBN 1-4020-3009-6.
- 72) Bornet, E., Flahaut, C. (1887): Révision des Nostocacées hétérocystées. *Annales des Sciences Naturelles (Botanique)* 5: 51–129.
- 73) Bornet, E., Flahaut, C. (1888a): Note sur deux nouveaux genres d'algues perforantes. *Journal de Botanique* 2: 161–165.
- 74) Bornet, E., Flahaut, C. (1888b): Revision des Nostocacées hétérocystées. *Annales des Sciences Naturelles (Botanique)* 7: 177–262.
- 75) Borowitzka, M.A. (1995): Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7: 3–15.
- 76) Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., van der Venter, M., Shephard, E.G. (2004): The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43:85–92.
- 77) Bottomley, P. J., Van Baalen, C. (1978): Characteristics of heterotrophic growth in the blue-green alga *Nostoc* sp. strain Mac. *Journal of general microbiology* 107: 309–318.
- 78) Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J., Smith, W., Blakeley, R.L. (2001): Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology* 16: 523–534.
- 79) Bourrelly, P. (1970): Les algues d'eau douce III. Boubée & Cie, Paris.
- 80) Bowker, M.A., Reed, S.C., Belnap, J., Phillips, S.L. (2002): Temporal variation in community composition, pigmentation, and Fv/Fm of desert cyanobacterial soil crusts. *Microbial Ecology* 43: 13–25.
- 81) Bowker, M.A., Belnap, J., Chaudhary, V.B., Johnson, N.C. (2008): Revisiting classic water erosion models in drylands: The strong impact of biological soil crusts. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2309–2316.
- 82) Bowker, M.A., Maestre, F.T., Escolar, C. (2010): Biological crusts as a model system for examining the biodiversity-ecosystem function relationship in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 42:405–417.
- 83) Boyer, S.L., Johansen, J.R., Flechtner, V.R. (2002): Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (*Cyanophyceae*) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S–23S ITS region. *Journal of Phycology* 38: 1222–1235.
- 84) Bradley, E., Gillesby, Zacharewski, T.R. (1998): Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(1): 3–14.

- 85) Braunbeck, T., Lammer, E. (2005): Draft Detailed Review Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. German Federal Environment Agency (UBA Contract Number 203 85 422) Press Office: Dessau, Germany.
- 86) Braunbeck, T., Lammer, E. (2006): Background Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. German Federal Environment Agency (UBA Contract Number 203 85 422) Press Office: Dessau, Germany.
- 87) Briggs, J.P. (2002): The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282: R3–R9.
- 88) Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J., Miller, K.A. (1996): Effects of harvest stage on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 32:64–73.
- 89) Brull, L. P., Huang, Z. B., Thomas-Oates, J. E., Paulsen, B. S., Cohen, E. H., Michaelsen, T. E. (2000): Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: Structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *Journal of Phycology* 36(5): 871–881.
- 90) Büdel, B., Weber, H.M., Porembski, S., Barthlott, W. (2002): Cyanobacteria of inselbergs in the Atlantic rainforest zone of eastern Brazil. *Phycologia* 41: 498-506.
- 91) Bui, H.T.N., Jansen, R., Pham, H.T.L., Mundt, S. (2007): Carbamidocyclophanes A-E, chlorinated paracyclophanes with cytotoxic and antibiotic activity from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp.. *J. Nat. Prod.* 70: 499-503.
- 92) Burgess, G., Jordan, E.M., Bregu, M., i sar. (1999): Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology* 70: 27-32.
- 93) Burgheimer, J., Wilske, B., Maseyk, K., Karnieli, A., Zaady, E., Yakir, D., Kesselmeir, J. (2006): Relationships between Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) and carbon fluxes of biological soil crusts assessed by ground measurements. *Journal of Arid Environments* 64: 651-669.
- 94) Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G. and Wright, P.C. (2001): Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57: 9347–9377.
- 95) Buryskova, B., Hilscherová, K., Babica, P., Vrskova, D., Marsalek, B., Bláha, L. (2006): Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in *Xenopus laevis* embryos and the role of microcystins. *Aquat Toxicol.* 80(4): 346-354.
- 96) Busquet, F., Nagel, R., von Landenberg, F., Mueller, S.O., Huebler, N., Broschard, T.H. (2008): Development of a New Screening Assay to Identify Proteratogenic Substances using Zebrafish *Danio rerio* Embryo Combined with an Exogenous Mammalian Metabolic Activation System (mDarT). *Toxicological Sciences* 104(1): 177-188.
- 97) Busquet, F., Streckler, R., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Carr, G.J., Cenijn, P., Fochtman, P., Gourmelon, A., Hubler, N., Kleinsang, A., Knobel, M., Kussatz, C., Legler, J., Lillicrap, A., Martinez-Jeronimo, F., Polleichtner, C., Rzodeczko, H., Salinas, E., Schneider, K.E., Scholz, S., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L.T.M., Walter-Rohde, S., Weigt, S., Witters, H., Halder, M. (2014): OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69: 496-511.
- 98) Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 58: 79-110.
- 99) Cadoret, J.C., Rousseau, B., Perewoska, I., Sicora, C., Cheregi, O., Vass, I., Houmar, J. (2005): Cyclic nucleotides, the photosynthetic apparatus and response to a UV-B stress in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* 280: 33935-33944.
- 100) Caicedo, N.H., Heyduck-Söllner, B., Fischer, U., Thöming, J. (2011): Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. *Journal of Applied Phycology* 23: 811–818.
- 101) Caiola, M.G., Billi, D., Friedmann, E.I. (1996): Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (*Chroococcales*). *Europe Journal of Phycology* 31:97-105.
- 102) Campbell, D.L., Lawton, J.A., Beattie, K.A., Codd, G.A. (1994): Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9: 71–77.
- 103) Capone, D.G., Burns, J.A., Montoya, J.P., Subramaniam, A., Mahaffey, A.C., Gunderson, T., Michaels, A.F., Carpenter, E.J. (2005): Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: an important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 19: GB2024, doi:DOI: 10.1029/2004GB002331.
- 104) Carmeli, S., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1991a): Tolytoxin and new scytonophycins from three species of *Scytonema*. *Journal of Natural Products* 53:1533-1542.
- 105) Carmeli, S., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1991b): Mirabimides A-D, new *N*-acylpyrroines from the blue-green algae *Scytonema mirabile*. *Tetrahedron* 47:2087-2096.
- 106) Carmichael, W.W. (1992): Cyanobacterial secondary metabolites – The cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 72: 445-459.
- 107) Carmichael, W.W. (1992): A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins, EPA/600/R-92/079, Environmental Systems Laboratory, ORD, USEPA, Cincinnati, OH 45268, 141 pp.
- 108) Carmichael, W.W. (1994): The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 64-72.
- 109) Castenholz, R.W., Waterbury, J.B. (1989): Group I. Cyanobacteria. Preface. In Holt, J. G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore: 1710–1727.
- 110) Castenholz, R.W., Garcia-Pichel, F. (2000): Cyanobacterial responses to UV-radiation, In: B.A. Whitton and M. Potts (eds) *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 591-611.



- 111) Castenholz, R.W. (2001): Phylum BX. Cyanobacteria oxygenic photosynthetic bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1: 473–553.
- 112) Castenholz, R. W. (2001): General characteristics of cyanobacteria. In Garrity, G. M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York: 474–478.
- 113) Caudales, R., Wells, J.M. (1992): Differentiation of free-living *Anabaena* and *Nostoc* cyanobacteria on the basis of fatty-acid composition. *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42: 246-251.
- 114) Cestèle, S., Catterall, W.A. (2000): Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883–892.
- 115) Chandrasekar, D., Madhusudhana, K., Ramakrishna, S., Diwan, P.V. (2006): Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40: 460–464.
- 116) 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.
- 117) Chen, J.L., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1991): Structures of nostocyclophanes A-D. *Journal of Organic Chemistry* 56: 4360-4364.
- 118) Chen, F., Johns, M.R. (1994): Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. *Process Biochemistry* 29: 245–252.
- 119) Chen, F. (1996): High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology* 14: 421–426.
- 120) Chen, F., Zhang, Y., Guo, S. (1996): Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters* 18: 603-608.
- 121) Chen, L., Li, D., Liu, Y. (2003): Salt tolerance of *Microcoleus vaginatus* Gom., a cyanobacterium isolated from desert algal crust, was enhanced by exogenous carbohydrates. *Journal of Arid Environments* 55: 645-656.
- 122) Chen, F., Li, H.B., Wong, R.N.S., Ji, B., Jiang, Y. (2005): Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1064: 183–186.
- 123) Chen, W., Song, L., Ou, D., Gan, N. (2005): Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. *Environmental Toxicology* 20 (3): 323–330.
- 124) Chen, T., Wang, Q.S., Cui, J., Yang, W., Shi, Q., Hua, Z.C., Ji, J.G., Shen, P.P. (2005): Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR- a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Molecular & Cellular Proteomics* 4: 958-974.
- 125) Chen, G.-Q., Chen, F. (2006): Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters* 28: 607–616.
- 126) Chen, L., Li, D., Song, L., Hu, C., Wang, G., Hong, S., Liu, A., Li, C., Liu, Y. (2006): Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus* Gom. *Journal of Integrative Plant Biology* 48 (8): 914-919.
- 127) Chen, T., Cui, J., Liang, Y., Xin, X.B., Young, D.O., Chen, C., Shen, P.P. (2006): Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology* 220: 71-80.
- 128) 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.
- 129) Chen, L., Xie, Z., Hu, C.X., Wang, G., Li, D., Liu, Y.D. (2006): Man-made desert algal crust as affected by environmental factors in Inner Mongolia, China. *Journal of Arid Environments* 67: 521-527.
- 130) Chen, L., Yang, Y., Deng, S., Xu, Y., Wang, G., Liu, Y. (2012): The response of carbohydrate metabolism to the fluctuation of relative humidity (RH) in the desert soil cyanobacterium *Phormidium tenue*. *European Journal of Soil Biology* 48: 11-16.
- 131) Cheng, Z., Hong, S., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G. (2014): The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 149: 25–32.
- 132) Cheon, J.-Y., Lee, M.-A., Ki, J.-S. (2012): Molecular divergences of 16S rRNA and *rpoB* gene in marine isolates of the order *Oscillatoriales* (Cyanobacteria). *Korean Journal of Microbiology* 48(4): 319–325.
- 133) Chlipala, G., Sturdy, M., Kronic, A., Lantvit, D.D., Shen, Q., Porter, K., Swanson, S.M., Orjala, J. (2010): Cyclindrocyclophanes with proteasome inhibitory activity from the cyanobacterium *Nostoc* sp.. *The Journal of Natural Products* 73: 1529-1537.
- 134) Chlipala, G.E., Mo, S., Orjala, J. (2011): Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – a Source for Drug Discovery. *Current Drug Targets* 12(11): 1654-1673.
- 135) Chojnacka, K., Noworyta, A. (2004): Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 461–465.
- 136) Chorus, I., Bartrum, J. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E and FN Spon, London/ New York.
- 137) Christen, V., Capelle, M., Fent, K. (2013): Silver nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272(2): 519-28.
- 138) Christiansen, G., Fastner, J., Erhand, M., Borner, T. (2003): Microcystin biosynthesis in *Planktothrix* genes, evolution and manipulation. *Journal of Bacteriology* 185: 564–572.

- 139) **Clarridge, J E., III.** (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 840–62.
- 140) **Clegg, J.S.** (2001): Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 128: 613–624.
- 141) **Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S.** (2005): Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In: Huisman, J., et al. (Eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer, pp. 1–24.
- 142) **Cohen, Y., Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P., Poplawski, R.** (1986): Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 51: 398–407.
- 143) **Cohen, Z., Margeri, M.C., Tomaselli, L.** (1995): Chemotaxonomy of cyanobacteria. *Phytochemistry* 40: 1155–1158.
- 144) **Colla, L., Eliana Badiale Furlong, M., Vieira Costa, J.A.,** (2007): Antioxidant properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian archives of biology and technology* 50(1): pp.161–167.
- 145) **Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N.** (2014): Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96:1–15.
- 146) **Corvi, R.** (2002): Genomics: an *in vitro* toxicology point of view. *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals* 30: 129–131.
- 147) **Coveney, M.F., Stites, D.L., Lowe, E.F., Battoe, L.E., Conrow, R.** (2002): Nutrient removal from eutrophic lake water by wetland filtration. *Ecological engineering* 19: 141–159.
- 148) **Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M.** (1998): The role of vitrification in anhydrobiosis. *The Annual Review of Physiology* 60: 73–103.
- 149) **Crowe, L.M.** (2002): Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 131: 505–513.
- 150) **Četojević-Simin, D.** (2005): Antiproliferativni efekat biološki aktivnih materija cijanobakterija *in vitro*. Magistarska teza, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- 151) **D’ors, A., Bartolome, M.C., Sanchez-Fortun, S.** (2013): Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on *Artemia franciscana* nauplii populations. *Chemosphere* 90: 2187–2192.
- 152) **Dagan, T., Roettger, M., Stucken, K., Landan, G., Koch, R., Major, P., Gould, S.B., Goremykin, V.V., Rippka, R., de Marsac, N.T., Gugger, M., Lockhart, P.J., Allen, J.F., Brune, I., Maus, I., Pühler, A., Martin, W.F.** (2012): Genomes of Stigonematalean Cyanobacteria (Subsection V) and the Evolution of Oxygenic Photosynthesis from Prokaryotes to Plastids. *Genome Biology and Evolution* 5(1): 31–44.
- 153) **Dahm, R., Geisler, R.** (2006): Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology* 8: 329–345.
- 154) **Dahms, H.-U., Xu, Y., Pfeiffer, C.** (2006): Antifouling potential of cyanobacteria: a mini-review. *Biofouling* 22: 317–327.
- 155) **Dao, T.S., Do-Hong, L.-C., Wiegand, C.** (2010): Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicol* 55(7): 1244–1254.
- 156) **Darby, B.J., Neher, D.A., Belnap, J.** (2007): Soil nematode communities are ecologically more mature beneath late- than early-successional stage biological crusts. *Applied Soil Ecology* 35: 203–212.
- 157) **Davison, I.R.** (1991): Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of Phycology* 27: 2–8.
- 158) **De Caire, G.Z., De Cano, M.S., Palma, R.M., De Mule, C.Z.** (2000): Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1985–1987.
- 159) **De Cano, M.M.S., De Mule, M.C.Z., De Caire, C.Z., De Halperin, D.R.** (1990): Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology* 2: 79–82.
- 160) **De Mott, W.R., Zhang, Q.X., Carmichael, W.W.** (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 36: 1346–1357.
- 161) **De Mott, W.R.** (1999): Foraging strategies and growth inhibition in five daphnids feeding on mixtures of a toxic cyanobacterium and a green alga. *Freshwater Biology* 42: 263–274.
- 162) **de Pascale, D., De Santi, C., Fu, J., Landfald, B.** (2012): The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Marine Genomics* 8: 15–22.
- 163) **De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R., Vincenzini, M.** (1998): Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1130–1132.
- 164) **De Philippis, R., Vincenzini, M.** (1998): Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 151–175.
- 165) **De Philippis, R., Ena, A., Paperi, R., Sili, C., Vincenzini, M.** (2000): Assessment of the potential of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Phycology* 12(3–5): 401–407.
- 166) **De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M.** (2001): Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *Journal of Applied Phycology* 13: 293–299.
- 167) **De Philippis, R., Vincenzini, M.** (2003): Outermost polysaccharidic investments of cyanobacteria: nature, significance and possible applications. *Recent Research Developments in Microbiology* 7: 13–22.

- 168) DeCaire, G.Z., De Cano, M.S., De Mule, M.C.Z., De Halperin, D.R. (1990): Antimycotic products from the cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani*. *Phyton* 51: 1-4.
- 169) Decho, A.W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 28: 73-153.
- 170) Decho, A.W. (2000): Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20: 1257-1273.
- 171) Decho, A.W., Visscher, P.T., Reid, R.P. (2005): Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219: 71-86.
- 172) Delaney, J.M., Wilkins, R.M. (1995): Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicol* 33: 771-778.
- 173) DeLuca, T.H., Zackrisson, O., Nilsson, M.-C., Sellstedt, A. (2002): Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature* 419: 917-920.
- 174) DeLuca, T.H., Boisvenue, C. (2012): Boreal forest soil carbon: distribution, function and modeling. *Forestry* 85: 161-184.
- 175) Dembitsky, V.M., Srebnik, M. (2002): Variability of hydrocarbon and fatty acid components in cultures of the filamentous cyanobacterium *Scytonema* sp. isolated from microbial community 'Black Cover' of limestone walls in Jerusalem. *Biochemistry (Moscow)* 67: 1545-1552.
- 176) Dembitsky, V.M., Rezanka, T. (2005): Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. *Folia Microbiologica* 50: 3663-3691.
- 177) DeMott, W.R., Moxter, F. (1991): Foraging on cyanobacteria by copepods: responses to chemical defenses and resource abundance. *Ecology* 72: 1820-1834.
- 178) DeMott, W.R., Zhang, Q.X., Carmichael, W.W. (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 36: 1346-1357.
- 179) Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J. (2009): A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology* 11: 45-52.
- 180) Desbois, A.P., Smith, V.J. (2010): Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1629-1642.
- 181) Desikachary, T.V. (1959): Cyanophyta. Indian Council Agricultural Research. Academic Press, New York.
- 182) Dey, B., Lerner, D.L., Lusso, P., Boyd, M.R., Elder, J.H., Berger, E.A. (2000): Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *Journal of Virology* 74(10): 4562-9.
- 183) Dietrich, D., Hoeger, S. (2005): Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 273-289.
- 184) Dijkman, N.A., Boschker, H.T.S., Stal, L.J., Kromkamp, J.C. (2010): Composition and heterogeneity of the microbial community in a coastal microbial mat as revealed by the analysis of pigments and phospholipid-derived fatty acids. *Journal of Sea Research* 63: 62-70.
- 185) DIN (2001) German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Subanimal testing (group T) – Part 6: Toxicity to fish. Determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T 6). DIN 38415-6; German Standardization Organization.
- 186) Ding, W.X., Ong, Ch.N. (2003): Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters* 220: 1-7.
- 187) Ding, Z., Jia, S.R., Han, P., Yuan, N., Tan, N. (2013): Effects of carbon sources on growth and extracellular polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* under heterotrophic high-cell-density fed-batch cultures. *Journal of Applied Phycology* 25: 1017-1021.
- 188) Dittmann, E., Neilan, B. A., Borner T. (2001): Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 467-473.
- 189) Dixon, R.A., Al-Nazawi, M., Alderson, G. (2004): Permeabilising effects of sub-inhibitory concentrations of microcystins on the growth of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 230: 167-170.
- 190) Doan, N.T., Stewart, P.R., Smith, G.D. (2001): Inhibition of bacterial RNA polymerase by the cyanobacterial metabolites 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A. *FEMS Microbiology Letters* 196:135-9.
- 191) Dobretsov, S., Abed, R.M.M., Al Maskari, S.M.S., Al Sabahi, J.N., Victor, R. (2011): Cyanobacterial mats from hot springs produce antimicrobial compounds and quorum-sensing inhibitors under natural conditions. *Journal of Applied Phycology* 23: 983-993.
- 192) Dodds, W.K., Gudder, D.A., Möllenhauer, D. (1995): The ecology of *Nostoc*. *Journal of Phycology* 31: 2-18.
- 193) Doebbe, A., Rupprecht, J., Beckmann, J., Mussnug, J. H., Hallmann, A., Hankamer, B., et al. (2007): Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: impacts on biological H<sub>2</sub> production. *Journal of Biotechnology* 131: 27-33.
- 194) Dominguez, A. R., Hernandez-Arana, A., Mendoza- Hernandez, G., Rendon, J. L. (1997): Thermal denaturation of glutathione reductase from cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Biochemistry and Molecular Biology* 42: 631-639.
- 195) Donia, M., Hamann, M.T., (2003): Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 338-348.

- 196) Dörr, F.A., Pinto, E., Soares, R.M., Feliciano de Oliveira, S.M., Azevedo, E. (2010): Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* 56 (7): 1247-1256.
- 197) Dos Santos, M.D., Guaratini, T., Lopes, J.L.C., Colepicolo, P., Lopes, N.P. (2005): Plant cell and microalgae culture. In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Research Singpost, Kerala, India.
- 198) Drenovsky, R.E., Elliott, G.N., Graham, K.J., Scow, K.M. (2004): Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acidmethyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1793-1800.
- 199) Drobac, D. (2016): Putevi izloženosti čoveka cijanotoksinima i njihov uticaj na zdravlje. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-Matematički Fakultet, str. 256.
- 200) Drobac-Čik, A.V., Dulić, T.I., Stojanović, D.B., Svirčev, Z.B. (2007): The importance of extremophile cyanobacteria in the production of biologically active compounds. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad*, No 112: 57-66.
- 201) Drobniewska, A., Tarczynska, M., Mankiewicz, J., Jurczak, T., Zalewski, M. (2004): Increase of crustacean sensitivity to purified hepatotoxic cyanobacterial extracts by manipulation of experimental conditions. *Environmental Toxicology* 19: 416-420.
- 202) Dulić, T., Meriluoto, J., Palanački Malešević, T., Gajić, V., Važić, T., Tokodi, N., Obreht, I., Kostić, B., Kosijer, P., Khormali, F., Svirčev, Z. (2017): Cyanobacterial diversity and toxicity of biocrusts from the Caspian Lowland loess deposits, North Iran. *Quaternary International* 425 (part B): 74-85.
- 203) Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S., Bhattacharya, S. (2005): Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Cell Factories* 4(1): 36.
- 204) Duval, B., Shetty, K., Thomas, W.H. (1999): Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology* 11: 559-566.
- 205) Dvořák, P. (2013): Morphological and genetical variability of cyanobacteria. Ph.D. thesis, Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Botany, Olomouc.
- 206) Eaton, R., Farley, R.D. (1974): Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia* 1:195-204.
- 207) Edward, C., Lawton, L.A., Coyle, S.M., Ross, P. (1996): Laboratory-scale purification of microcystins using flash chromatography and reversed high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 734: 163-173.
- 208) EFSA (European Food Safety Administration) (2005): Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes. *EFSA Journal* 292: 1-46.
- 209) Egorov, N.S. (1985): Antibiotics a Scientific Approach. *Mir Publishers*, Moscow 151.
- 210) Ehling-Schulz, M., Bilger, W., Scherer, S. (1997): UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology* 179: 1940-1945.
- 211) Ehling-Schulz, M., Scherer, S. (1999): UV protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 329-338.
- 212) Eiler, A. (2006): Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7431-7437.
- 213) Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F.O., Amann, R. (2000): Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3044-3051.
- 214) Elenkin, A.A. (1938 & 1949): Sinezelenye vodorosli SSSR Monographia algarum cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum. Pars spec 1, 2, Akademia Nauk SSSR, Moscow-Leningrad.
- 215) El-Sheekh, M., Osman, M., Dyab, M., Amer, M. (2006): Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21: 42-50.
- 216) El-Sheekh, M.M., Dawah, A.M., ABD El-Rahman, A.M., ABD El-Hay, R.A. (2008): Antimicrobial activity of the cyanobacteria *Anabaena wisconsinense* and *Oscillatoria curviceps* against pathogens of fish in aquaculture. *Annals of Microbiology* 58(3): 527-534.
- 217) Engene, N., Coates, R.C., Gerwick, W.H. (2010): 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. *Journal of Phycology* 46: 591-601.
- 218) Engene, N., Choi, H., Esquenazi, E., Rottacker, E.C., Ellisman, M.H., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H. (2011): Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived rich secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus *Lyngbya*. *Environmental Microbiology* 13: 1601-1610.
- 219) Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000): Characterisation 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.
- 220) Ettl, H., Gärtner, G. (1995): Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 221) Ettoumi, A. F., El Khalloufi, I., El Ghazali, B., Oudra, A., Amrani, H., Nasri, N., Bouaïcha (2011): Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology (ed. G. Kattel), pp. 1-34. Nova Science Publishers Inc., New York
- 222) Evans, R.D., Johansen, J.R. (1999): Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Critical Reviews and Plants Sciences* 18: 183-225.
- 223) Falch, B.S., König, G.M., Wright, A.D., Sticher, O., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., Bachmann, H. (1995): Biological activities of cyanobacteria: Evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica* 61: 321-328.
- 224) Falchini, L., Sparvoli, E., Tomaselli, L. (1996): Effect of *Nostoc* (cyanobacteria) inoculation on the structure and stability of clay soils. *Biology and Fertility of Soils* 23: 246-252.



- 225) **Falconer, I.R.** (1991): Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 6: 177–184.
- 226) **Falconer, I.R.** (2005): Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply?. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 33: 64–71.
- 227) **Falconer, I.R., Humpage, A.R.** (2006): Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology* 21: 299–304.
- 228) **Falconer, I.R.** (2007): Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts – more than microcystins! *Toxicon* 50: 585–588.
- 229) **Faltermann, S., Zucchi, S., Kohler, E., Blom, J.F., Perntaler, J., Fent, K.** (2014): Molecular effects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms: Global transcriptome analysis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 149: 33–39.
- 230) **Fastner, J., Erhard, M., van Døhren, H.** (2001): Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5069–5076.
- 231) **Feng, X., Bandyopadhyay, A., Berla, B., Page, L., Wu, B., Pakrasi, H. B., Tang, Y. J.** (2010): Mixotrophic and photoheterotrophic metabolism in *Cyanothece* sp. ATCC 51142 under continuous light. *Microbiology* 156(8): 2566–2574.
- 232) **Fernández-Sevilla, J.M., Ación-Fernández, F.G., Molina-Grima, E.** (2014): Photobioreactors design for hydrogen production. In: Zannoni D, De Philippis R, editors. Microbial bioenergy: hydrogen production, Vol. 38. Advances in Photosynthesis and Respiration.
- 233) **Ferrão-Filho, A.S., Azevedo, S.M.F.O., DeMott, W.R.** (2000): Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology* 45 (1): 1–19.
- 234) **Ferrão-Filho, A.S., Da Costa, S.M., Ribeiro, M.G.L., Azevedo, S.M.F.O.** (2008): Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology* 23(2): 161–168.
- 235) **Ferrão-Filho, A.D.S., Soares, M.C.S., De Freitas Magalhães, V., Azevedo, S.M.F.O.** (2009): Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2): 479–489.
- 236) **Ferrão-Filho, A.D.S. et al.** (2010): A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environmental Pollution* 158: 2084–2093.
- 237) **Ferrão-Filho, A.D.S., Kozłowski-Suzuki, B.** (2011): Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs* 9(12): 2729–2772.
- 238) **Fewer, D.P., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Laakso, K., Wang, H., Sivonen, K.** (2007): Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evolutionary Biology* 7: 183.
- 239) **Fewer, D.P., Tooming-Klunderud, A., Jokela, J., Wahlsten, M., Rouhiainen, L., Kristensen, T., Rohrlack, T., Jakobsen, K.S., Sivonen, K.** (2008): Natural occurrence of microcystin synthetase deletion mutants capable of producing microcystins in strains of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria). *Microbiology* 154: 1007–1014.
- 240) **Fewer, D.P., Halinen, K., Sipari, H., Bernardová, K., Mänttari, M., Eronen, E., Sivonen, K.** (2011a): Non-autonomous transposable elements associated with inactivation of microcystin gene clusters in strains of the genus *Anabaena* isolated from the Baltic Sea. *Environmental Microbiology Reports* 3: 189–194.
- 241) **Fewer, D.P., Österholm, J., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Sivonen, K.** (2011b): Nostophycin biosynthesis is directed by a hybrid polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase in the toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 8034–8040.
- 242) **Fewer, D.P., Jokela, J., Pauku, E., Österholm, J., Wahlsten, M., Permi, P., Aitio, O., Rouhiainen, L., Gomez-Saez, G.V., Sivonen, K.** (2013): New structural variants of aeruginosins produced by the toxic bloom forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *PLoS ONE* 8: e73618.
- 243) **Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M., Pereira, M.J.** (2004): Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 151–163.
- 244) **Fiore, M.F., Moon, D.H., Tsai, S.M., Lee, H., Trevors, J.T.** (2000): Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *The Journal of Microbiological Methods* 39: 159–169.
- 245) **Fiore, M.F., Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Komárek, J., Kaštovský, J., Sulek, J., Lorenzi, A.S.** (2007): The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotype evaluation. *Journal of Phycology* 43: 789–798.
- 246) **Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B.** (2005): Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 257–263.
- 247) **Fischer, A., Hoeger, S.J., Stemmer, K., Feurstein, D.J., Knobeloch, D., Nussler, A., Dietrich, D.R.** (2010): The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245: 9–20.
- 248) **Fischer, B.M., Schatz, H., Maraun, M.** (2010): Community structure, trophic position and reproductive mode of soil and bark-living oribatid mites in an alpine grassland ecosystem. *Experimental and Applied Acarology* 52: 221–237.
- 249) **Fitter, A.H., Gilligan, C.A., Hollingworth, K., Kleczkowski, A., Twyman, R.M., Pitchford, J.W.** (2005): Biodiversity and ecosystem function in soil. *Functional Ecology* 19: 369–377.

- 250) Flechtner, V.R., Johansen, J.R., Clark, W.H. (1998): Algal composition of microbiotic crusts from the Central Desert of Baja California, Mexico. *Great Basin Naturalist* 58(4): 295-311.
- 251) Flores, E., Herrero, A. (2010): Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8: 39-50.
- 252) Foster, R.A., Zehr, J.P. (2006): Characterization of diatom–cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. *Environmental Microbiology* 8(11): 1913–1925.
- 253) Francisco, E., Jacob-Lopes, E., Franco, T (2012): Assessing the potential of disaccharides as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *New Biotechnology*. 29. S66. 10.1016/j.nbt.2012.08.185.
- 254) Frémy, P. (1929): Les Myxophycées de l'Afrique équatoriale française. – Arch. Bot., Caen, Tome III, Mém. 2: 1–508.
- 255) Fritsch, F. E. (1959): The Structure and Reproduction of the Algae, Vol. 1. University Press, Cambridge.
- 256) Gacheva, G., Gigova, L., Ivanova, N., Iliev, I., Toshkova, R., Gardeva, E., Kussovski, V., Najdenski, H. (2013): Suboptimal growth temperatures enhance the biological activity of cultured cyanobacterium *Gloeocapsa*.sp. *Journal of Applied Phycology* 25:183–194.
- 257) Gadagkar, S.R., Rosenberg, M.S., Kumar, S. (2005): Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 304:64–74.
- 258) Gademann, K., Portmann, C. (2008): Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry* 12(4): 326-341.
- 259) Galbraith, H., Miller, T.B., Paton, A.M., Thompson, J.K. (1971): Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology* 34: 803–813.
- 260) Galmozzi, C. V., Fernandez-Avila, M. J., Reyes, J. C., Florencio, F. J., Muro-Pastor, M. I. (2007): The ammonium-inactivated cyanobacterial glutamine synthetase I is reactivated *in vivo* by a mechanism involving proteolytic removal of its inactivating factors. *Molecular Microbiology* 65: 166–179.
- 261) Gantar, M., Simović, D., Djilas, S., Gonzalez, W.W., Miksovska, J. (2012): Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. *Journal of Biotechnology* 159:21– 26
- 262) Gao, K.S. (1998): Chinese studies on edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *Journal of Applied Phycology* 10: 37-49.
- 263) Garcia-Pichel, F. Castenholz, R.W. (1991): Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology* 27: 395-409.
- 264) Garcia-Pichel, F., Nübel, U., Muyzer, G. (1998): The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169(6): 469-482.
- 265) Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A., Nubel, U. (2001): Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1902–1910.
- 266) Gauslaa, Y. (2008): Mollusc grazing may constrain the ecological niche of the old forest lichen *Pseudocyphellaria crocata*. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany) 10:711-717.
- 267) Gehringer, M.M., Adler, L., Roberts, A.A., Moffitt, M.C., Mihail, T.K., Mills, T.J.T., Fieker, C., Neilan, B.A. (2012): Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. *The ISME Journal* 6: 1834-1847.
- 268) Geitler, L. (1925): Synoptische darstellung der Cyanophyceen in morphologischer und systematischer Hinsicht. Beihefte zum Botanischen Centralblatt 41(Abt. 2): 163-294, pls XVII-XX.
- 269) Geitler, L. (1932): Cyanophyceae. In Kolkwitz, R. (ed.), Rabenhorst's Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Vol. 14. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig: 1–1196.
- 270) Geitler, L. (1942): Schizophyta: Klasse Schizophyceae. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien, Zweite Auflage. (Engler, A. & Prantl, K. Eds) Vol.1b, pp. 1-232. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- 271) Gerwick, W.H., Tan, L.T., Sitachitta, N. (2001): Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. In: Cordell, G.A. (Ed.), The Alkaloids, vol. 57. Academic Press, New York, pp. 75–184.
- 272) Ghasemi, Y., Yazdi, M.T., Shafiee, A., Amini, M., Shokravi, S., Zarrini, G. (2004): Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology* 42: 318–322.
- 273) Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S., Morowvat, M.H. (2007): Antifungal and Antibacterial Activity of the Microalgae Collected from Paddy Fields of Iran: Characterization of Antimicrobial Activity of *Chroococcus dispersus*. *Journal of Biological Sciences* 7(6): 904-910.
- 274) Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ebrahimzadeh, M.A. (2009): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(3): 277-281.
- 275) Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B. (2008): Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gene sequences: *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1019–1025.
- 276) 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.
- 277) Golubic, S. (1967): Algenvegetation der Felsen. Eine o kologische Algenstudie im dinarischen Karstgebiet. In Die Binnengewässer (Elster, H. J. & Ohle, W., editors), vol. 23: 1-183.
- 278) Golubic, S. (1976): Organisms that build stromatolites. In Walter, M. R. (ed.), Stromatolites, Developments in Sedimentology. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam: 113–126.

- 279) Golubic, S., Seong-Joo, L. (1999): Early cyanobacterial fossil record: preservation, palaeoenvironments and identification. *European Journal of Phycology* 34(4): 339-348.
- 280) Gomont, M. (1892): Monographie des Oscillariées (*Nostocaceae* homocystées). *Annales des Sciences Naturelles, Serie Botanique* 15: 265–368.
- 281) Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X., Gao, H. (2011): Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38: 1879–1890.
- 282) Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A.P., Sousa, I., Empis, J. (2006): *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology* 222: 362–367.
- 283) Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010): SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-4.
- 284) Granhall, U. (1975): Nitrogen fixation by blue-green algae in temperate soils. In: International Biological Programme, 6, Nitrogen-fixation by Free-living Microorganisms (Ed. b' W. D, P. Stewart), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 189-198.
- 285) Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., Collier, J.L. (1993): The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiology Reviews* 57: 725-749.
- 286) Grunwald, D.J., Eisen, J.S. (2002): Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics* 3: 717–724.
- 287) Guedes, A.C., Amaro, H.M., Gião, M.S., Malcata, F.X. (2013): Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry* 138: 638-643.
- 288) Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J.-F., Salkinoja-Salonen, M.S., Sivonen, K. (2002): Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktotrix* (cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1007–1015.
- 289) Gugger, M.F., Hoffman, L. (2004): Polyphyly of true branching cyanobacteria (*Stigonematales*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(2): 349-357.
- 290) Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., Humbert, J.-F. (2005): Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1097–1100.
- 291) Gullede, B.M., Aggen, J.B., Chamberlin, A.R. (2003): Linearized and truncated microcystin analogues as inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 2903–2906.
- 292) Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y. (2008): A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58: 149–159.
- 293) Guoce, Y., Dingji, S., Zhaoling, C., Wei, C., Fan, O. (2011): Growth and Physiological Features of Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 in a Glucose-Mixotrophic Culture. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING Chinese Journal of Chemical Engineering* 19(1): 108-115.
- 294) Gupta, N., Bhaskar, A.S.B., Lakshmana Rao, P.V. (2001): Toxin production in batch cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 339–346.
- 295) Gupta, S., Agrawal, S. C. (2006): Survival of blue-green and green algae under stress conditions. *Folia Microbiologica* 51: 121–128.
- 296) Gupta, S., Agrawal, S. C. (2008): Vegetative survival of some wall and soil blue-green algae under stress conditions. *Folia Microbiologica* 53: 3343–3350.
- 297) Gupta, V., Ratha, S.K., Sood, A., Chaudhary, V., Prasanna, R. (2013): New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. *Algal Research* 2: 79–97.
- 298) Guschina, I.A., Harwood, J.L. (2009): Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In: Arts MT, Brett MT, Kainz M (eds) *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, NY, pp 1–24.
- 299) Gustafsson, S., Hansson, L.A. (2004): Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology* 38(1): 37–44.
- 300) Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Jos, Á., Cameán, A.M. (2011): Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(6): 1567–1572.
- 301) Haass, D., Tanner, W. (1974): Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology* 53: 14–20.
- 302) 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.
- 303) Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.-R., Triebkorn (2006): Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 378-388.
- 304) Haney, J.F., Sasner, J.J., Ikawa, M. (1995): Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnology and Oceanography* 40: 263-272.
- 305) Hamidi, R., Jovanova, B., Kadifkova Panovska, T. (2014): Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin* 60 (1): 9 – 18.



- 306) Harada, K., Matsuura, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W. (1990): Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* 28: 55–64.
- 307) Harada, K. I., Fujii, K. Hayashi, K., Suzuki M. (1996): Application of D, LFDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method. *Tetrahedron Letter* 37(17): 3001–3004.
- 308) Harper, K.T., Belnap, J. (2001): The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *Journal of Arid Environments* 47: 347–357.
- 309) Harvey, A.L. (2008): Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 13(19–20): 894–901.
- 310) Harvey, A.L., Clark, R.L., Mackay, S.P., Johnston, B.F. (2010): Current strategies for drug discovery through natural products. *Expert Opinion on Drug Discovery* 5: 559–568.
- 311) Haury, J.F., Spiller, H. (1981): Fructose uptake and influence on growth of and nitrogen fixation by *Anabaena variabilis*. *Journal of Bacteriology* 147: 227–235.
- 312) Hayashi, K., Hyashi, T. Kojima, J. (1991): A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Research and Human Retroviruses* 12: 1463–1471.
- 313) He, Y-Y, Häder, D.-P. (2002): Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1: 729–736.
- 314) Hedman, C.J., Krick, W.R., Karner Perkins, D.A., Harrahy, E.A., Sonzogni, W.C., (2008): New measurements of cyanobacterial toxins in natural waters using High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Environmental Quality* 37: 1817–1824.
- 315) Hegde, D.M., Dwivedi, B.S., Babu, S.N.S. (1999): Biofertilizers for cereal production in India—a review. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 69: 73–83.
- 316) Heinze, R., Fastner, J., Neumann, U., Chorus, I. (2001): Testing cyanobacterial toxicity with primary rat hepatocyte and cell-line assays. – In: Chorus I. (ed.), *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*: 317–324. – Springer Publishers Heidelberg.
- 317) Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J. (1998): Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3590–3595.
- 318) Helm, R.F., Huang, Z., Edwards, D., Leeson, H., Peery, W., Potts, M. (2000): Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *Journal of Bacteriology* 182: 974–982.
- 319) Hemlata, Fatma, T. (2009): Screening of Cyanobacteria for Phycobiliproteins and Effect of Different Environmental stress on Its Yield. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83: 509–515.
- 320) Henn, K., Braunbeck, T. (2011): Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 153C: 91–98.
- 321) Henson, B.J., Hesselbrock, S.M., Watson, L.E., Barnum, S.R. (2004): Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on *nifD*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(2): 493–497.
- 322) Hershkovitz, N., Oren, A., Cohen, Y. (1991): Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matrix water stress. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 645–648.
- 323) Hifney, A.F., Issa, A.A., Fawzy, M.A. (2012): Abiotic stress induced production of  $\beta$ -carotene, allophycocyanin and total lipids in *Spirulina* sp.. *Journal of Biology and Earth Sciences* 3(1): B54–B-64.
- 324) Higo, A., Katoh, H., Ohmori, K., Ikeuchi, M., Ohmori, M. (2006): The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* 152: 979–987.
- 325) Higo, A., Suzuki, T., Ikeuchi, M., Ohmori, M. (2007): Dynamic transcriptional changes in response to rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* 153: 3685–3694.
- 326) Higo, A., Ikeuchi, M., Ohmori, M. (2008): cAMP regulates respiration and oxidative stress during rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Letters* 582: 1883–1888.
- 327) Hill, D.R., Keenan, T.W., Potts, M., Crowe, J.H. (1997): Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology* 9: 237–248.
- 328) Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005): Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1): 6–19.
- 329) Hilscherova, K., Machala, M., Kannan, K., Blankenship, A.L., Giesy, J.P. (2000): Cell bioassay for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples – review. *Environmental Science and Pollution Research* 7: 159–171.
- 330) 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* 66: 1905–1906.
- 331) Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M. (2000): Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology* 12: 435–439.
- 332) Hirsch, C.F., Liesch, J.M., Salvatore, M.J., Schwartz, R.E., Sesin, D.F. (1988): Antifungal fermentation product. GB Patent. 2220657.

- 333) Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomšičková, J., Zapomělová, E., Skácelová, K., Lukešová, A., Kopecký, J. (2011): Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon* 57(1): 76–83.
- 334) Hoffmann, L. (1989): Algae of terrestrial habitats. *Botanical Review* 55: 77–105.
- 335) Hoffmann, L., Komárek, J., Kastovsky, J. (2005): System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria): state in 2004. *Algalogical Studies* 117: 95–115.
- 336) Hoffmann, J.L., Torontali, S.P., Thomason, R.G., Lee, D.M., Brill, J.L., Price, B.B., Carr, G.J., Versteeg, D.J. (2006): Hepatic gene expression profiling using Genechips in zebrafish exposed to 17alpha-ethynylestradiol. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 79(3): 233–246.
- 337) Hornby, D. (1983): Suppressive soils. *The Annual Review of Phytopathology* 21: 65–85.
- 338) Hotchkiss, R.S., Nicholson, D.W. (2006): Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature Reviews Immunology* 6: 813–822.
- 339) Hrouzek, P. et al. (2011): Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial *Nostoc* strains, originating from different climatic/geographic regions and habitats: Is their cytotoxicity environmentally dependent? *Environmental Toxicology* 26: 345–358.
- 340) Hu, C., Liu, Y., Paulsen, B.S., Petersen, D., Klaveness, D. (2003): Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydrate Polymers* 54: 33–42.
- 341) Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008): Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant journal* 54: 621–639.
- 342) Huang, Z.B., Liu, Y.D., Paulsen, B.S., Klaveness, D. (1998): Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: Comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *Journal of Phycology* 34(6): 962–968.
- 343) Huang, Z., Guo, B.J., Wong, R.N.S., Jiang, Y. (2007): Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry* 100: 1137–1143.
- 344) Huang, H., Xiao, X., Shi, J., Chen, Y. (2014): Structure–activity analysis of harmful algae inhibition by congeneric compounds: case studies of fatty acids and thiazolidinediones. *Environmental Science and Pollution Research* 21(11): 7154–64.
- 345) Huber, U., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1998): Isolation of a nitrile-containing indole alkaloid from the terrestrial blue-green alga *Hapalosiphon delicatulus*. *Journal of Natural Products* 61(10): 1304–6.
- 346) Humble, A.V., Gadd, G.M., Codd, G.A. (1997): Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. *Water Research* 31 (7): 1679–1686.
- 347) Humpage, A.R., Rositano, J., Breitag, A.H., Brown, R., Baler, P.D., Nicholson, W.C., Steffensen, A.D. (1994): Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 45: 761–777.
- 348) Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R. (2000): Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research* 472: 155–161.
- 349) Hunsucker, S.W., Klage, K., Slaughter, S.M., Potts, M., Helm, R.F. (2004): A preliminary investigation of the *Nostoc punctiforme* proteome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 1121–1127.
- 350) Ininbergs, K., Bay, G., Rasmussen, U., Wardle, D.A., Nilsson, M.-C. (2011): Composition and diversity of *nifH* genes of nitrogen-fixing cyanobacteria associated with boreal forest feather mosses. *New Phytologist* 192: 507–517.
- 351) Inoue, S., Browne, G., Melino, G., Cohen, G.M. (2009): Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death & Differentiation* 16: 1053–1061.
- 352) Ishida, K., Matsuda, H., Okita, Y., Murakami, K. (2002): Aeruginoguanidines 98-A-98-C: cytotoxic unusual peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 58: 7645–7652.
- 353) ISO 15088:2007:2007. Water quality—Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). International Organization for Standardization: Geneva.
- 354) Issa, A.A. (1999): Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 8: 33–37.
- 355) Issa, O.M., Défarge, C., Trichet, J., Valentin, C., Rajot, J.L. (2009): Microbiotic soil crusts in the Sahel of Western Niger and their influence on soil porosity and water dynamics. *Catena* 77:48–55.
- 356) Jaag, O. (1945): Untersuchungen über die Vegetation und Biologie der Algen des nackten Gesteins in den Alpen, im Jura und im schweizerischen Mittelland. *Beitr Kryptogamenfl Schweiz* 9: 1–560.
- 357) Jablonski, E.M., Mattocks, M.A., Sokolov, E., Koniaris, L.G., Francis, M., Hughes, F.M., Fausto, N., Pierce, R.H., McKillop, I.H. (2007): Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 250: 36–46.
- 358) Jacquet, C., Thermes, V., de Luze, A., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J.S., Bourrat, F., Edery, M. (2004): Effects of microcystins-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon* 43: 141–147.
- 359) Jaja-Chimedza, A., Sanchez, K., Gantar, M., Gibbs, P., Schmale, M., Berry, J.P. (2017): Carotenoid glycosides from cyanobacteria are teratogenic in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. *Chemosphere* 174: 478–489.
- 360) Jaki, B., Orjala, J., Burgi, H.-R., Sticher, O. (1999): Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology* 37: 138–143.

- 361) 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.
- 362) Jaki, B., Orjala, J., Heilmann, J., Lindne, A., Vogler, B., Sticher, O. (2000a): Novel extracellular diterpenoids with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *The Journal of Natural Products* 63: 339–343.
- 363) Jaki, B., Heilmann, J., Sticher, O. (2000b): New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). *Journal of Natural Products* 63: 1283–1285.
- 364) James, H., Fawell, J. (1991): Detection and removal of cyanobacterial toxins from freshwaters. FR 0211, Foundation for Water Research, Marlow.
- 365) Janosek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., Holoubek, I. (2006): Environmental xenobiotics and nuclear receptors-interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology In Vitro* 20: 18-37.
- 366) Jensen, S., Petersen, B.O., Omarsdottir, S., Paulsen, B.S., Duus, J.O., Olafsdottir, E.S. (2013): Structural characterisation of a complex heteroglycan from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Carbohydrate Polymers* 91: 370-376.
- 367) Jia, Z., Liu, Y., Daroch, M. et al (2014): Screening, growth medium optimisation and heterotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173: 1667–1679.
- 368) Jimenez, J.I., Huber, U., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1999): Oxidized welwitindolinones from terrestrial *Fischerella* spp. *Journal of Natural Products* 62: 569–72.
- 369) Johansen, J.R. (1993): Cryptogamic crusts of semiarid and arid lands of North America. *Journal of Phycology* 29: 140–147.
- 370) Johnson, H.E., King, S.R., Banack, S.A., Webster, C., Callanaupa, W.J., Cox, P.A. (2008): Cyanobacterium (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *Journal of Ethnopharmacology* 118: 159-165.
- 371) Johnston, A.W.B., Li, Y., Ogilvie, L. (2005): Metagenomic marine nitrogen fixation – feast or famine?. *Trends in Microbiology* 13(9): 416-420.
- 372) Jonas, A., Buranova, V., Scholz, S., Fetter, E., Novakova, K., Kohoutek, J., Hilscherova, K. (2014): Retinoid-like activity and teratogenic effects of cyanobacterial exudates. *Aquatic Toxicology* 155: 283–290.
- 373) Jonas, A., Scholz, S., Fetter, E., Sychrova, E., Novakova, K., Ortmann, J., Benisek, M., Adamovsky, O., Giesy, J.P., Hilscherova, K. (2015): Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular *in vitro* and zebrafish embryo assays. *Chemosphere* 120: 321-327.
- 374) Jones, A.C., Monroe, E.A., Eisman, E.B., Gerwick, L., Sherman, D.H., Gerwick, W.H. (2010): The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. *Natural Product Reports* 27(7): 1048–1065.
- 375) Jung, S.H., Oh, H.M., Ko, S.R., Ahn, C.Y. (2011): Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. *Harmful Algae* 10: 188–193.
- 376) Jungblut, A.D., Lovejoy, C., Vincent, W.F. (2010): Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. *ISME Journal* 4: 191–202.
- 377) Jüttner, F. (2001). Liberation of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defense reaction in epilithic diatom biofilms. *Journal of Phycology* 37: 744–755.
- 378) Kaasalainen, U., Jokela, J., Fewer, D. P., Sivonen, K., Rikkinen, J. (2009): Microcystin production in the tripartite cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 22: 695–702.
- 379) Kaasalainen, U., Fewer, D. P., Jokela, J., Wahlsten, M., Sivonen, K., Rikkinen, J. (2012): Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptide in lichen symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 5886–5891.
- 380) Kaczyńska, A., Łoś, M., Węgrzyn, G. (2013): An improved method for efficient isolation and purification of genomic DNA from filamentous cyanobacteria belonging to genera *Anabaena*, *Nodularia* and *Nostoc*. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology* 42(1): 8-13.
- 381) Kaebnick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E. (2000): Light and the transcriptional response of the Microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3387-3392.
- 382) Kaebnick, M., Neilan, B. A. (2001): Ecological and molecular investigations of cyano-toxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1–9.
- 383) Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. (2013): DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology* 140-141: 229-238.
- 384) Kajiyama, S., Kanazaki, H., Kawazu, K., Kobayashi, A. (1998): Nostifungicide, an antifungal lipopeptide from the field grown terrestrial blue-green alga, *Nostoc commune*. *Tetrahedron Letters* 39: 37-40.
- 385) Kang, H.-S., Santarsiero, B.D., Kim, H., Krunic, A., Shen, Q., Swanson, S.M., Chai, H., Kinghorn, A.D., Orjala J. (2012): Merocyclophanes A and B, antiproliferative cyclophanes from the cultured terrestrial Cyanobacterium *Nostoc* sp.. *Phytochemistry* 79: 109-115.
- 386) Kao, C.Y. (1993): Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 75-86.
- 387) Kaplan-Levy, R. et al. (2010): Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. In *Dormancy and Resistance in Harsh Environments* (Lubzens, E. et al., eds), Berlin/Heidelberg, Springer, pp. 5-27.
- 388) Karsten, U., Garcia-Pichel, F. (1996): Carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds in members of the genus *Microcoleus* (Cyanobacteria): a chemosystematic study. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 285-294.

- 389) 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.
- 390) Kasting, J.F. (2001): Earth history. The rise of atmospheric oxygen. *Science* 293: 819–820.
- 391) Katircioğlu, H., Akin, B.S., Atici, T. (2004): Microalgal toxin(s): characteristics and importance. *African Journal of Biotechnology* 3: 667–674.
- 392) Katoh, H., Shiga, S., Nakahira, Y., Ohmori, M. (2003): Isolation and characterization of drought-tolerant cyanobacterium *Nostoc* sp. HK-01. *Microbes and Environments* 18: 82–88.
- 393) Katoh, H., Asthana, R.K., Ohmori, M. (2004): Gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 under desiccation. *Microbial ecology* 47: 164–174.
- 394) Katoh, H. (2012): Desiccation-inducible genes are related to N<sub>2</sub>-fixing system under desiccation in a terrestrial cyanobacterium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 1263–1269.
- 395) Kawaguchi, T., Decho, A.W. (2000): Biochemical characterization of cyanobacterial extracellular polymers (EPS) from modern marine stromatolites. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 30: 321–330.
- 396) Kawamoto, J., Kurihara, T., Yamamoto, K., Nagayasu, M., Tani, Y., Mihara, H., Hosokawa, M., Baba, T., Sato, S.B., Esaki, N. (2009): Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Journal of Bacteriology* 191: 632–640.
- 397) Kaya, K., Sano, T., (1998): A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. *Chemical Research in Toxicology* 11(3): 159–163.
- 398) Kaya, K., Shiraiishi, F., Uchida, H., Sano, T. (2011): A novel retinoic acid analogue, 7-hydroxy retinoic acid, isolated from cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810: 414–419.
- 399) Kenyon, C.N. (1972): Fatty acid composition of unicellular strains of blue–green algae. *Journal of Bacteriology* 109: 827–834.
- 400) Kenyon, C.N., Rippka, R., Stanier, R.Y. (1972): Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue–green algae. *Archives of Microbiology* 83: 216–236.
- 401) 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.
- 402) Kerfeld, C.A. (2004): Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430: 2–9.
- 403) Kesheri, M., Richa, Sinha, R., P. (2011): Antioxidants as natural arsenal against multiple stresses in cyanobacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(2): B168–B187.
- 404) Khattar, J.I.S., Singh, D.P., Kaur, G. (2009): Algal Biology and Biotechnology. New Delhi. India 1–251.
- 405) Khamlue, R., Ounaroon, A., Saelim, N. (2012): Purification and characterization of polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula*. 1st Mae Fah Luang University International Conference. 1–9.
- 406) Kikuta, H., Fredman, D., Rinkwitz, S., Lenhard, B., Becker, T.S. (2007): Retroviral enhancer detection insertions in zebrafish combined with comparative genomics reveal genomic regulatory blocks—a fundamental feature of vertebrate genomes. *Genome Biology* 8(Suppl. 1): S4.
- 407) Kim, H., Lantvit, D., Hwang, C.H., Kroll, D.J., Swanson, S.M., Franzblau, S.G., Orjala, J. (2012): Indole alkaloids from two cultured cyanobacteria, *Westiellopsis* sp. and *Fischerella muscicola*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 5290–5295.
- 408) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203(3): 253–310.
- 409) Kiss, T., Vehovsky, A., Hiripi, L., Kovacs, M., Voros, L. (2002): Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131: 167–176.
- 410) Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemela, S.I. (1991): Detection and toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology and Water Quality* 6: 423–426.
- 411) Klein, D., Daloze, D., Braekman, J.C., Hoffmann, L., Demoulin, V. (1995): New Hapalindoles from the cyanophyte *Hapalosiphon laingii*. *Journal of Natural Products* 58: 1781–1785.
- 412) Kleinhenz, V., Schnitzler, W.-H., Midmore, D.-J. (1997): Seasonal effect of soil moisture on soil availability, crop N status, and yield of vegetables in a tropical, rice-based lowland. *Tropenlandwirt.Beitr.Tropischen Landwirtschaft.Veterinärme* 98: 25–42.
- 413) Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Snóblková, M., Stěrbová, D. (2010): Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 7956–7965.
- 414) Kligman, A.M. (1965): Topical pharmacology and toxicology of dimethylsulfoxide (DMSO) Part I. *Journal of the American Medical Association* 193: 796–804.
- 415) Klock, J.-H., Wieland, A., Seifert, R., Michaelis, W. (2007): Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimisation. *Marine Biology* 152(5): 1077–1085.
- 416) Knoll, A.H. (2008): Cyanobacteria and earth history, In: A. Herrero and E. Flores (eds.). *The Cyanobacteria, Molecular Biology, Genetics and Evolution*. Caister, Academic, norfolk, UK, pp. 1–20.
- 417) Knübel, G., Larsen, K.L., Moore, R.E., Levine, I.A., Patterson, G.L.M. (1990): Cytotoxic, antiviral indocarbazoles from a blue-green alga belonging to the nostocaceae. *Journal of Antibiotics* 10: 1236–1239.



- 418) Komárek, J. (1996): Towards a combined approach for the taxonomy and species delimitation of picoplanktic cyanoprokaryotes. *Algological Studies* 83: 377–401.
- 419) Komárek, J. Anagnostidis, K. (1999): Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. In Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig & D. Möllenhauer (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- 420) Komárek, J. Anagnostidis, K. (2005): Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- 421) Komárek, J., Ventura, S., Turicchia, S., Komarkova, J., Mascalchi, C., Soldati, E. (2005): Cyanobacterial diversity in alkaline marshes of northern Belize (Central America). *Algological Studies* 117: 265–278.
- 422) Komárek, J. (2006): Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae Volume* 21(4): 349-375.
- 423) Komárek, J. (2013): Cyanoprokaryota 3. Teil Heterocystous Genera. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag.
- 424) Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J.R. (2014): Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-334.
- 425) Komárek, J. (2016): A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology* 51(3): 346-353.
- 426) Kondrateva, N. V. (1968): Sino-zeleni vodorosti. In Vozn. Prsnov. Vodorost. Ukr. RSR 1, 2, Naukova Dumka, Kiev.
- 427) Koreivienė, J., Belous, O. (2012): Methods for cyanotoxins detection. *Botanica Lithuanica* 18(1): 58–65.
- 428) Korpinen, S., Karjalainen, M., Viitasalo, M. (2006): Effects of cyanobacteria on survival and reproduction of the littoral crustacean *Gammarus zaddachi* (Amphipoda). *Hydrobiologia* 559: 285-295.
- 429) Kovač, D., Simeunović, J., Milovanović, I., Mišan, A., Babić, O. (2014): Determination of fatty acid profile and effect of mixotrophic growth in selected cyanobacterial strains. Contemporary agriculture – The Serbian Journal of Agricultural Science, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Vol. 63, No. 3, Spec. issue, ISSN: 0350 – 1205, UDC: 63(497.1)(051)-,540.2<sup>c</sup>, 184-192.
- 430) Kováts, N., Ács, A., Paulovits, G., Vaas, G. (2011): Response of *Lemna minor* clones to *Microcystis* toxicity. *Applied ecology and environmental research* (1): 17–26.
- 431) Kozłowski-Suzuki, B., Koski, M., Hallberg, E., Wallen, R., Carlsson, P. (2009): Glutathione transferase activity and oocyte development in copepods exposed to toxic phytoplankton. *Harmful Algae* 8: 395-406.
- 432) Kruger, G. H. J., De Wet, H., Kock, J. L. F., Pieterse, A. J. H. (1995): Fatty acid composition as a taxonomic characteristic for *Microcystis* and other coccoid cyanobacteria (blue green alga) isolates. *Hydrobiologia* 308: 145 - 151.
- 433) Krumbein, W. E. (1979): Über die Zuordnung der Cyanophyten. In Krumbein, W. E. (ed.), Cyanobakterien oder Algen?. Oldenburg, *Littman*: 33–48.
- 434) Krumbein, W.E., Paterson, D.M., Stal, L.J. (eds) (1994): Biostabilization of sediments. BIS-Verlag, Oldenburg.
- 435) Kulik, M. M. (1995): The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 101: 585–599.
- 436) Kumar, K. et al. (2010): Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a000315.
- 437) Kumar, A., Kumar, A., Rai, A. K., Tyagi, M. B. (2011): PCR-based detection of *mcy* genes in blooms of *Microcystis* and extracellular DNA of pond water. *African Journal of Microbiology Research* 5(4): 374-381.
- 438) Kurmayer, R., Kutzenberger, T. (2003): Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp.. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11): 6723–6730.
- 439) Kurmayer, R., Christiansen, G. (2009): The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshwater Reviews* 2: 31–50.
- 440) Kurmayer, R. (2011): The toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *Journal of Phycology* 47: 200-207.
- 441) Kyselková, I., Maršálek, B. (2000): Using of *Daphnia magna*, *Artemia salina* and *Tubifex tubifex* for cyanobacterial microcystins detection. *Biologia* 55(6): 637-643.
- 442) Labarre, J., Chauvat, F., Thuriaux, P. (1989): Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 171: 3449–3457.
- 443) Lagerheim, M.G. (1892): La Yuyucha. *La Nuova Notarisia* 3: 1376-1377.
- 444) Lagerström, A., Nilsson, M.-C., Zackrisson, O., Wardle, D.A. (2007): Ecosystem input of nitrogen through biological fixation in feather mosses during ecosystem retrogression. *Functional Ecology* 21: 1027–1033.
- 445) Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapala, J., Sivonen, K., Niemelä, S.J. (1995): Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Letters in Applied Microbiology* 21: 109–114.
- 446) Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, Th. (2009): Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149: 196-209.
- 447) Laub, J., Henriksen, P., Brittain, S.M., Wang, J., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., Moestrup, Ø. (2002): [ADMAAdda5]-microcystins in *Planktothrix agardhii* strain PH-123 (cyanobacteria)—importance for monitoring of microcystins in the environment. *Environmental toxicology* 17: 351–357.
- 448) Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A. (1994): Extraction and high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated water. *Analyst* 119: 1525-1530.

- 449) Lawton, L.A., Edwards, C. (2008): Conventional laboratory methods for cyanotoxins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619: 513–537.
- 450) Lawton, L.A., Chambers, H., Edwards, C., Nwaopara, A.A., Healy, M. (2010): Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon* 55: 973–978.
- 451) Lázaro, R., Cantón, Y., Solé-Benet, A., Bevan, J., Alexander, R., Sancho, L.G., Puigdefàbregas J. (2008): The influence of competition between lichen colonization and erosion on the evolution of soil surfaces in the badlands (SE Spain) and its landscape effects. *Geomorphology* 102: 252–266.
- 452) Leao, P.N., Pereira, A.R., Liu, W.T., Ng, J., Pevzner, P.A., Dorrestein, P.C. et al. (2010): Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 11183–8.
- 453) 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): 00–00.
- 454) Lee, Y.K. (2004): Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell pp. 116–124.
- 455) Lefebvre, K.A., Elder, N.E., Hershberger, P.K., Trainer, V.L., Stehr, C.M. Scholz, N.L. (2005): Dissolved saxitoxin causes transient inhibition of sensorial motor function in larval Pacific herring (*Clupea harengus pallasi*). *Marine Biology* 147: 1393–1402.
- 456) Lemes-da-Silva, N.M., Henrique, L., Branco, Z., Necchi Junior, O. (2012): Corticolous cyanobacteria from tropical forest remnants in northwestern São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 35(2): 169–179.
- 457) Levin, R.E. (1991): Paralytic shellfish toxins: their origin, characteristics and methods of detection: a review. *Journal of Food Biochemistry* 15: 405–17.
- 458) Lewin, R.A. (1974): Biochemical taxonomy. In: *Algal Physiology and Biochemistry*, ed. Stewart, W.D.P. Botanical Monographs, Vol. 10. Blackwell Sci. Pub., Oxford.
- 459) Lewis, J.A., Papavizas, G.C. (1991): Biocontrol of plant diseases: The approach of tomorrow. *Crop Protection* 10: 95–105.
- 460) Li, S.H. (1991): Ecology of the terrestrial alga *Nostoc flagelliforme* Berk. et Curt. in China. *Journal of Phycology* 27 (Suppl.): 45.
- 461) Li, R., Watanabe, M.M. (2001): Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. *Phytochemistry* 57: 727–731.
- 462) Li, H., Murphy, T., Guo, J., Parr, T., Nalewajko, C. (2009): Iron-stimulated growth and microcystin production of *Microcystis novacekii* UAM 250. *Limnologica* 39: 255–259.
- 463) Li, H., Xu, J., Liu, Y., Ai, S., Qin, F., Li, Z., Zhang, H., Huang, Z. (2011): Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune*. *Carbohydrate Polymers* 83: 1821–1827.
- 464) Liang, W., Zhou, Y., Wang, L., You, X., Zhang, Y., Cheng, C.-L., Chen, W. (2012): Ultrastructural, physiological and proteomic analysis of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration and rehydration. *Journal of Proteomics* 75: 5604–5627.
- 465) Lilleheil, G., Andersen, R.A., Skulberg, O.M., Alexander, J. (1997): Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon* 35: 1275–1289.
- 466) Lin, T., Wu, J. (2015): Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic conditions. *Bioresource Technology* 184: 100–107.
- 467) Liu, Y.D., Song, L.R., Li, X.Y., Liu, T.M. (2002): The toxic effects of microcystins-LR on embryo–larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunthe. *Toxicon* 40: 395–399.
- 468) Liu, X., Ju, X., Zhanga, F., Pana, J., Christie, P. (2003): Nitrogen dynamics and budgets in a winter wheat–maize cropping system in the North China Plain. *Field Crops Research* 83: 111–124.
- 469) Liu, R.H. (2003): Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 517S–520S.
- 470) Liu, X.-J., Chen, F. (2003): Cell Differentiation and Colony Alteration of an Edible Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*, in Liquid Suspension Cultures. *Folia Microbiologica* 48(5): 619–626.
- 471) Liu, X.J., Jiang, Y., Chen, F. (2005): Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process Biochemistry* 40: 371–377.
- 472) Liu, S., Leach, S.D. (2011): Zebrafish models for cancer. *Annual Review of Pathology* 6: 71–93.
- 473) Liu, L., Li, K., Chen, T., Dai, X., Jiang, M., Diana, J.S. (2011): Effects of *Microcystis aeruginosa* on life history of water flea *Daphnia magna*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 29(4): 892–897.
- 474) Liu, W., Qiao, Q., Chen, Y., Wu, K., Zhang, X. (2014): Microcystin-LR exposure to adult zebrafish (*Danio rerio*) leads to growth inhibition and immune dysfunction in F1 offspring, a parental transmission effect of toxicity. *Aquatic Toxicology* 155: 360–367.
- 475) Lodders, N., Stackebrandt, E., Nübel, U. (2005): Frequent genetic recombination in natural populations of the marine cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Environmental Microbiology* 7(3): 434–442.
- 476) 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(3): 471–482.

- 477) Lopes, V.R., Ramos, V., Martins, A., Sousa, M., Welker, M., Antunes, A., Vasconcelos, V.M. (2012): Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research* 73: 7–16.
- 478) Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., Morales, E. (2003): Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Botanica* 60: 83-89.
- 479) Ludwig, W., Klenk, H.-P. (2001): Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Boone DR and Castenholz RW (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, 2nd ed: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-65.
- 480) Lukešová, A. (1993): Soil algae in four secondary successional staages on abandoned fields. *Archiv fur Hydrobiologie. Supplementband: Algological Studies* 71: 81-102.
- 481) Lüring, M. (2003): *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography* 48: 2214-2220.
- 482) Lüring, L., Faassen, E.J., Eenennaam, J.S.V. (2011): Effects of the cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research* 33 (2): 333-342.
- 483) Lyu, K., Zhang, L., Zhu, X., Cui, G., Wilson, A.E., Yang, Z. (2015): Arginine kinase in the cladoceran *Daphnia magna*: cDNA sequencing and expression is associated with resistance to toxic *Microcystis*. *Aquatic Toxicology* 160: 13–21.
- 484) Ma, Y., Jiao, N.Z., Zeng, Y.H. (2004): Natural community structure of cyanobacteria in the South China Sea as revealed by *rpoC1* gene sequence analysis. *Letters in Applied Microbiology* 39: 353–8.
- 485) 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.
- 486) Mackinney, G. (1941): Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* 140: 315-322.
- 487) Magarvey, N.A., Beck, Z.Q., Golakoti, T., Ding, Y., Huber, U., Hemscheidt, T.K., Abelson, D., Moore, R.E., Sherman, D.H. (2006): Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. potent anticancer agents from cyanobionts. *ACS Chemical Biology* 1: 766–79.
- 488) Mager, D.M., Thomas, A.D. (2011): Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: a review of their role in dryland soil processes. *Journal of Arid Environments* 75: 91–97.
- 489) Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. (1987): Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25(11): 1221-1227.
- 490) Malbrouck, C., Kestemont, P. (2006): Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1): 72–86.
- 491) Malicki, J., Jo, H., Wei, X., Hsiung, M., Pujic, Z. (2002): Analysis of gene function in the zebrafish retina. *Methods* 28: 427–438.
- 492) Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.
- 493) Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A. (2009): Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6924–6928.
- 494) Mancuso Nichols, C.A., Guezennec, J., Bowman, J.P. (2005): Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine Biotechnology* 7: 253–271.
- 495) Mankiewicz-Boczek, J., Izydorczyk, K., Romanowska-Duda, Z., Jurczak, T., Stefaniak, K., Kokocinski, M. (2006): Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods. *Environmental Toxicology* 21: 380–387.
- 496) Mannheim, B. (1986): Poetic form in Guaman Poma's *Wariqsa Arawi*. *Amerindian* 11: 41-67.
- 497) Markham, J. (2009): Variation in moss-associated nitrogen fixation in boreal forest stands. *Oecologia* 161: 353–359.
- 498) Marquez, F.J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S. (1993): Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76: 408-410.
- 499) Marquez, F.J., Nishio, N., Nagai, S., Sasaki, K. (1995): Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 62: 159-164.
- 500) Maršálek, B., Bláha, L. (2000): Microbitests for cyanobacterial toxins screening. In: PERSOONE, G., JANSSEN, C. & DE COEN, W. (eds), *New microbitests for routine toxicity screening and monitoring*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, pp. 519-525.
- 501) Martins, R.F., Ramos, M.F., Herfindal, L., Sousa, J.A., Skærven, K., Vasconcelos, V.M. (2008): Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria—*Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs* 6(1): 1–11.
- 502) Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., Lee, Y. C. (2005): Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in a microplate format. *Analytical Biochemistry* 339: 69–72.
- 503) Masuyama, Y., Kinugawa, N., Kurusu, Y. (1987): *Journal of Organic Chemistry* 52: 3704-3706.
- 504) Matsui, K., Nazifi, E., Kunita, S., Wada, N., Matsugo, S., Sakamoto, T. (2011): Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 105: 81-89.
- 505) McCurley, A.T., Callard, G.V. (2008): Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology* 9: 102.



- 506) **McElhiney, J., Lawton, L.A.** (2005): Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 219-230.
- 507) **Medini, D., Tettelin, H.D., Masignani, V., Rappuoli, R.** (2005): The microbial pangenome. *Current Opinion in Genetics and Development* 15: 589-594.
- 508) **Meeks, J.C., Campbell, E.L., Summers, M.L., Wong, F.C.** (2002): Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology* 178: 395-403.
- 509) **Metcalf, J.S., Lindsay, J., Beattie, K.A., Birmingham, S., Saker, M.L., Toeroekne, 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.
- 510) **Metcalf, J.S., Codd, G.A.** (2012): Cyanotoxins. In: Whitton BA (ed) Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Springer, Dordrecht, pp. 651-675.
- 511) **Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V., Browse, J.** (2001): Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293:290-293.
- 512) **Micheletti, E., Pereira, S., Mannelli, F., Moradas-Ferreira, P., Tamagnini, P., De Philippis, R.** (2008): Sheathless mutant of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. strain PCC 6909 with increased capacity to remove copper ions from aqueous solutions. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2797-2804.
- 513) **Milan, D.J., Peterson, T.A., Ruskin, J.N., Peterson, R.T., MacRae, C.A.** (2003): Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* 107(10): 1355-1358.
- 514) **Miller, M.J., Fallowfield, H.J.** (2001): Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments. *Water Science and Technology* 43(12): 229-32.
- 515) **Milovanović, I., Mišan, A., Šarić, B. et al.** (2012): Evaluation of protein and lipid content and determination of fatty acid profile in selected species of cyanobacteria. Proceedings of the 6th Central European Congress on Food (Cefood '12), Novi Sad, Serbia, pp. 13-17.
- 516) **Miralles, I., Domingo, F., Cantón, Y., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F.** (2012): Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones. *Soil Biology and Biochemistry* 53: 124-132.
- 517) **Mo, S., Kronic, A., Chlipala, G., Orjala, J.** (2009): Antimicrobial ambiguine isonitriles from the cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *The Journal of Natural Products* 72(5): 894-899.
- 518) **Mo, S., Kronic, A., Pegan, S.D., Franzblau, S.G., Orjala, J.** (2009): An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp. *Journal of Natural Products* 72: 2043-2045.
- 519) **Mo, S., Kronic, A., Santarsiero, B.D., Franzblau, S.G., Orjala, J.** (2010): Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Phytochemistry* 71(17-18): 2116-23.
- 520) **Mollema, N.J., Yuan, Y., Jelcick, A.S., Sachs, A.J., von Alpen, D., Schorderet, D., Escher, P., Haider, N.B.** (2011): Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina. *PLoS ONE* 6(3): e17494.
- 521) **Möllenbauer, D., Bengtsson, R., Lindström, E.-A.** (1999): Macroscopic cyanobacteria of the genus *Nostoc*: a neglected and endangered constituent of European inland aquatic biodiversity. *European Journal of Phycology* 34(4): 349-360.
- 522) **Monsigny, M., Petit, C., Roche, A.C.** (1988): Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry* 175(2): 525-30.
- 523) **Moon, S.S., Chen, J., Moore, R.E., Patterson, G.M.L.** (1992): Calophycin, a fungicidal cyclic decapeptide from the terrestrial blue-green alga *Calothrix fusca*. *Journal of Organic Chemistry* 57: 1097-103.
- 524) **Moon, H.-S., Jacobson, E.M., Khersonsky, S.M., Luzung, M.R., Walsh, D.P., Xiong, W., Lee, J.W., Parikh, P.B., Lam, J.C., Kang, T.-W., Rosania, G.R., Schier, A.F., Chang, Y.-T.** (2002): A novel microtubule destabilizing entity from orthogonal synthesis of triazine library and zebrafish embryo screening. *Journal of the American Chemical Society* 124: 11608-11609.
- 525) **Moore, R.E., Cheuk, C., Patterson, G.M.L.** (1984): Hapalindoles: New alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*. *Journal of the American Chemical Society* 106: 6456-6457.
- 526) **Moore, R.E., Cheuk, C., Yang, X.Q.G., Patterson, G.M.L., Bonjouklian, R., Smitka, T.A., Mynderse, J.S., Foster, R.S., Jones, N.D.** (1987): Hapalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte *Hapalosiphon fontinalis*. *Journal of Organic Chemistry* 52: 1036-43.
- 527) **Moore, R.E., Yang, X.G., Patterson, G.M.L.** (1987): Fontonamide and anhydrohapaloxindole A, two new alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*. *Journal of Organic Chemistry* 52: 3773-3777.
- 528) **Moore, R.E., Yang, X.G., Patterson, G.M.L., Bonjouklian, R., Smitka, T.A.** (1989): Hapalonamides and other oxidized hapalindoles from *Hapalosiphon fontinalis*. *Phytochemistry* 28: 1565-1567.
- 529) **Moore, B.S., Chen, J.L., Patterson, G.M.L., Moore, R.E.** (1990): [7.7]Paracyclophanes from blue-green algae. *Journal of the American Chemical Society* 112: 4061-4063.
- 530) **Moore, B.S., Chen, J.L., Patterson, G.M.L., Moore, R.E.** (1992): Structures of cylindrocyclophanes A-F. *Tetrahedron* 48: 3001-3006.
- 531) **Moore, R.E.** (1996): Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 134-143.

- 532) **Morales-Sánchez**, D., Tinoco, R., Kyndt, J., Martínez, A. (2013): Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology for Biofuels* 6: 1–13.
- 533) **Morales-Sánchez**, D., Oscar, A., Martínez-Rodríguez, Kyndt, J., Martínez, A. (2015): Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 31: 1–9.
- 534) **Morel**, Y., **Barouki**, R. (1998): Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress — critical contribution of nuclear factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 273: 26969–76.
- 535) **Morin**, N., Vallaëys, T., Hendrickx, L., Natalie, L., Wilmotte, A. (2010): An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *The Journal of Microbiological Methods* 80: 148–154.
- 536) **Morsy**, F.M., Kuzuha, S., Takani, Y., Sakamoto, T. (2008): Novel thermostable glycosidases in the extracellular matrix of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of General and Applied Microbiology* 54(5): 243–252.
- 537) **Moustafa**, A., Loram, J.E., Hackett, J.D., Anderson, D.M., Plumley, F.G., Bhattacharya, D. (2009): Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS One* 4: 1–10.
- 538) **Msagati**, T.A.M., Siame, B.A., Shushu, D.D. (2006): Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology* 78: 382–397.
- 539) **Muller**, F., Blader, P., Strahle, U. (2002): Search for enhancers: teleost models in comparative genomic and transgenic analysis of cis regulatory elements. *Bioessays* 24(6): 564–72.
- 540) **Muller**, D., Krick, A., Kehraus, S., Mehner, C., Hart, M., Kupper, F.C., Saxena, K., Prinz, H., Schwalbe, H., Janning, P., Waldmann, H., König, G.M. (2006): Brunsvicamides A–C: sponge-related cyanobacterial peptides with *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 49: 4871–8.
- 541) **Mundt**, S., Kreitlow, S., Nowotny, A., Effmert, U. (2001): Biochemical and pharmacological investigation of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203: 327–334.
- 542) **Mundt**, S., Kreitlow, S., Jansen, R. (2003): Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology* 15: 263–267.
- 543) **Mur**, L.R., Skulberg, O.M., Utiklen, H. (1999): Cyanobacteria in the Environment. Chapter 2, pp. 15–40. In: Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. eds. Chorus, I. and Bartram, J. London and New York. E&FN Spon, 416 pp.
- 544) **Murata**, N., Wada, H., Gombos, Z. (1992): Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiology* 33: 933–941.
- 545) **Muro-Pastor**, M.I., Reyes, J.C., Florencio, F.J. (2005): Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 83: 135–150.
- 546) **Nabout**, J.C., Rocha, B.S., Carneiro, F.M., Sant’Anna, C.L. (2013): How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and Conservation* 22: 2907–2918.
- 547) **Nagasathya**, A., Thajuddin, N. (2008): Cyanobacterial diversity in the hypersaline environment of the salt pans of southeastern coast of India. *Asian Journal of Plant Sciences* 7: 473–478.
- 548) **Nagel**, R. (1993): Fish and environmental chemicals – a critical evaluation of tests. In T. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner (eds.), *Fish-Ecotoxicology and Ecophysiology* (147–156). Weinheim: VCH.
- 549) **Nagel**, R. (2002): DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – A general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19: 38–48.
- 550) **Nakajima**, T., Kajihata, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., Furusawa, C., Hirasawa, T., Shimizu, H. (2014): Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions. *Plant & Cell Physiology* 55(9): 1605–1612.
- 551) **Namikoshi**, N., **Rinehart**, K.L. (1996): Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 373–384.
- 552) **Namikoshi**, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S. (2003): Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new nontoxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 42: 533–538.
- 553) **Nannipieri**, P., Grego, S., Ceccanti, B. (1990): Ecological significance of biological activity. In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York, pp. 293–355.
- 554) **Neilan**, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Törökne, A., Burns, B.P. (2003): Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology* 12: 133–140.
- 555) **Neuhof**, T., Schmieder, P., Preussel, K., Dieckmann, R., Pham, H., Bartl, F., von Döhren, H., Hassallidin, A. (2005): A glycosylated lipopeptide with antifungal activity from the cyanobacterium *Hassallia* sp. *Journal of Natural Products* 68: 695–700.
- 556) **Neuhof**, T., Schmieder, P., Seibold, M., Preussel, K., von Döhren, H. (2006): Hassallidin B -second antifungal member of the Hassallidin family. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16: 4220–2.
- 557) **Neustupa**, J., **Škaloud**, P. (2008): Diversity of subaerial algae and cyanobacteria on tree bark in tropical mountain habitats. *Biologia* 63(6): 806–812.
- 558) **Neustupa**, J., **Škaloud**, P. (2010): Diversity of subaerial algae and cyanobacteria growing on bark and wood in the lowland tropical forests of Singapore. *Plant Ecology and Evolution* 143(1): 51–62.
- 559) **Nicholson**, B.C., **Burch**, M.D. (2001): Evaluation of analytical methods for detection quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. – Australia

- 560) **Nicolaus**, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Giulio, A., Gambacorta, A. (1999): Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52: 639–647.
- 561) **Nishida**, I., **Murata**, N. (1996): Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47(1): 541-568.
- 562) **Nishiyama**, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N. (2006): A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 742-749.
- 563) **Noaman**, N.H., Fattah, A., Khaleafa, M., Zaky, S.H. (2004): Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Microbiological Research* 159: 395–402.
- 564) **Nogueira**, I.C.G. et al. (2004): Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 19(5): 453–459.
- 565) **Nonneman**, D., **Paul**, Z.V. (2002): A PCR based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology* 38: 230–233.
- 566) **Norris**, R.L.G., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Senogles, P., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Davis, B.C., Seawright, A.A., Moore, M.R. (2001): Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental toxicology* 16: 391–396.
- 567) **Novakova**, K., Blaha, L., Babica, P. (2012): Tumor promoting effects of cyanobacterial extracts are potentiated by anthropogenic contaminants—evidence from *in vitro* study. *Chemosphere* 89: 30–37.
- 568) **Nübel**, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327–3332.
- 569) **Nunnery**, J.K., Mevers, E., Gerwick, W.H. (2010): Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 21(6): 787–793.
- 570) **Nybakken**, L., Helmersen, A.M., Gauslaa, Y., Selås, V. (2010): Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*). *Journal of Chemical Ecology* 36: 298-304.
- 571) **Oberemm**, A., Fastner, J., Steinberg, C.E.W. (1997): Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research* 31: 2918-2921.
- 572) **Oberemm**, A., Becker, J., Codd, G.A., Steinberg, C. (1999): Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* 14: 77-88.
- 573) **Odermatt**, A., **Gumy**, C. (2008): Disruption of glucocorticoid and mineralocorticoid Receptor-mediated responses by environmental chemicals. *Chimia (Aarau)* 62: 335-339.
- 574) **OECD** (2006): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems. Draft proposal for a new guideline: Fish Embryo Toxicity (FET) Test. France: Organization for Economic Cooperation and Development: Paris.
- 575) **Oehrle**, S.A., Southwell, B., Westrick, J. (2010): Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* 55: 965–972.
- 576) **Oggier**, D.M., Weisbrod, C.J., Stoller, A.M., Zenker, A.K., Fent, K. (2010): Effects of Diazepam on Gene Expression and Link to Physiological Effects in Different Life Stages in Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* 44(19): 7685-7691.
- 577) **Ohta**, T., Sueoka, E., Lida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishinaki, R., Tatematsu, M., Kim, S.-J., Carmichael, W.W., Fujik, H. (1994): Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat-liver. *Cancer Research* 54: 6402-6405.
- 578) **Ohta**, S., Shiomo, Y., Kawashima, A., Aozasa, O., Teruyuki, N. (1995): Antibiotic effect of linolenic acid from the *Chlorococcum* strain HS-101 and *Dunaliella primolecta* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Phycology* 7: 121–127.
- 579) **Oksanen**, I., Jokela, J., Fewer, D.P., Wahlsten, M., Rikkinen, J., Sivonen, K. (2004): Discovery of Rare and Highly Toxic Microcystins from Lichen-Associated Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain IO-102-I. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 5756-5763.
- 580) **Olivares**, A., van Drooge, B.L., Casado, M., Prats, E., Serra, M., van der Ven, L.T., Kamstra, J.H., Hamers, T., Hermsen, S., Grimalt, J.O., Piña, B. (2013): Developmental effects of aerosols and coal burning particles in zebrafish embryos. *Environmental Pollution* 178: 72-79.
- 581) **Oliver**, A.E., Leprince, O., Wolkers, W.F., Hinch, D.K., Heyer, A.G., Crowe, J.H. (2001): Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* 43: 151-167.
- 582) **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.
- 583) **Orčić**, D.Z., Francisković, M.M., Bekvalac, K.J., Svričev, E.Đ., Beara, I.N., Lesjak, M.M., Mimica-Dukić, N.M. (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.
- 584) **Ordog**, V. (1999): Beneficial effects of microalgae and cyanobacteria in plant soil-system with special regard to their auxin- and cytokinin-like activity. In: International Workshop and Training Course in Microalgal Biology and Biotechnology, Moson-magyaróvár, Hungary, pp. 43-44.

- 585) Ördörög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancirova, M., Strnad, M., van Staden, J., Szigeti, J., Nemeth, L. (2004): Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology* 16: 309–314.
- 586) Oren, A. (2014): Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. In Sharma, N. K., A. K. Rai & L. Stal (eds) *Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. Wiley, New York: 3–20.
- 587) Oren, A., Garrity, G.M. (2014): Proposal to change general consideration 5 and principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 309–310.
- 588) Ortiz-Rodríguez, R., Wiegand, C. (2010): Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress. *Toxicol* 56(8): 1342–1349.
- 589) Osanai, T., Oikawa, A., Iijima, H., Kuwahara, A., Asayama, M., Tanaka, K., Ikeuchi, M., Saito, K., Hirai, M. Y. (2014): Metabolomic analysis reveals rewiring of *Synechocystis* sp. PCC 6803 primary metabolism by *ntcA* overexpression. *Environmental Microbiology* 16(10): 3304–3317.
- 590) Oshima, Y. (1995): Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *The Journal of AOAC INTERNATIONAL* 78(2): 523–532.
- 591) Østensvik, Ø., Skuberg, O.M., Underdak, B., Hormazabal, V. (1998): Antibacterial properties of extracts from selected planktonic cyanobacteria – a comparative study of bacterial bioassays. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1117–1124.
- 592) Otero, A., Vincenzini, M. (2003): Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology* 102(2): 143–152.
- 593) Ouahid, Y., Pérez-Silva, G., Campo, F. F. D. (2005): Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology* 20(3): 235–242.
- 594) Ouellette, A.J., Wilhelm, S.A. (2003): Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1: 359–366.
- 595) Oziol, L., Bouad'cha, N. (2010): First evidence of estrogenic potential of the cyanobacterial heptotoxins the nodularin-R and the microcystin-LR in cultured mammalian cells. *Journal of Hazardous Materials* 174: 610–615.
- 596) Paerl, H.W., Pinckney, J.L. (1996): A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microbial Ecology* 31: 225–247.
- 597) Pajdak-Stos, A., Fialkowska, E., Fyda, J. (2004): Vulnerability of *Nostoc muscorum* Agardh (Cyanophyceae) motile hormogonia to ciliate grazing. *Journal of Phycology* 40: 271–274.
- 598) Palikova, M., Krejci, R., Hilscherova, K., Babica, P., Navratil, S., Kopp, R., et al. (2007): Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 81: 312–8.
- 599) Palińska, K.A., Abed, R.M.M., Wendt, K., Charpy, L., Łotocka, M., Golubic, S. (2012): Opportunistic cyanobacteria in benthic microbial mats of a tropical lagoon, Tikehau atoll, Tuamotu archipelago: minor in natural populations, major in cultures. *Fottea* 12(1): 127–140.
- 600) Palinska, K.A., Surosz, W. (2014): Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia* 740(1): 1–11.
- 601) Pan, H., Song, L., Liu, Y., Börner, T. (2002): Detection of hepato-toxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both cul-ture and environmental samples. *Archives of Microbiology* 178: 421–27.
- 602) Pandey, U., Pandey, J. (2008): Enhanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus*. *Bioresource Technology* 99: 4520–4523.
- 603) Panikov, N.S. (1999): Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global change. *Applied Soil Ecology* 11: 161–176.
- 604) Parikh, A., Madamwar, D. (2006): Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology* 97: 1822–1827.
- 605) Park, A., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1992): Fischerindole L, a new isonitrile from the terrestrial bluegreen alga *Fischerella muscicola*. *Tetrahedron Letters* 33: 3257–60.
- 606) Park, Y.-K., Rasmussen, H.E., Ehlers, S.J., Blobaum, K.R., Lu, F., Schlegel, V.L., Carr, T.P., Lee, J.-Y. (2008): Repression of proinflammatory gene expression by lipid extract of *Nostoc commune* var *sphaeroides* Kützing, a blue-green alga, via inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages. *Nutrition Research* 28: 83–91.
- 607) Parnig, C., Seng, W.L., Semino, C., McGrath, P. (2002): Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *ASSAY and Drug Development Technologies* 1: 41–47.
- 608) Parwani, L., Bhatnagar, M., Bhatnagar, A., Sharma, V. (2014): Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing. *Journal of Applied Phycology* 26: 1473–1482.
- 609) Pattanaik, B., Schumann, R., Karsten, U. (2007): Effects of ultraviolet radiation of cyanobacteria and their protective mechanisms. In: Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology (SECKBACH, J., Edit.) *Extremophilic and Enigmatic Algae and Non-Photosynthetic Protists*, pp. 31–45.
- 610) Patterson, G.M.L., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Karuso, H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D., Tuang, G.D. (1991): Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *The Journal of Phycology* 27: 530–536.
- 611) Patterson, G.M.L., Carmeli, S. (1992): Biological effect of tolytoxin (6-hydroxy-7-o-methyl-scytophycin b) a potent bioactive metabolite from cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 157: 406–410.



- 612) **Patterson**, G.M.L., Baker, K.K., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D., Tuang, G.D., Boyd, M.R., Cardellina, J.H., Collins, R.P., Gustafson, K.R., Snader, K.M., Weislow, O.S., Lewin, R.A. (1993): Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *Journal of Phycology* 29: 125–130.
- 613) **Patterson**, G.M.L., Smith, C.D., Kimura, L.H., Britton, B.A., Carmeli, S. (1993): Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motil Cytoskeleton* 24: 39–48.
- 614) **Patterson**, G.M.L., Larsen, L.K., Moore, R.E. (1994): Bioactive natural products from blue-green algae. *Journal of Applied Phycology* 6: 151–157.
- 615) **Pejin**, D. (2003): Industrijska mikrobiologija. Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Novi Sad, 335 str.
- 616) **Pereira**, S., Zille, A., Micheletti, E., Morades-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P. (2009): Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews* 33(5): 917–941.
- 617) **Pérez Gutiérrez**, R., Martínez Flores, A., Vargas Solís, R., Carmona Jimenez, J. (2008): Two new antibacterial norabietane diterpenoids from cyanobacteria, *Microcoleus lacustris*. *Journal of Natural Medicines* 62: 328–31.
- 618) **Perez-Garcia**, O., Escalante, F., de-Bashan, L., Bashan, Y. (2011): Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45: 11–36.
- 619) **Perfettini**, J.L., Kroemer, R.T., Kroemer, G. (2004): Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nature Cell Biology* 6: 386–388.
- 620) **Petrović**, O., Knežević, P., Simeunović, J. (2007): Mikrobiologija: skripta za studentne biologije. Novi Sad, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, 264 str. ISBN 978-86-7031-083-4.
- 621) **Petschow**, B.W., Batema, R.P., Ford, L.L. (1996): Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 302–306.
- 622) **Pflugmacher**, S. (2002): Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology* 17: 407–413.
- 623) **Philippis**, R.D., **Vincenzini**, M. (1998): Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 151–175.
- 624) **Pietsch**, C., Wiegand, C., Amé, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S. (2001): The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology* 16(6): 535–542.
- 625) **Piñero Estrada**, J.E., Bermejo Bescós, P., Villar del Fresno, A.M. (2001): Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *II Farmaco* 56: 497–500.
- 626) **Pinkart**, H.G., Ringelberg, D.B., Piceno, Y.M., MacNaughton, S.J., White, D.C. (2002): Biochemical approaches to biomass measurements and community structure, In: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*, second edition. American Society for Microbiology Press, Washington DC, pp. 101–113.
- 627) **Pires**, L.M., Sarpe, D., Brehm, M., Ibelings, B.W. (2011): Potential synergistic effects of microcystins and bacterial lipopolysaccharides on life history traits of *Daphnia galeata* raised on low and high food levels. *Aquatic Toxicology* 104 (3–4): 230–242.
- 628) **Plavsic**, M., Terzic, S., Ahel, M. Van Den Berg, C.M.G. (2004): Folic acid in coastal waters of the Adriatic Sea. *Marine Freshwater Research* 53: 1245–1252.
- 629) **Plaza**, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G.G.B., Herrero, M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. (2010): Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 450–455.
- 630) **Ploutno**, A., **Carmeli**, S. (2000): Nostocyclone A, a novel antimicrobial cyclophane from the cyanobacterium *Nostoc* sp.. *Journal of Natural Products* 63: 1524–1526.
- 631) **Pluis**, J.L.A. (1994): Algal crust formation in the inland dune area, Laarder Wasmeer, the Netherland. *Vegetatio* 113: 41–51.
- 632) **Poliquin**, K., Ershov, Y.V., Cunningham, F.X. Jr., Woreta, T.T., Gantt, R.R., Gantt, E. (2004): Inactivation of sll1556 in *Synechocystis* strain PCC 6803 impairs isoprenoid biosynthesis from pentose phosphate cycle substrate *in vitro*. *Journal of Bacteriology* 186: 4685–4693.
- 633) **Poon**, K.F., Lam, M.H., Lam, P.K., Wong, B.S. (2001): Determination of microcystins in cyanobacterial blooms by solid-phase microextraction high-performance liquid chromatography. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(8): 1648–1655.
- 634) **Potts**, M., Olie, J.J., Nickels, J.S., Parsons, J., White, D.C. (1987): Variations in phospholipid ester-linked fatty acids and carotenoids of desiccated *Nostoc commune* (cyanobacteria) from different geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 4–9.
- 635) **Potts**, M. (1994): Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* 58: 755–805.
- 636) **Potts**, M. (1999): Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 319–328.
- 637) **Potts**, M. (2000): The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, in: B.A. Whitton, M. Potts (Eds.), pp. 465–504.
- 638) **Potts**, M. (2001): Desiccation tolerance: a simple process?. *Trends in Microbiology* 9: 553–559.
- 639) **Pradhan**, S., **Rai**, L.C. (2000): Optimization of flow rate, initial metal ion concentration and biomass density for maximum removal of Cu<sup>2+</sup> by immobilized *Microcystis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 579–584.

- 640) Prakash, J.W., Johnson Marimuthu Antonisamy, Solomon Jeeva (2011): Antimicrobial activity of certain fresh water microalgae from Thamirabarani River, Tamil Nadu, South India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S170-S17.
- 641) Pramanik, A., Sundararaman, M., Das, S., Mukherjee, J. (2011): Isolation and characterization of cyanobacteria possessing antimicrobial activity from the sundarbans, the world's largest tidal mangrove forest. *Journal of Phycology* 47: 731-743.
- 642) Prassana, 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.
- 643) Prasanna, R., Jaiswal, P., Nayak, S., Sood, A., Kaushik, B.D. (2009): Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance. *Indian Journal of Microbiology* 49: 89-97.
- 644) Prinsep, M.R., Thomson, R.A., West, M.L., Wylie, B.L. (1996): Tolypodiol, an antiinflammatory diterpenoid from the cyanobacterium *Tolypothrix nodosa*. *Journal of Natural Products* 59: 786-8.
- 645) Priyadarshini, M., Orosco, L.A., Panula, P.J. (2013): Oxidative Stress and Regulation of *Pink1* in Zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE* 8(11): e81851.
- 646) Puerto, M., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M. (2014): Acute exposure to pure cylindrospermopsin results in oxidative stress and pathological alterations in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology* 29(4): 371-385.
- 647) Pumas, C., Vacharapiyasophon, P., Peerapornpisal, Y., Leelapornpisid, P., Boonchum, W., Ishii, M., Khanongnuch, C. (2011): Thermostability of phycobiliproteins and antioxidant activity from four thermotolerant cyanobacteria. *Phycological Research* 59: 166-174.
- 648) Qi, M., Dang, Y., Xu, Q., Yu, L., Liu, C., Yuan, Y., Wang, J. (2016): Microcystin-LR induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish (*Danio rerio*) larvae by activation of ER stress response. *Chemosphere* 157: 166-173.
- 649) Qian, K. X., Zhu, H. R. & Chen, S. G. (1989): The ecological conditions for *Nostoc flagelliforme* and their analysis. *Acta Phytocol. Geobotan. Sin.* 13: 97-105.
- 650) Radwan, S.S., Al-Hasan, R.H. (2002): Oil pollution and cyanobacteria. In Whitton, B. A. & Potts, M. [Eds.] *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 307-19.
- 651) Rai, L.C., Singh, S., Pradhan, S. (1998): Biotechnological potential of naturally occurring and laboratory grown *Microcystis* in biosorption of Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. *Current Science* 74: 461-463.
- 652) Raja, R., Hemiaswarya, S., Ashok, K.N., Sridhar, S., Rengasamy, R. (2008): A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* 34: 77-88.
- 653) Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. Sivonen, K. (2005): Phylogenetic and morphological evaluation of genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 55: 11-26.
- 654) Rajeev, K.J., Xu, Z. (2004): Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs* 2: 123-146.
- 655) Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitmaa, J., T. Borner, T., Sivonen, K. (2004): Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science* 101: 568-573.
- 656) Rao, L.N., Burns, R.G. (1990): The effect of surface growth of blue-green algae and bryophytes on some microbiological, biochemical and physical soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 9: 239-244.
- 657) Rastogi, R., Sinha, R.P. (2009): Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 27(4): 521-539.
- 658) Raveh, A., Carmeli, S. (2007): Antimicrobial ambigunes from the cyanobacterium *Fischerella sp* collected in Israel. *Journal of Natural Products* 70: 196-201.
- 659) Reddy, K. J., Haskell, J. B., Sherman, D. M. & Sherman, L. A. (1993). Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *Journal of Bacteriology* 175: 1284-1292.
- 660) Reinikainen, M., Hietala, J., Walls, M. (1999): Reproductive allocation in *Daphnia* exposed to toxic cyanobacteria. *Journal of Plankton Research* 21: 1553-1564.
- 661) Reinikainen, M., Meriluoto, J.A.O., Spoof, L., Harada, K. (2001): The toxicities of a polyunsaturated fatty acid and a microcystin to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 16: 444-448.
- 662) Rejmánková, E., Komárek, J., Komárková, J. (2004): Cyanobacteria: A Neglected Component of Biodiversity: Patterns of Species Diversity in Inland Marshes of Northern Belize (Central America). *Diversity and Distributions* 10(3): 189-199.
- 663) Rekolainen, S., Mitikka, S., Vuorenma, J., Johansson, M. (2005): Rapid decline of dissolved nitrogen in Finnish lakes. *Journal of Hydrology* 304: 94-102.
- 664) Reshef, V., Mizrachi, E., Maretzki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A., Carmeli, S. (1997): New acetylated known glycolipids from cyanobacteria with potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *Journal of Natural Products* 60: 1251-1260.
- 665) Řezanka, T., Dor, I., Prell, A., Dembitsky, V.M. (2003): Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. *Folia Microbiologica* 48: 71-75.
- 666) Rhinn, M., Dollé, P. (2012): Retinoic acid signalling during development. *Development* 139: 843-858.
- 667) Richter, J.M., Ishihara, Y., Masuda, T., Whitefield, B.W., Llamas, T., Pohjakallio, A., Baran, P.S. (2008): Enantiospecific total synthesis of the hapalindoles, fischerindoles, and welwitindolinones via a redox economic approach. *Journal of the American Chemical Society* 130(52): 17938-54.

- 668) Rickards, R.W., Rothschild, M.J., Willis, A.C., Chazal, N.M., Kirk, J., Kirk, K., Saliba, J.K., Smith, G.D. (1999): Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* cyanobacteria with potent activity against malaria parasite and human cancer cells. *Tetrahedron* 55: 13513-13520.
- 669) Rippka, R. (1972): Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Archives of Microbiology* 87: 93-98.
- 670) Rippka, R., Waterbury, J. B., Cohen-Bazire, G. (1974): A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Archives of Microbiology* 100: 419-436.
- 671) Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111(1): 1-61.
- 672) Rippka, R. (1988a): Recognition and identification of Cyanobacteria. *Methods in enzymology* 167: 28-67.
- 673) Rippka, R. (1988b): Isolation and purification of Cyanobacteria. *Methods in enzymology* 167: 3-27.
- 674) Robert, A. (2005): Inorganic carbon depletion disrupts photosynthetic acclimation to low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus elongates*. *Journal of Phycology* 41: 322-334.
- 675) Rogers, S.L., Burns, R.G. (1994): Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations, and seedling emergence following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. *Biology and Fertility of Soils* 18: 209-215.
- 676) Rogers, E.D., Henry, T.B., Twiner, M.L., Gouffon, J.S., McPherson, J.T., Boyer, G.L., Sayler, G.S., Wilhelm, S.W. (2011): Global Gene Expression Profiling in Larval Zebrafish Exposed to Microcystin-LR and Microcystis Reveals Endocrine Disrupting Effects of Cyanobacteria. *Environmental Science & Technology* 45(5): 1962-1969.
- 677) Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner, T., Kohl, J.-G. (1999a): Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 737-739.
- 678) Rohrlack, T., Henning, M., Kohl, J.-G. (1999b): Mechanisms of the inhibitory effect of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata*'s ingestion rate. *Journal of Plankton Research* 21: 1489-1500.
- 679) Rohrlack, T., Dittmann, E., Börner, T., Christoffersen, K. (2001): Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3523-3529.
- 680) Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., Börner, T. (2005): Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. *Limnology and Oceanography* 50: 440-448.
- 681) Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K. (2004): Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 686-692.
- 682) Rousk, K., Jones, D.L., DeLuca, T.H. (2013): Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 4: 150.
- 683) Royce, L.A., Liu, P., Stebbins, M.J., Hanson, B.C., Jarboe, L.R. (2013): The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 8317-8327.
- 684) Rozen, A., Arad, H., Schonfeld, M., Tel-Or, E. (1986): Fructose supports glycogen accumulation, heterocysts differentiation, N<sub>2</sub> fixation and growth of the isolated cyanobiont *Anabaena azollae*. *Archives of Microbiology* 145: 187-190.
- 685) Rozen, A., Schonfeld, M., Tel-Or, E. (1988): Fructose-enhanced development and growth of the N<sub>2</sub>-fixing cyanobiont *Anabaena azollae*. *The Zeitschrift für Naturforschung* 43c: 408-412.
- 686) Ruffel, S.E., Müller, K.M., McConkey, B.J. (2016): Comparative assessment of microalgal fatty acids as topical antibiotics. *Journal of Applied Phycology* 28(3): 1695-1704.
- 687) Ruffing, A.M. (2011): Engineered cyanobacteria-Teaching an old bug new tricks. *Bioengineered Bugs* 2(3): 136-149.
- 688) Runnegar, M.T., Gerdes, R.G., Falconer, I.R. (1991): The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol* 29:43-51.
- 689) Sabour, B., Loudiki, M., Oudra, B., Vasconcelos, V., Martins, R., Oubraim, S., Fawzi, B. (2002): Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environmental Toxicology* 17: 24-31.
- 690) Sadler, T., von Elert, E. (2014a): Dietary exposure of *Daphnia* to microcystins: No *in vivo* relevance of biotransformation. *Aquatic Toxicology* 150: 73-82.
- 691) Sadler, T., von Elert, E. (2014b): Physiological interaction of *Daphnia* and *Microcystis* with regard to cyanobacterial secondary metabolites. *Aquatic Toxicology* 156: 96-105.
- 692) Safe, S.H. (1995): Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Pharmacology & Therapeutics* 67(2): 247-281.
- 693) Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., Murata, N. (1994): D9-Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups. *Journal of Biological Chemistry* 269: 25576-25580.
- 694) Sakamoto, T., Yoshida, T., Arima, H., Hatanaka, Y., Takani, Y., Tamaru, Y. (2009): Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycological Research* 57: 66-73.
- 695) Saker, M.L., Vale, M., Kramer, D., Vasconcelos, V.M. (2007): Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 441-449.



- 696) Salerno, A., Deletoile, A., Lefevre, M., Ciznar, I., Krovacek, K., Grimont, P., Brisse, S. (2007): Recombining population structure of *Plesiomonas shigelloides* (Enterobacteriaceae) revealed by multilocus sequence typing. *Journal of Bacteriology* 189: 7808–7818.
- 697) Sallal, A.K., Nimer, N.A., Radwan, S.S. (1990): Lipid and fatty acid composition of freshwater cyanobacteria. *Journal of general microbiology* 136: 2043-2048.
- 698) Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., Kaya, K. (1992): A method for micro-determination of total microcystin content in water blooms of cyanobacteria (blue-green algae). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 49: 163–170.
- 699) Sant'Anna, C.L. (1984): Flora de Cyanophyceae associada a briófitas, município de Campina Verde, MG. *Rickia* 11:129-142.
- 700) Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Kaštovský, J., Komárek, J. (2010): Two form-genera of aerophytic heterocytous cyanobacteria from Brazilian rainy forest Mata Atlântica. *Fottea* 10: 217–228.
- 701) Santoyo, S., Herrero, M., Javier, F., Cifuentes, A., Ibanez, E., Jaime, L. (2006): Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology* 224:75-81.
- 702) Sarnelle, O., Gustafsson, S., Hansson, L.-A. (2010): Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore *Daphnia*. *Journal of Plankton Research* 32(4): 471-477.
- 703) Sato, N. (1993): Biosynthesis of glycolipids in cyanobacteria. *Current Topics in Plant Physiology* 9: 174–182.
- 704) Satoh, K., Hirai, M., Nishio, J., Yamaji, T., Kashino, Y., Koike, H. (2002): Recovery of photosynthetic systems during rewetting is quite rapid in a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc commune*. *Plant Cell Physiology* 43: 170-176.
- 705) Schirrmester, B.E., Antonelli, A., Bagheri, C.H. (2011): The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology* 11: 45.
- 706) Schlegel, I., Doan, N.T., de Chazal, N., Smith, G.D. (1999): Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 10(5): 471–479.
- 707) Schmetterer, G.R. (1990): Sequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters. *Plant Molecular Biology* 14: 697–706.
- 708) Schneider, D., Fuhrmann, E., Scholz, I., Hess, W.R., Graumann, P.L. (2007): Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes. *BMC Cell Biology* 8: 39.
- 709) Scholz, S., Fischer, S., Gundel, U., Kuster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-- applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 394–404.
- 710) Schopf, J.W. (1974a): The development and diversification of the Precambrian life. *Origin of Life* 5: 119-135.
- 711) Schopf, J.W. (1974b): Paleobiology of the Precambrian: the age of the blue-green algae. *Evolutionary Biology* 7: 1-43.
- 712) Schulz, M.E., Scherer, S. (1999): UV protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 329–338.
- 713) Schwarz, R., Lahmi, R., Sendersky, E., Perelman, A., Hagemann, M., Forchhammer, K. (2006): Alanine Dehydrogenase Activity is Adequate Progression of Phycobilisome Degradation during Nitrogen Starvation in *Synechococcus elongates* PCC 7942. *Journal of Bacteriology* 188(14): 5258-5265.
- 714) Schwarz, D., Orf, I., Kopka, J., Hagemann, M. (2013): Recent Applications of Metabolomics Toward Cyanobacteria. *Metabolites* 3(1): 72-100.
- 715) Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickamasinghe, W., Shaw, S. (2007): First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbia wollei* (Fallow ex Gomont) Spezialeand Dick. *Harmful Algae* 6: 73–80.
- 716) Selvin, J., Shanmughapriya, S., Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Rajeetha Ravji, T., Natarajaseenivasan, K., Hema, T. (2009): Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 435–445.
- 717) Seo, P.S., Yokota, A. (2003): The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoCI* and *rpoDI* gene sequences. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49: 191–203.
- 718) Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F. (2008): Peleato ML. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Environmental Microbiology* 10: 2476–2483.
- 719) Shaw, L.J., Burns, R. (2006): Enzyme activity profiles and soil quality. In: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, Cambridge, MA.
- 720) Sheen, J. (1993): Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO Journal* 12: 3497–3505.
- 721) Shimizu, Y. (2003): Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology* 6: 236– 243.
- 722) Sielaff, H., Christiansen, G., Schwecke, T. (2006): Natural products from cyanobacteria: Exploiting a new source for drug discovery. *IDrugs* 9(2): 119-27.
- 723) Silva-Stenico, M.E., Souza, C., Sturion, A., Keiko, T., Etchegaray, A., Possedente, S., Beraldo, L.A., Fatima, M. (2011): Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiol. Res.* 166: 161-175.
- 724) Simeunović, J. (2004): Formiranje i karakterizacija kolekcije kultura cijanobakterija NSCCC. Magistarska teza. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

- 725) Simeunović, J. (2005): Kolekcija kultura cijanobakterija. Zadužbina Andrejević, Beograd, 102 str.
- 726) Simeunović, J. (2009): Ekofiziološke karakteristike potencijalno toksičnih i toksičnih vodenih sojeva cijanobakterija na području Vojvodine. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- 727) Simeunović, J. (2010): Cijanobakterije i cijanotoksini u površinskim vodama Vojvodine. Andrejević K. i Andrejević T.(eds). Beograd, Biblioteka Dissertatio, Zadužbina Andrejević, ISBN: 978-86-7244-903-7.
- 728) Simeunović, J., Marković, S., Kovač, D., Mišan, A., Mandić, A., Svirčev, Z. (2012): Filamentous cyanobacteria from Vojvodina region as source of phycobiliprotein pigments as potential natural colorants. *Food and Feed Research* 39 (1): 23-31.
- 729) 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 (2): 597-607.
- 730) Simmons, T. L., Engene, N., Ureña, L.D., Romero, L.I., Ortega-Barría, E., Gerwick, L., Gerwick, W.H. (2008): Viridamides A and B, lipopeptides with anti-protozoan activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis*. *Journal of Natural Products* 71: 1544–50.
- 731) Singh, A.L., Singh, P.K. (1989): Phosphorus fertilization and the growth and N<sub>2</sub>-fixation of *Azolla* and blue-green algae in rice field. *Indian Journal of Plant Physiology* 33: 21-26.
- 732) Singh, S., Singh, R.P. (2008): In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International* 24: 392–415.
- 733) Singh, J.S., Pandey, V.C., Singh, D.P. (2011): Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140: 339-353.
- 734) Singh, S.P., Rastogi, R.P., Häder, D.-P., Sinha, R.P. (2011): An improved method for genomic DNA extraction from cyanobacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27: 1225–1230.
- 735) Singh, S.S., Montgomery, B.L. (2011): Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology* 19(6): 278-285.
- 736) Singh, S., Srivastava, A., Oh, H.-M., Ahn, C.-Y., Choi, G.-G., Asthana, R.K. (2012): Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. *Toxicon* 60(5): 878-94.
- 737) Singh, N.K., Parmar, A., Sonani, R.R., Madamwar, D. (2012): Isolation, identification and characterization of novel thermotolerant *Oscillatoria* sp. N9DM: Change in pigmentation profile in response to temperature. *Process Biochemistry* 47: 2472–2479.
- 738) Sinha, R.P., Kumar, A., Tyagi, M.B., Hader, D.-P. (2005): Ultraviolet-B-induced Destruction of Phycobiliproteins in Cyanobacteria. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 11(2): 313-319.
- 739) Sivonen, K., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Dahlem, A.M., Niemelä, S.I. (1990): Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2650–2657.
- 740) Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Färdig, M., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. (1992): Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc* sp. strain 152. *Chemical Research in Toxicology* 5: 464–469.
- 741) Sivonen, K. (1996): Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35: 12-24.
- 742) Sivonen, K., Jones, G. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management, eds Chorus I, Bartram J (E & FN Spon, London), pp 41-111.
- 743) Sivonen, K. (2008): Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: state of the science and research needs. Chapter 24. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 619: 547–566.
- 744) Sivonen, K. (2009): The Encyclopedia of Microbiology, ed Schaechter M (Academic, Oxford), 3rd Ed, pp 290-307.
- 745) Skulberg, O.M. (2000): Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12: 341–348.
- 746) Smith, C.D., Zhang, X.Q., Moorbery, S.L., Patterson, G.M.L., Moore, R.E. (1994): Cryptophycin-A new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Research* 54: 3779-3784.
- 747) Smith, G., Thanh Doan, N. (1999): Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *Journal of Applied Phycology* 11: 337–344.
- 748) Smitka, T.A., Bonjouklian, R., Doolin, L., Jones, N.D., Deeter, J.B., Yoshida, W.Y., Prinsep, M.R., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. (1992): Ambiguine isonitriles, fungicidal hapalindole-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the *Stigonemataceae*. *Journal of Organic Chemistry* 57: 857–61.
- 749) 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.
- 750) Soares, M.C.S., Rocha, M.IdA., Marinho, M.M., Azevedo, S.M.F.O., Branco, C.W.C., Huszar, V.L.M. (2009): Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquatic Microbial Ecology* 57: 137–149.
- 751) Soltani, N., Khavari-Nejas, R.A., Yazdi, M.T., Shokravi, S. (2007): Growth and some metabolic features of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 in different combined nitrogen sources. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 18: 123-128.

- 752) **Soni, B.**, Trivedi, U., Madamwar, D. (2008): A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technology* 99: 188-194.
- 753) **Sotero-Santos, R.B.**, De Souza E. Silva, C.R., Verani, N.F., Nonaka, K.O., Rocha, O. (2006): Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(2): 163-170.
- 754) **Sotton, B.**, Domaizon, I., Anneville, O., Cattaneo, F., Guillard, J. (2015): Nodularin and cylindrospermopsin: a review of their effects on fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 25: 1-19.
- 755) **Spolaore, P.**, Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006): Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-86.
- 756) **Spoof, L.**, Karlsson, K., Meriluoto, J. (2001): Highperformance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins on C18 and amide C16 sorbents. *Journal of Chromatography A* 909(2): 225-236.
- 757) **Spoof, L., Catherine, A.** (2016): Tables of Microcystins and Nodularins. In Meriluoto, J. Spoof, L. & G. A. Codd (eds) Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 526-537.
- 758) **Stackebrandt, E., Goebel, B.M.** (1994): Taxonomic note: a for place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.
- 759) **Stal, L.J., Moezelaar, R.** (1997): Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 179-211.
- 760) **Stal, L.J.** (2000): Cyanobacterial mats and stromatolites. In: Whitton, B.A., Potts, M. (eds). The ecology of cyanobacteria. Kluwer, Dordrecht, pp. 61-120.
- 761) **Stal, L.J.** (2007): Cyanobacteria: Diversity and versatility, Clues to Life in Extreme Environments. In J. Seckbach (Ed.), Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments. (pp. 659-680). Dordrecht: Springer.
- 762) **Stanier, R.Y., Siström, W.R., Hansen, T.A., Whitton, B.A., Castenholz, R.W., Pfennig, N., Gorlenko, V.N., Kondratieva, E.N., Eimhjellen, K.E., Whittenbury, R., Gherna, R.L., Trüper, H.G.** (1978): Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28: 335-336.
- 763) **Stapleton, S., Jaworski, J. G.** (1984): Characterization of fatty acid biosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 794(2): 249-255.
- 764) **Stapleton, S.R., Jaworski, J.G.** (1984): Characterization and purification of malonylcoenzyme A:[acyl-carrierprotein] transacylases from spinach and *Anabaena variabilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 794: 240-248.
- 765) **Starks, T.L., Shubert, L.E., Trainor, F.R.** (1981): Ecology of soil algae: a review. *Phycologia* 20: 65-80.
- 766) **Starmach, K.** (1966): Cyanophyta, Sinice. Flora Slodkowodna Polski, Vol. 2. Polska Akademia Nauk, Warszawa: 1-753.
- 767) **Štěpánková, T., Ambrožová, L., Blahá, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K.** (2011): *In vitro* modulation of intracellular receptor signaling and cytotoxicity induced by extracts of cyanobacteria, complex water blooms and their fractions. *Aquatic Toxicology* 105: 497-507.
- 768) **Stratmann, K., Moore, R.E., Bonjouklian, R., Deeter, J.B., Patterson, G.M.L., Shaffer, S., Smith, C.D., Smitka, T.A.** (1994): Welwitindolinones, unusual alkaloids from the blue-green algae *Hapalosiphon welwitschii* and *Westiella intricata*. Relationship to fischerindoles and hapalinodoles. *Journal of the American Chemical Society* 116: 9935-42.
- 769) **Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., Barry, H.** (2004): Saxitoxin blocks L-Type ICa. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308: 324-329.
- 770) **Sukenik, A., Reisner, M., Carmeli, S., and Werman, M.** (2006): Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Longterm exposure to low doses. *Environmental Toxicology* 21:575-582.
- 771) **Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Gladyshev, M.I., Volova, T.G.** (2003): A temperature dependence of the intra- and extracellular fatty acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (3): 420-427.
- 772) **Svirčev, Z.** (1992): Morfološka i ekofiziološka svojstva azotofiksirajućih filamentoznih zemljišnih cijanobakterija i mogućnost primene kao biofertilizatora. Novi Sad, PMF, Univerzitet u Novom Sadu.
- 773) **Svirčev, Z.** (2005): Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 215 str.
- 774) **Svirčev, Z., Mikov-Miladinov, M., Simeunović, J., Vidović, M., Matavulj, M., Petrović, D., Radojčić, B., Stojanović, D.** (2006): PLC epidemiological studies in Central Serbia potentially connected with cyanobacterial blooms in drinking water suppliers. Proc. Int. Conf. Danubius Pannonico Mysicus - Space of Challenges, Novi Sad. 38-39.
- 775) **Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Vidović, M.** (2007): Freshwater cyanobacterial blooms and cyanotoxin production in Serbia in the past 25 years. *Geographica Pannonica* 11: 12-21.
- 776) **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(10): 941-947.
- 777) **Svirčev, Z., Krstić, S., Miladinov-Mikov, M., Baltić, V., Vidović, M.** (2009): Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 27: 36-55.
- 778) **Svirčev, Z., Baltić, V., Simeunović, J.** (2011): Cvetanje cijanobakterija u Srbiji-putevi ekspozicije, zdravstveni i zakonodavni aspekti. 16. Studenička akademija, Novi Sad, 88 str.

- 779) Svirčev, Z., Marković, S.B., Stevens, T., Smalley, I.J., Hambach, U., Obrecht, I., Lukić, T., Vasiljevic, D.A. (2013): Importance of Biological Loess Crusts for Loess Formation in Semi-Arid Environments. *Quaternary International* 296: 206-215.
- 780) Svirčev, Z., Simeunović, J., Subakov-Simić, G., Krstić, S., Pantelić, D., Dulić, T. (2013): Cyanobacterial blooms and their toxicity in Vojvodina lakes, Serbia. *International Journal of Environmental Health Research* 7: 745-758.
- 781) Svirčev, Z., Tokodi, N., Drobac, D., Codd, G.A. (2014): Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. *Systematics and Biodiversity* 12(3): 261-270.
- 782) Swingle, W.D., Blankenship, R.E., Raymond, J. (2008): Integrating markov clustering and molecular phylogenetics to reconstruct the cyanobacterial species tree from conserved protein families. *Molecular and Biological Evolution* 25: 643–654.
- 783) Sychrová, E., Stepankova, T., Novakova, K., Blaha, L., Giesy, J.P., Hilscherova, K. (2012): Estrogenic activity in extracts and exudates of cyanobacteria and green algae. *Environment International* 39: 134–140.
- 784) Szlag, D., Sinclair, J., Southwell, B., Westrick, J. (2015): Cyanobacteria and Cyanotoxins Occurrence and Removal from five High-risk conventional Treatment drinking water plants. *Toxins* 7: 2198-2220.
- 785) Tabatabai, M.A., Dick, W.A. (2002): Enzymes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 567–596.
- 786) Takeda, S., Mano, S., Ohto, M., and Nakamura, N. (1994): Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiology* 106: 567–574.
- 787) Takenaka, H., Yamaguchi, Y., Dakaki, S., Watara, K., Tanaka, N., Morinaga, T. (1998): Safety Evaluation of *Nostoc flagelliforme* (Nostocales, Cyanophyceae) as a potential food. *Food and Chemical Toxicology* 36: 1073-1077.
- 788) Tamagnini, P., Leitao, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D. J., Heidorn, T., Lindblad, P. (2007): Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 692– 720.
- 789) Tamary, E., Kiss, V., Nevo, R., Adam, Z., Bernát, G., Rexroth, S., Rögner, M., Reich, Z. (2012): Structural and functional alternations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 319-327.
- 790) Tamaš, I., Svirčev, Z., Andersson, S.G. (2000): Determinative value of a portion of the nifH sequence for the genera *Nostoc* and *Anabaena* (cyanobacteria). *Current Microbiology* 41(3): 197-200.
- 791) Tan, L.T. (2007): Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* 68: 954–979.
- 792) Tan, L.T. (2012): Marine cyanobacteria: a treasure trove of bioactive secondary metabolites for drug discovery. *Studies in Natural Products Chemistry* 36: 67–110.
- 793) Tan, L.T. (2013): Pharmaceutical agents from filamentous marine cyanobacteria. *Drug Discovery Today* Volume 18, Numbers 17/18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.010>
- 794) Tanabe, Y., Kasai, F., Watanabe, M.M. (2007): Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology* 153: 3695–3703.
- 795) Tandeau de Marsac, N., Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, R., Houmar, J. (1996): Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology* 142: 611-622.
- 796) Tarczynska, M., Nalecz-Jawecki, G., Romanowska-Duda, Z., Sawicki, J., Beattie, K., Codd, G.A., Zalewski, M. (2001): Tests for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples. *Environmental Toxicology* 16: 383-390.
- 797) Tassara, C., Zaccaro, M.C., Storni, M.M., Palma, M., Zulpa, G. (2008): Biological control of lettuce white mold with cyanobacteria. *International Journal of Agriculture and Biology* 10: 487-492.
- 798) Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R., Wilmotte, A. (2003): Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5157–5169.
- 799) Tedesco, M.A., Duerr, E.O. (1989): Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology* 1: 201–209.
- 800) Temina, M., Rezanokovab, H., Rezanokac, T., Dembitsky, V. M. (2007): Diversity of the fatty acids of the *Nostoc* species and their statistical analysis. *Microbiological Research* 162: 308–321.
- 801) Teneva, I., Asparuhova, D., Dzambazov, B., Mladenov, R., Schirmer, K. (2003): The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aeruginocoerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environmental Toxicology* 18: 9-20.
- 802) Teoh, M.-L., Chu, W.-L., Marchant, H., Phang, S.-M. (2004): Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *Journal of Applied Phycology* 16: 421–430.
- 803) Teraoka, H., Dong, W., Hiruga, T. (2003): Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenital Anomalies* 43: 123– 132.
- 804) Terauchi, K., Kondo, T. (2008): The cyanobacterial Circadian Clock and the KaiC Phosphorylation cycle. In: Herrero, A., Flores, E. (Eds.), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 199-215.
- 805) Thajuddin, N., Subramanian, G. (2005): Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 89: 47-57.
- 806) Thomazeau, S., Houdan-Fourmont, A., Coute, A., Duval, C. (2010): The contribution of Sub-Saharan African strains to the phylogeny of cyanobacteria: focusing on the *Nostocaceae* (Nostocales, Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 46: 564–579.



- 807) Thuret, G.** (1875): Essai de classification des Nostochinées. *Annales des Sciences Naturelles (Botanique)* 6: 372–382.
- 808) Tillett, D. et al.** (2000): Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: An integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 7: 753-764.
- 809) Timme-Laragy, A.R., Van Tiem, L.A., Linney, E.A., Di Giulio, R.T.** (2009): Antioxidant Responses and NRF2 in Synergistic Developmental Toxicity of PAHs in Zebrafish. *Toxicological Sciences* 109(2): 217-227.
- 810) Tirkey, J., Adhikary, S.P.** (2006): Blue green algae in the biological soil crusts of different regions of India. *Feddes Repertor* 117: 280–306.
- 811) Tisdale, J.M., Oades, J.M.** (1982): Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science* 33: 141–163.
- 812) Tokodi, N.** (2016): Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-Matematički Fakultet, str. 267.
- 813) Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C.M., Ohno, T.** (2006): The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 103: 5442–7.
- 814) Tooming-Klunderud, A., Fewer, D.P., Rohrlack, T., Jokela, J., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Kristensen, T., Jakobsen, K.S.** (2008): Evidence for positive selection acting on microcystin synthetase adenylation domains in three cyanobacterial genera. *BMC Evolutionary Biology* 8: 256.
- 815) Törökné, A.K., László, E., Chorus, I., Sivonen, K., Barbosa, F.A.R.** (2000): Cyanobacterial toxins detected by Thamnotoxkit: a double blind experiment. *Environmental Toxicology* 15: 549-553.
- 816) Trias, J., Gordon, E.M.** (1997): Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 757–762.
- 817) Trubetskova, I.L., Haney, J.F.** (2006): Effects of differing concentrations of microcystin-producing *Microcystis aeruginosa* on growth, reproduction, survivorship and offspring of *Daphnia magna*. *Archiv für Hydrobiologie* 167 (1–4): 533-546
- 818) Tseng, C.K.** (2001): Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology* 13: 375-380.
- 819) Turicchia, S., Ventura, S., Komárková, J., Komárek, J.** (2009): Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 2. Molecular and phenotype diversity of oscillatorialean genera. *Nova Hedwigia* 89: 165–200.
- 820) Ughyt, B., Ajlani, G.** (2004): Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Microbiology* 150: 4147-4156.
- 821) Utkilen, H., Gjolme, N.** (1995): Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2): 797–800.
- 822) Vaishampayan, A., Sinha, R.P., Hader, D.P., Dey, T., Gupta, A.K., Bhan, U., Rao, A.L.** (2001): Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *Botanical Review* 67: 453-516.
- 823) Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokolke, L., Sivonen, K.** (2003): Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12): 7289-7297.
- 824) Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., Tenreiro, R.** (2009): Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* 155(2): 642–656.
- 825) Valiente, E.F., Nieva, M., Avendano, M.C., Maeso, E.S.** (1992): *Plant Cell Physiology* 33: 307-313.
- 826) Van Baalam, C., Pulish, W.** (1973): Heterotrophic growth of the microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* 2: 229–254.
- 827) van Apeldoorn, M.E.; van Egmond, H.P.; Speijers, G.J.A.; Bakker, G.J.I.** (2007): Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research* 51: 7–60.
- 828) Vargas, M.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J. et al.** (1998): Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of Phycology* 34: 812-817.
- 829) Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.S.** (2011): It is time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Letters* 585(10): 1485-1494.
- 830) Venkataraman, G.S.** (1993): Blue-green algae (cyanobacteria). In: Tata, S.N., Wadhvani, A.M., Mehdi, M.S. (Eds.). Biological Nitrogen Fixation. Indian Council of Agriculture Research, New Delhi, pp. 45-76.
- 831) Verma, S.K., Singh, S.P.** (1995): Multiple metal resistance in the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *The Bulletin of Environmental Contamination* 54: 614-619.
- 832) Vermaas, W.F.J.** (2001): Photosynthesis and respiration in cyanobacteria, pp. 245–251. In Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, United Kingdom.
- 833) Vermaas, W.F.J.** (2004): Target Genetic Modification of Cyanobacteria: New Biotechnological Applications. in Handbook of Microalgal Culture, ed. Richmond A (Blackwell Science, Oxford), pp. 457–470.
- 834) Vincent, W.F.** (2000): Cyanobacterial dominance in the polar regions. In: Whitton BA, Potts M (eds) The ecology of cyanobacteria. Kluwer, Dordrecht, pp. 321–340.
- 835) Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G.W., Geisler, R., Schirmer, K., Scholz, S.** (2007): Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology* 81: 355-364.

- 836) Volk, R.B., Venzke, K., Blaschek, W. (2007):** Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal of Applied Phycology* 19: 255–262.
- 837) Vonshak, A., Cheung, S.M., Chen, F. (2000):** Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology* 36: 675–679.
- 838) Wai, H.H., Va, L., Oakes, M., Nomura, M. (2000):** Complete detection of yeast rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: Use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. *Nucleic Acid Review* 28: 3524.
- 839) Walton, K., Gantar, M., Gibbs, P.D.L., Schmale, M.C., Berry, J.P. (2014):** Indole Alkaloids from *Fischerella* Inhibit Vertebrate Development in the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model. *Toxins* 6(12): 3568–3581.
- 840) Wan, N., Abernathy, M., Kuo-Hsiang Tang, J., Tang, Y.J., You, L. (2015):** Cyanobacterial photo-driven mixotrophic metabolism and its advantages for biosynthesis. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 9(3): 308–316.
- 841) Wang, J., Salata, J.J., Bennett, P.B. (2003):** Saxitoxin is a Gating Modifier of hERG K<sub>p</sub> channels. *Journal of General Physiology* 121: 583–598.
- 842) Wang, P.J., Chien, M.S., Wu, F.J., Chou, H.N., Lee, S.J. (2005):** Inhibition of embryonic development by microcystins-LR in zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicol* 45: 303–308.
- 843) Warren, S.D. (2001):** Synopsis: Influence of biological soil crusts on arid land hydrology and soil stability. In J. Belnap, & O. L. Lange (Eds.), *Biological soil crusts: Structure, function, and management*. Ecological Studies. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, Vol. 150 pp. 349–360.
- 844) Waterbury, J.B., Stanier, R.Y. (1977):** Two unicellular cyanobacteria which reproduce by budding. *Archives of Microbiology* 115: 249–257.
- 845) Weigt, S., Huebler, N., Braunbeck, T., von Landenberg, F., Broschard, T.H. (2010):** Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish *Danio rerio* embryos. *Toxicology* 275: 36–49.
- 846) Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., van Döhren, H. (2002):** Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology* 17(4): 367–374.
- 847) Welker, M., von Döhren, H. (2006):** Cyanobacterial peptides-Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 530–563.
- 848) Whitton, B.A., Potts, M. (2000):** Introduction to the cyanobacteria, in: B.A. Whitton, M. Potts (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1–11.
- 849) Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. (1999):** Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 14: 89–95.
- 850) Williams, P.G. (2009):** Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology* 27: 45–52.
- 851) Wilmotte, A., Herdman, M. (2001):** Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In Garrity, G. M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 487–493.
- 852) Wilson, A.E., Hay, M.E. (2007):** A direct test of cyanobacterial chemical defense: variable effects of microcystin-treated food on two *Daphnia pulex* clones. *Limnology and Oceanography* 52: 1467–1479.
- 853) Wolfe-Simon, F., Grzebyk, D., Schofiel, O., Falkowski, P., G. (2005):** The role and evolution of superoxide dismutases in algae. *Journal of Phycology* 41: 453–465.
- 854) Wong, F.C.Y., Meeks, J.C. (2002):** Establishment of a functional symbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation. *Microbiology* 148: 315–323.
- 855) Wormer, L., Carrasco, D., Cirés, S., Quesada, A. (2009):** Advances in solid phase extraction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Limnology and Oceanography:Methods* 7: 568–575.
- 856) Wright, D., Prickett, T., Helm, R.F., Potts, M. (2001):** Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1839–1852.
- 857) Wright, D.J., Smith, S.C., Joardar, V., Scherer, S., Jervis, J., Warren, A., Helm, R.F., Potts, M. (2005):** UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (cyanobacteria). *The Journal of Biological Chemistry* 280: 40271–40281.
- 858) Wu, X., Zarka, A., Boussiba, S. (2000):** A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 385–392.
- 859) Wu, H., Gao, K., Villafane, V., E., Watanabe, T., Helbling, E., W. (2005):** Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5004–5013.
- 860) Wu, X., Jiang, J., Wan, Y., Giesy, J.P., Hu, J. (2012):** Cyanobacteria blooms produce teratogenic retinoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 9477–9482.
- 861) Wu, X., Jiang, J., Hu, J. (2013):** Determination and occurrence of retinoids in a eutrophic lake (Taihu Lake, China): Cyanobacteria blooms produce teratogenic retinal. *Environmental Science & Technology* 47: 807–814.
- 862) Xie, Z., Wang, Y., Liu, Y., Liu, Y. (2009):** Ultraviolet-B exposure induces photo-oxidative damage and subsequent repair strategies in a desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus* Gom.. *European Journal of Soil Biology* 45: 377–382.



- 863) Xie, L., Yan, W., Li, J., Yu, L., Wang, J., Li, G., Chen, N., Steinman, A.D. (2015): Microcystin-RR exposure results in growth impairment by disrupting thyroid endocrine in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 164: 16–22.
- 864) Xing, Y., Xu, Y., Chen, Y., Jeffrey, P.D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J.B., Shi, Y. (2006): Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* 127: 341–353.
- 865) Xiong, Q., Xie, P., Li, Y., Hao, L., Li, G., Qiu, T., Liu, Y. (2009): Involvement of Fas/FasL system in apoptotic signaling in testicular germ cells of male Wistar rats injected i.v. with microcystins. *Toxicol* 54: 1–7.
- 866) Yan, R., Zhu, D., Zhang, Z., Zeng, Q., Chu, J. (2012): Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC 7942 under mixotrophic conditions: Comparison with photoautotrophic condition. *Journal of Applied Phycology* 24(4): 657–668.
- 867) Yan, W., Zhou, Y., Yang, J., Li, S., Hu, D., Wang, J., Chen, J. (2012): Waterborne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere* 87(11): 1301–1307.
- 868) Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. (2002): Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from  $^{13}\text{C}$ -labeled glucose. *Metabolic Engineering* 4: 202–216.
- 869) Yang, L., Ho, N.Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F., Strähle, U. (2009): Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology* 28: 245–253.
- 870) Yap, C.Y., Chen, F. (2001): Polyunsaturated fatty acids: biological significance, biosynthesis and production by microalgae and microalgae-like organisms. In: Chen, F., Jiang, Y., editors. *Algae and their Biotechnological Potential*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 1–32.
- 871) Yee, N., Benning, L.G., Phoenix, V.R., Ferris, F.G. (2004): Characterization of metal-cyanobacteria sorption reactions: a combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation. *Environmental Science & Technology* 38: 775–782.
- 872) Yoshida, M., Yoshida, T., Satomi, M., Takashima, Y., Hosoda, N., Hiroishi, S. (2008): Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *Journal of Applied Microbiology* 105(2):407–15.
- 873) Yoshida, T., Sakamoto, T. (2009): Water-stress induced trehalose accumulation and control of trehalase in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* IAM M-15. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 135–145.
- 874) Young, J.P.W. (1992): Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J., eds. *Biological nitrogen fixation*. New York, NY, USA: Chapman and Hall, pp. 43–86.
- 875) Young, J.D., Shastri, A.A., Sephanopoulos, G., Morgan, J.A. (2011): Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary  $^{13}\text{C}$  flux analysis. *Metabolic Engineering* 13(6): 656–665.
- 876) Yu, H.F., Jia, S.R., Dai, Y.J. (2009): Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology* 21: 127–133.
- 877) Yu, H. F., Jia, S. R., Dai, Y. J. (2010): Accumulation of exopolysaccharides in liquid suspension culture of *Nostoc flagelliforme* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(2): 552–560.
- 878) Yu, H.F. (2012): Effect of mixed carbon substrate on exopolysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology* 24: 669–673.
- 879) Yuen, G.Y., Craig, L.M., Kerr, E.D., Steadman, J.R. (1994): Influences of antagonist population levels, blossom development stage and canopy temperature on the inhibition of the *Sclerotinia sclerotiorum* on dry edible bean by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 84: 495–501.
- 880) Zackrisson, O., DeLuca, T.H., Nilsson, M.-C., Sellstedt, A., Berglund, L.M. (2004): Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology* 85: 3327–3334.
- 881) Zancan, S., Trevisan, R., Paoletti, M.G. (2006): Soil algae composition under different agro-ecosystems in North-Eastern Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112: 1–12.
- 882) Zpomělová, E., Hisem, D., Řeháková, K., Hrouzek, P., Jezberová, J., Komárková, J., Korelusová, J., Znachor, P. (2008): Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis/A. crassa* complex (cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* 30(11): 1257–1269.
- 883) Zehr, J.P., Carpenter, E.J., Villareal, T.A. (2000): New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. *Trends in Microbiology* 8(2): 68–73.
- 884) Žegura, B., Straser, A., Filipič, M. (2011): Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation research* 727(1–2): 16–41.
- 885) Žegura, B. (2017): Genotoxic activity of cyanotoxins: the evidence from *in vitro* studies. The book of abstracts of Workshop Cyanotoxins – toxicity, health and environmental impact, July, 13–14, 2017, Novi Sad, Serbia, pp. 22.
- 886) Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G. (2014): The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 149: 25–32.
- 887) Zhang, X., Xie, P., Li, D., Shi, Z. (2008): Haematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia. *Toxicol* 49: 1150–1157.
- 888) Zhao, Y., Xiong, Q., Xie, P. (2011): Analysis of MicroRNA Expression in Embryonic Developmental Toxicity Induced by MC-RR. *PLoS One* 6(7): e22676.
- 889) Zulpa, G., Zaccaro, M.C., Boccazzi, F., Parada, J.L., Storni, M. (2003): Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on „wood blue stain“ fungi. *Biological control* 27: 345–348.
- 890) <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/how-microbes-grow/>

- 891) <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/lehtimaki/ch1.htm>
- 892) <http://www.orgsyn.org/Content/pdfs/procedures/v89p0394.pdf>
- 893) <https://www.google.rs/maps/@43.9853856,19.3422938,7z?hl=en>
- 894) <http://www.npfruskagora.co.rs/pages/galerija6.htm>
- 895) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- 896) <http://www.cyanomyces.com>
- 897) [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/2012-07-09\\_Draft\\_FET\\_TG\\_v8\\_FINAL.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/2012-07-09_Draft_FET_TG_v8_FINAL.pdf)
- 898) <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-06/documents/anatoxin-a-report-2015.pdf>



## 7. PRILOZI

## Prilog 1.

Klasifikacija cijanobakterija na osnovu kombinovanog pristupa predložena od strane Komárek (2014)

Taxon	status	Taxon	status
<i>Gloeobacterales</i>		<i>Acaryochloridaceae</i>	
<i>Gloeobacteraceae</i>		<i>Acaryochloris</i> Miyashita et Chihara 2003	1*
<i>Gloeobacter</i> Rippka et al. 1974 ex Mareš et al. 2013	1*	<i>Chamaesiphonaceae</i>	
<i>Synechococcales</i>		<i>Chamaesiphon</i> A. Braun et Grunow 1865	3
<i>Synechococcaceae</i>		<i>Chamaesiphonopsis</i> Fritsch 1929	4
<i>Anathece</i> Komárek et al. 2011	1,3	<i>Clastidium</i> Kirchner 1880	4
<i>Bacularia</i> Borzì 1905	4	<i>Cyanophanon</i> Geitler 1956	4
<i>Cyanobium</i> Rippka et Cohen-Bazire 1983	1, 3	<i>Geitleribactron</i> Komárek 1975	2
<i>Cyanocatena</i> Hindák 1975	4	<i>Romeriaceae</i>	
<i>Cyanodictyon</i> Pascher 1914	3	<i>Cyanocatenula</i> Joosten 2006	4
<i>Cyanogranis</i> Hindák 1982	4	<i>Romeria</i> Koczwara in Geitler 1932	2
<i>Cyanonephron</i> Hickel 1985	4	<i>Tubiella</i> Hollerbach 1935	4, [?]
<i>Cyanothamnos</i> Cronberg 1991	4	<i>Wolskyella</i> Claus 1963	4
<i>Epigloeosphaera</i> Komárková 1991	4	<i>Pseudanabaenaceae</i>	
<i>Lemmermanniella</i> Geitler 1942	4	<i>Arthronema</i> Komárek et Lukavský 1988	1
<i>Lithococcus</i> Ercegović 1925	4, [?]	<i>Jaaginema</i> Anagnostidis et Komárek 1988	1.3
<i>Lithomyxa</i> Howe 1931	4, [?]	<i>Komvophoron</i> subg. <i>Alyssophoron</i> Anagnostidis et Komárek 1988	5
<i>Rhabdoderma</i> Schmidle et Lauterborn 1900	4	<i>Limnothrix</i> Meffert 1988	1.3
<i>Rhabdogloea</i> Schröder 1917	4	<i>Prochlorothrix</i> Burger-Wiersma et al. 1989	1
<i>Rhodostichus</i> Geitler et Pascher 1931	4, [?]	<i>Pseudanabaena</i> Lauterborn 1915	1.3
<i>Synechococcus</i> Nägeli 1849	1.3	<i>Yonedaella</i> Umezaki 1962	4
<i>Thermosynechococcus</i> Katoh et al. 2001	1*, 5	<i>Leptolyngbyaceae</i>	
<i>Merismopediaceae</i>		<i>Haloleptolyngbya</i> Dadheech et al. 2012	1*
<i>Aphanocapsa</i> Nägeli 1849	3	<i>Halomicronema</i> Abed et al. 2002	1*
<i>Coccolopia</i> Troickaja 1922	4, [?]	<i>Leibleinia</i> (Gomont) Hoffmann 1985	4
<i>Cyanotetras</i> Hindák 1988	4, [?]	<i>Leptolyngbya</i> Anagnostidis et Komárek 1988	1.3
<i>Eucapsis</i> Clements et Shantz 1909	3	<i>Myxocorys</i> Petrasiak et al. 2015 provis.	1*
<i>Limnococcus</i> Komárková et al. 2010	1*	<i>Neosynechococcus</i> Dvořák et al. 2013	1*
<i>Mantellum</i> Dangeard 1941	4	<i>Nodosilinea</i> Perkerson et Casamatta 2011	1*
<i>Merismopedia</i> Meyen 1839	1.3	<i>Oculatella</i> Zammit et al. 2012	1*
<i>Microcrocis</i> Richter 1882	4	<i>Phormidesmis</i> Turicchia et al. 2009	1*
<i>Pannus</i> Hickel 1991	4	<i>Planktolyngbya</i> Anagnostidis et Komárek 1988	1
<i>Synechocystis</i> Sauvageau 1892	1.3	<i>Plectolyngbya</i> Taton et al. 2011	1*
<i>Prochloraceae</i>		<i>Stenomitos</i> Miscoe et Johansen 2015 provis.	1*
<i>Prochlorococcus</i> Chisholm et al. 1992	1*,3	<i>Trichocoleus</i> Anagnostidis 2001	2
<i>Prochloron</i> Lewin 1977	1*,3	<i>Trichotorquatus</i> Petrasiak et Johansen 2015 provis.	1*,5
<i>Coelosphaeriaceae</i>		<i>Heteroleibleiniaceae</i>	
<i>Coelomoron</i> Buell 1938	4	<i>Heteroleibleinia</i> (Geitler) Hoffmann 1985	4
<i>Coelosphaeriopsis</i> Lemmermann 1900	4	<i>Tapinothrix</i> Sauvageau 1892	3
<i>Coelosphaerium</i> Nägeli 1849	2	<i>Schizotrichaceae</i>	
<i>Siphonospaera</i> Hindák 1988	4	<i>Dasygloea</i> Thwaites ex Gomont 1892	4
<i>Snowella</i> Elenkin 1938	1	<i>Schizothrix</i> Kützing ex Gomont 1892	2
<i>Woronichinia</i> Elenkin 1933	1		



Taxon	status	Taxon	status
<b>Borziaceae</b>		<b>Katagnymene</b> Lemmermann 1899 3, 4	
<i>Borzia</i> Cohn ex Gomont 1892	4	<i>Komvophoron</i> Anagnostidis et Komárek 1988	3
<b>Coleofasciculaceae</b>		<i>Starria</i> Lang 1977	1*
<i>Anagnostidinema</i> Strunecký et al. in prep.	1*, 5	<b>Nostocales</b>	
<i>Coleofasciculus</i> Siegesmund et al. 2008	1*	<b>Scytonemataceae</b>	
<i>Desertifilum</i> Dadheech et al. 2012	1*	<i>Brasilonema</i> Fiore et al. 2007	1*
<i>Geitlerinema</i> Anagnostidis 1989	1, 3	<i>Chakia</i> Komárková et al. 2013	1*
<i>Kastovskya</i> Mühlsteinová et al. 2014	1*	<i>Kyrtuthrix</i> Ercegović 1929	4
<i>Roseofilum</i> Casamatta et al. 2012	1*	<i>Ophiothrix</i> Sant'Anna et al. 2010	4
<i>Wilmottia</i> Strunecký et al. 2011	1*	<i>Petalonema</i> Berkeley ex Correns 1889	2
<b>Microcoleaceae</b>		<i>Scytonema</i> Agardh ex Bornet et Flahault 1887	1, 3
<i>Annamia</i> Nguyen et al. 2013	1*	<i>Scytonema</i> sect. <i>Myochrotes</i> Bornet et Flahault 1887	5
<i>Arthrospira</i> Stizenberger ex Gomont 1892	2	<i>Scytonematopsis</i> Kiseleva 1930	2, 3
<i>Hydrocoleum</i> Kützing ex Gomont 1892	2, 3, [?]	<b>Symphyonemataceae</b>	
<i>Johanseninema</i> Hašler et al. 2014	1*	<i>Adrianema</i> DeToni 1936	4
<i>Kamptonema</i> Strunecký et al. 2014	1*	<i>Brachytrichia</i> Zanardini ex Bornet et Flahault 1887	4
<i>Lyngbyopsis</i> Gardner 1927	4	<i>Herpyzonema</i> Weber van Bosse 1913	4
<i>Microcoleus</i> Desmazières ex Gomont 1892	2	<i>Ifinoe</i> Lamprinou et Pantazidou 2011	1*
<i>Oxynema</i> Chatchawan et al. 2012	1*	<i>Iyengariella</i> Desikachary 1953	4
<i>Planktothricoides</i> Suda et M. M. Watanabe 2002	1*	<i>Loriellopsis</i> Hernández Mariné et Canals 2011	1*, [?]
<i>Planktothrix</i> Anagnostidis et Komárek 1988	1	<i>Mastigocladopsis</i> Iyengar et Desikachary 1946	2
<i>Porphyrosiphon</i> Kützing ex Gomont 1892	4	<i>Parenchymorpha</i> Tseng et Hua 1984	4
<i>Proterendothrix</i> W. et G.S.West 1897	4, [?]	<i>Symphyonema</i> Jao 1944	2
<i>Pseudophormidium</i> (Forti) Anagnostidis et Komárek 1988	2	<i>Symphyonemopsis</i> Gugger et Hoffmann 2004	2, (3)
<i>Pseudoscytonema</i> Elenkin 1949	4	<i>Voukiella</i> Ercegović 1925	4
<i>Sirocoleum</i> Kützing ex Gomont 1892	4, [?]	<b>Rivulariaceae</b>	
<i>Symploca</i> Kützing ex Gomont 1892	3	<i>Calothrix</i> Agardh ex Bornet et Flahault 1886	3
<i>Symplocastrum</i> (Gomont) Kirchner 1898	2	<i>Dichothrix</i> Zanardini ex Bornet et Flahault 1886	(2), 4
<i>Trichodesmium</i> Ehrenberg ex Gomont 1892	1, 3	<i>Gardnerula</i> DeToni 1936	4
<i>Tychonema</i> Anagnostidis et Komárek 1988	1, 3	<i>Isactis</i> Thuret ex Bornet et Flahault 1886	4
<b>Homoeotrichaceae</b>		<i>Microchaete</i> Thuret ex Bornet et Flahault 1886	1, 3
<i>Ammatoidea</i> W. et G. S. West 1897	4	<i>Rivularia</i> C. A. Agardh ex Bornet et Flahault 1886	3
<i>Homoeothrix</i> (Thuret) Kirchner 1898	4	<i>Sacconema</i> Borzi ex Bornet et Flahault 1886	4
<i>Phormidiochaete</i> Komárek in Anagnostidis 2001	4	<b>Tolypothrichaceae</b>	
<i>Tildenia</i> Kosinskaja 1926	4, [?]	<i>Borzinema</i> DeToni 1936	4
<b>Oscillatoriaceae</b>		<i>Coleodesmium</i> Borzi ex Geitler 1942	1,3
<i>Aerosakkonema</i> Thu et M. M. Watanabe 2012	1*	<i>Dactylothamnos</i> Fiore et al. 2013 provis.	1*,5
<i>Blennothrix</i> Kützing ex Anagnostidis et Komárek 1988	3	<i>Hassallia</i> Berkeley ex Bornet et Flahault 1888	1,3
<i>Limnoraphis</i> Komárek et al. 2013	1*	<i>Rexia</i> Casamatta et al. 2006	1* [?]
<i>Lyngbya</i> C. Agardh ex Gomont 1892	1, 3	<i>Seguenzaea</i> Borzi 1907	4
<i>Moorea</i> Engene et al. 2012	1*	<i>Spirirestis</i> Flechtner et Johansen 2002	1*
<i>Okeania</i> Engene et al. 2013	1*	<i>Streptostemon</i> Sant'Anna et al. 2010	4
<i>Oscillatoria</i> Vaucher ex Gomont 1892	1, 3	<i>Tolypothrix</i> Kützing ex Bornet et Flahault 1887	1, 3
<i>Phormidium</i> Kützing ex Gomont 1892	1, 3	<b>Godleyaceae</b>	
<i>Plectonema</i> Thuret ex Gomont 1892	2	<i>Godleya</i> Novis et Visnovsky 2011	1*
<i>Polychlamydom</i> W. et G.S.West 1897	4	<i>Toxopsis</i> Lamprinou et al. 2012	1*
<b>Gomontiellaceae</b>		<b>Chlorogloeopsidaceae</b>	
<i>Crinalium</i> Crow 1927	2	<i>Chlorogloeopsis</i> Mitra et Pandey 1967	1, 3
<i>Gomontiella</i> Teoderesco 1901	4		
<i>Hormoscilla</i> Anagnostidis et Komárek 1988	2		

Taxon	status	Taxon	status
<b>Capsosiraceae</b>		<b>Aphanizomenonaceae</b>	
<i>Capsosira</i> Kützing ex Bornet et Flahault 1887	2	<i>Anabaenopsis</i> (Wołoszyńska) Miller 1923	1, 3
<i>Desmosiphon</i> Borzì 1907	4	<i>Aphanizomenon</i> Morren ex Bornet et Flahault 1888	1, 3
<i>Nematoplaca</i> Geitler 1933	4	<i>Chrysoosporum</i> Zapomělová et al. 2012	1*
<i>Stauromatonema</i> Frémy 1930	4	<i>Cuspidothrix</i> Rajaniemi et al. 2005	1*
<b>Stigonemataceae</b>		<i>Cyanospira</i> Florenzano et al. 1985	1*
<i>Cyanobotrys</i> Hoffmann 1991	4	<i>Cylindrospermopsis</i> Seenayya et Subba Raju 1972	1
<i>Doliocatella</i> Geitler 1933	4	<i>Dolichospermum</i> (Ralfs) Wacklin et al. 2009	1
<i>Homoeoptycha</i> Skuja 1944	4	<i>Nodularia</i> Mertens in Jürgens ex Bornet et Flahault 1888	1, 3
<i>Pulvinularia</i> Borzì 1916	4	<i>Raphidiopsis</i> Fritsch et Rich 1929	1, 3, [?]
<i>Stigonema</i> C. Agardh ex Bornet et Flahault 1886	2	<i>Sphaerospermopsis</i> Zapomělová et al. 2010	1*
<b>Hapalosiphonaceae</b>		<i>Umezakia</i> M. Watanabe 1987	1
<i>Aetokthonos</i> Wilde et al. 2014	1	<b>Nostocaceae</b>	
<i>Albrightia</i> Copeland 1936	4	<i>Anabaena</i> Bory ex Bornet et Flahault 1886	(1), 3
<i>Baradlaia</i> Palik 1960	4, [?]	<i>Camptylonemopsis</i> Desikachary 1948	2
<i>Brachytrichiopsis</i> Jao 1944	4	<i>Coleospermopsis</i> Hauer et al. 2015 provis.	1*, 5
<i>Chondrogloea</i> Schmidle 1902	4	<i>Cronbergia</i> Komárek et al. 2010	1*
<i>Colteronema</i> Copeland 1936	4	<i>Cyanocohniella</i> Kaštovský et al. 2014	1*
<i>Fischerella</i> (Bornet et Flahault) Gomont 1895	3	<i>Cylindrospermum</i> Kützing ex Bornet et Flahault 1888	(1), 2
<i>Fischerellopsis</i> Fritsch 1932	4	<i>Desmonostoc</i> Hrouzek et Ventura 2013	1*
<i>Geitleria</i> Friedmann 1955	4	<i>Goleter</i> Miscoe et al. 2015	1*, 5
<i>Handeliella</i> Skuja 1937	4	<i>Hydrocoryne</i> Schwabe ex Bornet et Flahault 1888	1, 3
<i>Hapalosiphon</i> Nägeli in Kützing ex Bornet et Flahault 1887	3	<i>Isocystis</i> Borzì ex Bornet et Flahault 1888	4
<i>Hyphomorpha</i> Borzì 1916	4	<i>Macrospermum</i> Komárek 2008	4
<i>Leptopogon</i> Borzì 1917	4	<i>Mojavia</i> Řeháková et Johansen 2007	1*
<i>Letestuinema</i> Frémy 1930	4	<i>Nostoc</i> Vaucher ex Bornet & Flahault 1888	1, 3
<i>Loefgrenia</i> Gomont 1896	4	<i>Richelia</i> J. Schmidt in Ostenfeld et J. Schmidt 1901	1
<i>Loriella</i> Borzì 1892	4	<i>Spelaea</i> Miscoe et al. 2013 provis.	1*, 5
<i>Mastigocladus</i> Cohn ex Kirchner 1898	1	<i>Tolypothrichopsis</i> Hauer et al. 2015 provis.	1*, 5
<i>Mastigocoleopsis</i> Geitler 1925	4	<i>Trichormus</i> (Ralfs ex Bornet et Flahault) Komárek et Anagnostidis 1989	1, 3
<i>Mastigocoleus</i> Lagerheim ex Bornet et Flahault 1887	1	<i>Wollea</i> Bornet et Flahault 1888	1, 3
<i>Matteia</i> Borzì 1907	4		
<i>Nostochopsis</i> Wood ex Bornet & Flahault 1886	3		
<i>Schmidleinema</i> DeToni 1936	4, [?]		
<i>Spelaeopogon</i> Borzì 1917	4		
<i>Thalpophila</i> Borzì 1907	4		
<i>Westiella</i> Borzì 1907	4		
<i>Westiellopsis</i> Janet 1941	1,3		
<b>Fortiaceae</b>			
<i>Aulosira</i> Kirchner ex Bornet et Flahault 1886	2		
<i>Calochaete</i> Hauer et al. 2013	1*		
<i>Coleospermum</i> Kirchner in Cohn 1878	3		
<i>Fortia</i> De-Toni 1936	2		
<i>Roholtiella</i> Bohunická et al. 2015	1*, 5		
<b>Gloeotrichiaceae</b>			
"Calothrix" (with akinetes)	5		
<i>Gloeotrichia</i> J. Agardh ex Bornet et Flahault 1886	3		



## Prilog 2

Tabela 3. Primeri nekih biološki aktivnih jedinjenja cijanobakterija i njihovi mehanizmi delovanja (Abed i sar., 2008; Tan, 2013)

Familija <i>Oscillatoriaceae</i>	Bioaktivna jedinjenja	Biološka aktivnost
Familija <i>Oscillatoriaceae</i>		
<i>Lyngbya majuscula</i>	Malingolid	Antibakterijska
<i>Lyngbya majuscula</i>	Lingbiatoksin	PKC aktivator
<i>Lyngbya majuscula</i>	Debromoaplaziatoksin	Inflamatorna
<i>Lyngbya majuscula</i>	Kuracin A	Inhibitor povezivanja mikrotubula
<i>Lyngbya majuscula</i>	Kalkitoksin	Blokator natrijumovih kanala
<i>Lyngbya majuscula</i>	Ciklični polipeptidi	Anti-HIV aktivnost
<i>Lyngbya majuscula</i>	Apratoksin A	Antikancerogena
<i>Lyngbya majuscula</i>	Izomalingamid	Antikancerogena
<i>Lyngbya majuscula</i>	Hoiamid D	Antikancerogena
<i>Lyngbya majuscula</i>	Almiramid	Leišmanija
<i>Lyngbya majuscula</i>	Hoiamid A	Neurodegenerativniporemećaji
<i>Lyngbya majuscula</i>	Serinolamidi A	Neurodegenerativniporemećaji
<i>L. legerheimii</i>	Sulfolipid	Anti-HIV aktivnost
<i>Lyngbya sp.</i>	Bisebromoamid	Antikancerogena
<i>Lyngbya cf. confervoides</i>	Grasistatini A	Autoimuni poremećaji
<i>Oscillatoria raoi</i>	Acetilovani sulfogliko-lipidi	Antiviralna
<i>Oscillatoria sp.</i>	Serinolamidi A	Neurodegenerativniporemećaji
<i>Phormidium tenue</i>	Galaktozildiacilgliceroli	Antialgalna
<i>Phormidium tenue</i>		Anti-HIV
<i>Phormidium spp.</i>	Termostabilni enzimi	Kataliza hemijskih reakcija
<i>Phormidium gracile</i>	Hoiamid A	Neurodegenerativniporemećaji
<i>Spirulina platensis</i>	Spirulan	Antiviral
<i>Spirulina platensis</i>	Gama linolenska kiselina	Prekursor arahidonske kiseline
<i>Spirulina platensis</i>	Vitamin B i E	Antiokidansi i ko-enzimi
Familija <i>Hvellaceae</i>		
<i>Hyella caespitose</i>	Karazostatin	Antifungalna
Familija <i>Nostocaceae</i>		
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Nostocin A	Antialgalna
<i>Nostoc linckia</i>	Cianobakterin LU-1	Antialgalna
<i>Nostoc sphaericum</i>	Indolokarbazol	Antiviralna
<i>Nostoc commune</i>	Nostodion	Antifungalna
<i>Nostoc sp.</i>	Nostociklamid	Antifungalna
<i>Nostoc sp.</i>	Nostociklin A	Antibakterijska



<i>Nostoc sp.</i>	Cilindrociklofan	Antibakterijska
<i>Nostoc sp.</i>	Nostociklofan	Antibakterijska
<i>Nostoc insulare</i>	Norharman	Antibakterijska
<i>Nostoc sp.</i> UIC 10022A	Cilindrociklofan	Citotoksičnost
<i>Nostoc sp.</i> UIC 10062	Merociklofan A i B	Citotoksičnost
<i>Anabaena circinalis</i>	Anatoksin-a	Inflamatorna
<u>Familija Scytonemaceae</u>		
<i>Scytonema hofmanni</i>	Cijanobaktericin	Antialgalna
<i>S. ocellatum</i>	Tolitoksin	Antifungalna
<i>S. ocellatum</i>	Fitoaleksin	Antifungalna
<i>S. pseudohofmanni</i>	Scitoficins	Antifungalna
<u>Familija Microchaetaceae</u>		
<i>Tolypothrix tenuis</i>	Tojokamicin	Antifungalna
<i>T. tjipanasensis</i>	Tjipanazol	Antifungalna
<u>Familija Stigonemataceae</u>		
<i>Fischerella muscicola</i>	Fišerelin	Antialgalna, antifungalna
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	Hapalindol	Antifungalna
<u>Familija Merismopediaceae</u>		
<i>Gomphosphaeria aponina</i>	Aponin	Antialgalna
<u>Familija Chroococcaceae</u>		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Kavagučipeptin B	Antibakterijska
<i>Synechocystis sp.</i>	Naienones A-C	Antitumorska
<i>Synechococcus elongatus</i>	Termostabilni enzim	Kataliza hemijskih reakcija
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Termostabilna polifosfat kinaza	Produkcija dipeptida

## Prilog 3.

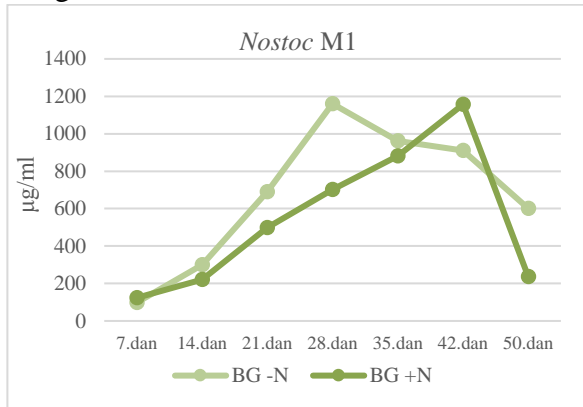
Tabela 20. Sekvence dela 16S rRNK gena analiziranih cijanobakterijskih sojeva

<p><b>&gt;Nostoc_M1 399 bp</b></p> <p>CCACCGATCATACCGCGTGAGGAGGAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAATAAG  AAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG  AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCGATGTAAGTCTGC  TGTTAAAGAGCAAAGCTTAACTTTGTAAAAGCAGTGAAACTACATAGCTAGAGTACGTTCCGG  GCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAA  GGCGCTCTGCTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAATGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGA  TACCCCTGTAGTCAAATA</p>
<p><b>&gt;Phorm_M1 395 bp</b></p> <p>TTTTCCAGGCCGCGCGTGAGGAGGAGGCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAG  AACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGA  GGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTAATTAAGTCTGTT  GTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAACTGGTTGGCTAGAGTGTGGTAGGGG  TAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAG  GCGCTCTACTGGGCCACAAGTACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGAT  ACCCCTGTAGTCA</p>
<p><b>&gt;Caloth_M2 398 bp</b></p> <p>CGTCGGAAAATCCGCGTGAGGGAGAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAA  AAAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  GGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCT  GTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAAAGCAGTGAAACTACATAGCTAGAGTGCCTCCGGG  CAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAA  GCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAAGCTAGGGGAGCGAAAAGGGATTAG  ATACCCCTGTAGTCA</p>
<p><b>&gt;Anab_M2 396 bp</b></p> <p>AAATTTAAGCTTCGTCTCAGTGTGAGTTACGGCCTAGCAGAGCGCTTTCGCCACCGGTGTTCTTC  CTGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCTCTGCCCCGAACGTACTCTAGCTCTG  TAGTTTCCACTGCCTTTACAAGGTTGAGCCTTGCTCTTTAACAGCAGACTTACAGTGCCACCTGC  GGACGCTTTACGCCAATCATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  CGGAGTTAGCCGATGCTTATTCCTCAGGTACCTTCATTTTTTTATTCCCTGAGAAAAGAGGTTTAC  AACCAAGAGCCTTCTCCCTCACGCGGTATTGCTCCGTACGGCTTTCGCCATTGCGGAAAATT  CCCCA</p>
<p><b>&gt;Oscill_M2 398 bp</b></p> <p>CCGGCGAAACACCGCGTGAGGGAGGAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAA  CAAAATGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACG  GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATTCAAGTCTG  CTGTTAAAGCGCAGGGCTTAACTCTGTAAAGGCAGTGAAACTGAATAGCTAGAGTGTGGTAGG  GGTAGAGGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGA  AGGCGCTCTACTGGACCATAACTGACACTCACAGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTA  GATACCCCTGTAGTCA</p>
<p><b>&gt;Oscill_SP2 400 bp</b></p> <p>TTAACGCTAAGGACCGCCGCGTGAGGAGAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAG  AACAAAATGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGA  CGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATTCAAGTC  TGCTGTTAAAGCGCAGGGCTTAACTCTGTAAAGGCAGTGAAACTGAATAGCTAGAGTGTGGTA  GGGTAGAGGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGC  GAAGGCGCTCTACTGGACCATAACTGACACTCACAGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGAT  TAGATACCCCTGTAGTCA</p>
<p><b>&gt;Anab_SP2 221 bp</b></p> <p>CCCACGGGAAAATCCCGCGTGAGGGATGAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGTATAAA  AAAGTGTATGGACCAGAGGAATAAGCAACGGCTAACTCCGGGCCAGCAGCTGCGGTAATACGG  AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGCCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTTAAGCACGTCTG  CTGCTAAAGAGCAAACCTTAATTTTGTAG</p>
<p><b>&gt;Caloth_SP2 399 bp</b></p> <p>TTGGGGAAAAGAACGCGTGAGGGATGAGGTCTGTGGATTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAAGAA  GTTCTGACGGTACCGATCGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA</p>

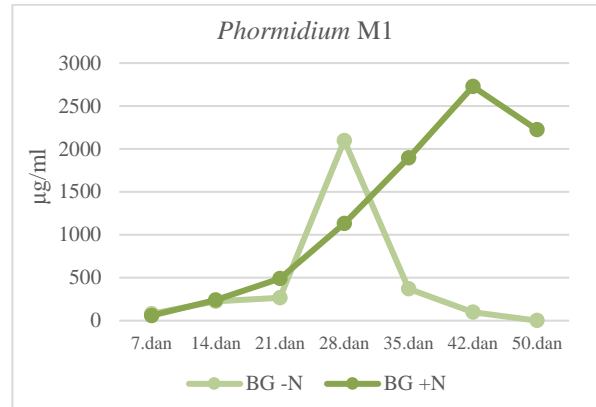
GGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTAATCAAGTCTATT GTCAAAGTGCAGGCTAAACTTCGTAAAGGCGGTGAAACTGGTTGACTAGAGTTTGGTAGGGG TAGAGGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAA GCGCTCTACTGGCCTGAACTGACACTGAGGGACGAGAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGAT ACCCCTGTAGTCAAACC
<b>&gt;Nostoc_SP5 397 bp</b>
GGGTGACAGACTACCGCGTGATGGAGGAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGA ACACATTGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATGTAAGTCTG CTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAACTACATAGCTAGAGTACGTTCCG GGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGA AGGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAG ATACCCCTGTAGTCA
<b>&gt;Cylindr_K1 642 bp</b>
AAAGGATTAGTTTTGGGTCCTTCAGTGTTCAGTTGCCGGCTAGCAAAGCGCTTTTCGCCACCGGTG TTCTTCTGACCTCTACGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCTCTGCCCCGAACGCACTCTA GCCATGTAGTTTCCACTGCCTTTACAAGGTTGAGCCTTGCTCTTTAACAGCAGACTTACATAGCC ACCTGCGGAGCTTTACGCCAATCATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTG CTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTTATTCCTCAGGTACCGTCATTTTTTTCTTCCCTGAGAAAAGA GGTTTACAACCCAAGAGCCTTCCCTCCCTCACGCGTATTGCTCCGTCAGGCTTTTCGCCATTGCG GAAAATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATC ATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCTCTTACCCACCAACTAGCTAATCAG ACGCGAGCTCATCTTCAGGCAGCAAGCCTTTACCTCTCGGCACATCCGGTATTAGCCACCGTTT CCAGTGGTTGTCCAGACCTAAAGCTAGATTCTCACGCGTACTCACCCGTCCGATG
<b>&gt;Lyngb_K10 322 bp</b>
TGTTGGGGAAAAGACCGCGTGGGGGAGAGGCTCTTGGGTTGTA AACCCCTTTTCTCTGGGAAGA AAGTTGTGAAAGCAGCCTGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC GCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGC AGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACCGGGGCTTAACTTCGGAAAGGCAGTGGAACTGAACAGCTA GAGTATGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAA CATC
<b>&gt;Tolyo_K11 392 bp</b>
TACGAGGGAAATGCGCGTGAGGAGAGGCCTATGGGTGCTAACTTCTTTTCTCAGAGAAGATTTT GACGGTGTCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCACCAGCCGCGGTAAGACAGAGGATG CAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTGGCTTCTCAAGTCTCCTGTCAA GATCAGGGCTCAACCCTGGACAGGCAGGAGAACTATGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGCAGAG GGAATTTCCCGGGGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAAAGGGGAAGGCACT CTGCTGGGCCGCAACTGACACTGAGAGACGAAAGCGAGGGGAGCAAAGGGATTAGATACCCC TGTAGTCACA
<b>&gt;Tolyo_K15 235 bp</b>
CGAACGGAAATCCGCGTGAGGCGGAGGCTCTTGGATTGTA AACCTCTTTTCTCAGGGACGAAAA AAATGACCGTACCAGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTACATCGTGG GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGAAAAAGCGTCCGCAGTGGGGAGGAAGTCTGCTGTT TCAGTGATTCTACCCCTCTAAAGACCGTGGCTATCACCTGGC
<b>&gt;Nostoc_K15 403 bp</b>
CATTCAGGAAATACCGCGTGAGGGAGGAGGCTCTTGGGTCGTAACTCTTTTCTCAGGGAAGAA CACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATGTAAGTCTGC TGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAACTACATAGCTAGAGTACGTTCCGG GCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCAA GGCGCTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGACAAAATTTAGCCGACGGAATGGCCTCCATT GCCAAGATTTTCCCAACTC
<b>&gt;Phorm_K15 399 bp</b>
TTCCGAAAACCAACCGCGTGAGGGAGGAGGCTTAGGGTTGTA AACCTCTTTTCTCTGGGAAGAA TAACTGACCATACACAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCTTGTAAAGACGGA GGAGGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTATTTAAGTCTGTT GTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAACTGGATGACTTGAGTGTGGTAGGGG TAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAG GCGCTCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGAT ACCCCTGTAGTCCGCC

<p><b>&gt;Lyngb_T7 397 bp</b></p> <p>CCATCGGTACAAAACGCGTGGGGTTCGAGGCTCTGTGGGTTGTAACCCCTTTTCTCTGGGAAGAAT  GTTGGACGTTTCCCTGACGGTACCATAGGATCCTCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGGT  AAGACGGATGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTATTCAGGTGCCATTTCA  AGTCTGCTGTCAAAGACCGGGGCTTAACTTCGAAAGGCAGGGGAACTGACCAGCTAGAGTAT  GGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGATTGCGTAAAGATCCGGAAGAATTTCCGGTG  GTGAAGGGCTTTGCTGGACCATAACTGAACTCCGGGACGACGCTAGGGGAACGATCCCCACCAT  TCCCCACAAGA</p>
<p><b>&gt;Nostoc_T7 396 bp</b></p> <p>GCTCGAATGACCTACCGCGTGAGGGAGGAGGCTCTTGGGTTCGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGA  ACACAATGACGGAACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  GAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTG  CTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAACTACATGGCTAGAGTGCCTTCGG  GGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGA  AGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAG  ATACCCCTGTAGTC</p>
<p><b>&gt;Phorm_T11 396 bp</b></p> <p>CGGAAGGGACAGCCGGCGTGAGGAGGAGGCCTTAGGGTTGTAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAA  TAACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGA  GGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTTATTAAGTCTGTT  GTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAACTGGTGAACCTGAGTGTGGTAGGGG  TAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAG  GCGCTCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGAT  ACCCCTGTAGTCAA</p>
<p><b>&gt;Nostoc_T18 400 bp</b></p> <p>CATCCGGGACTTCCC CGGTGAGGGAGGAGGCTCTTGGGTTCGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGA  AAAGGGGAGCACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGGGGGAGCCGCGGTAATACGGAGGA  TGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTTTGTAAGTCTGCTGTTA  AAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAGAGCAGTGGAACTACATAGCTAGAGTACGTTCCGGGCAG  AGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCG  CTCTGCTAGGCCGTAACCTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC  CCTGTAGTCAATTTTTTTTTTTTTTTT</p>
<p><b>&gt;Oscill_T18 366 bp</b></p> <p>TCTCGTCAAAGCCCCCGTTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCTGGGAAGA  ACAAAATCCTTGCAACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCCGCCTCGGTAAGAC  GGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATTCAAGTCT  GCTGTTAAAGCGCAGGGCTTAACTCTGTAAAGGCAGTGGAACTGAATAGCTAGAGTGTGGTAG  GGGTAGAGGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCG  AAGGCGCTCTACTGGACCATAACTGACACTCACAGGACGAAAGCTA</p>

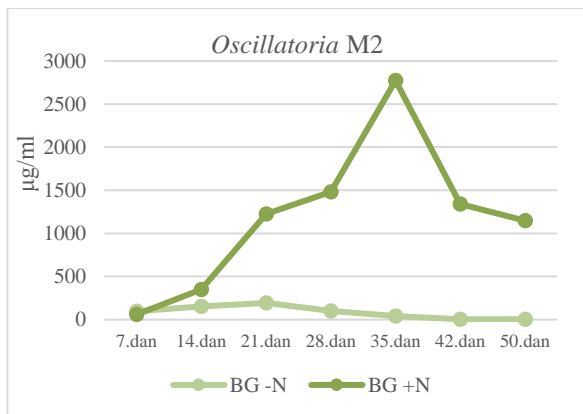
Prilog 4.



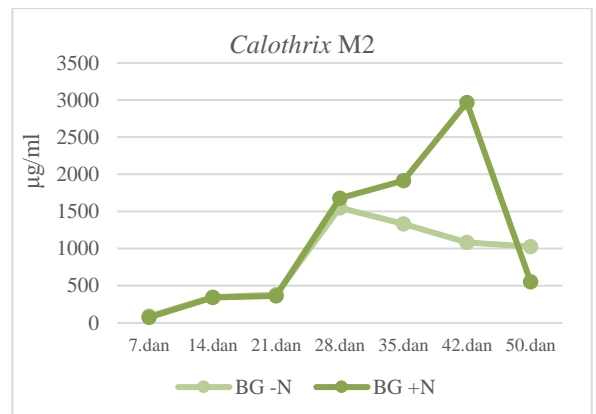
Grafik 1. Uticaj azota na produkciju biomase soja NM1



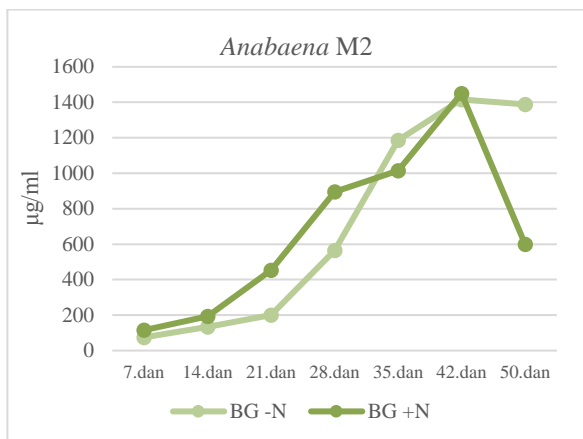
Grafik 2. Uticaj azota na produkciju biomase soja PM1



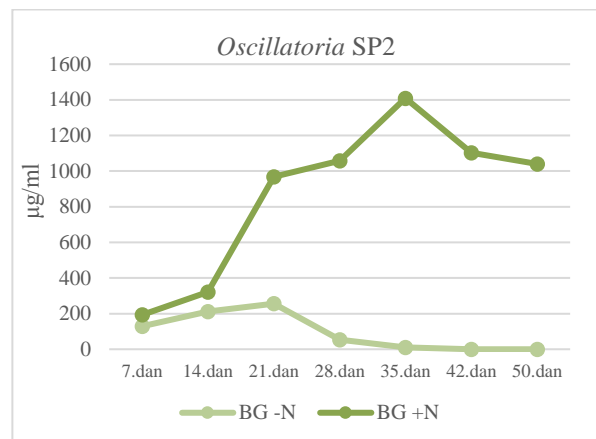
Grafik 3. Uticaj azota na produkciju biomase soja OM2



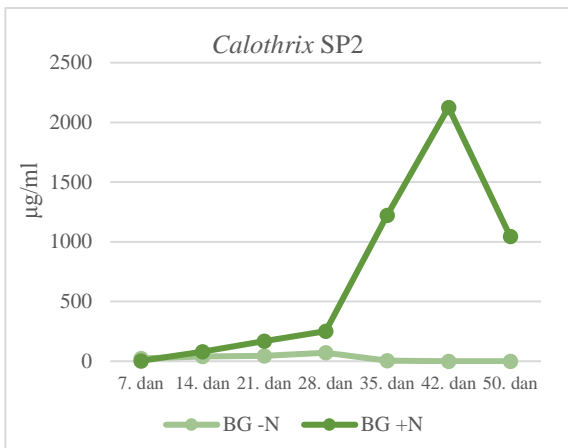
Grafik 4. Uticaj azota na produkciju biomase soja CM2



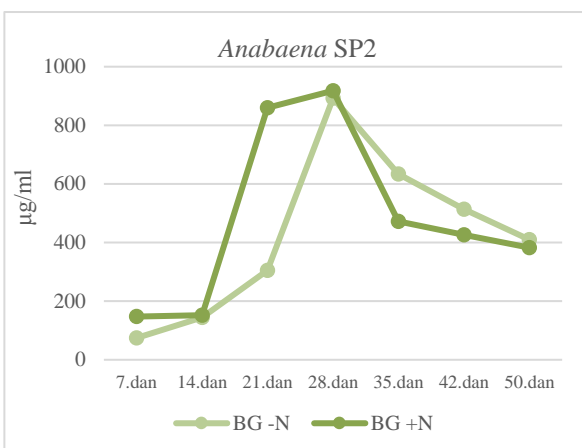
Grafik 5. Uticaj azota na produkciju biomase soja AM2



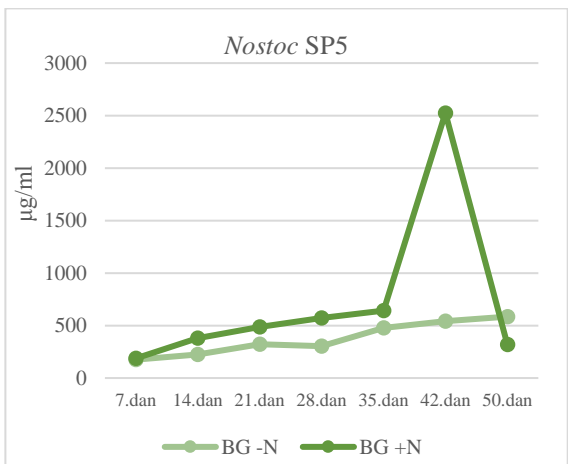
Grafik 6. Uticaj azota na produkciju biomase soja OSP2



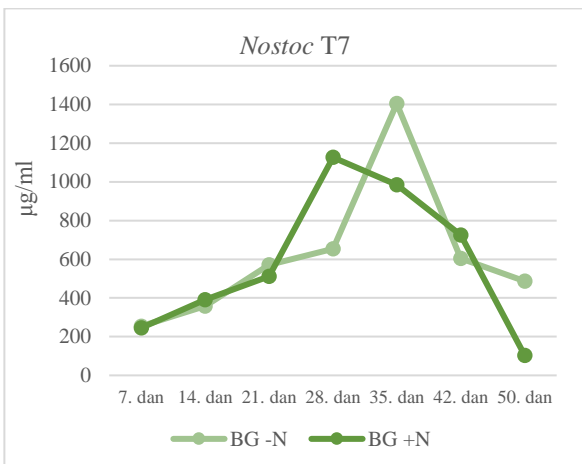
Grafik 7. Uticaj azota na produkciju biomase soja CSP2



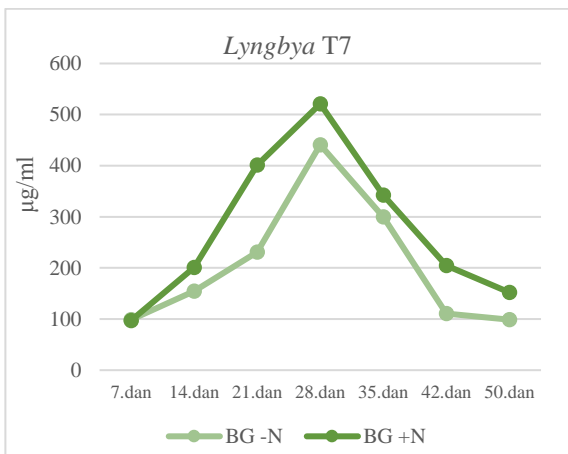
Grafik 8. Uticaj azota na produkciju biomase soja ASP2



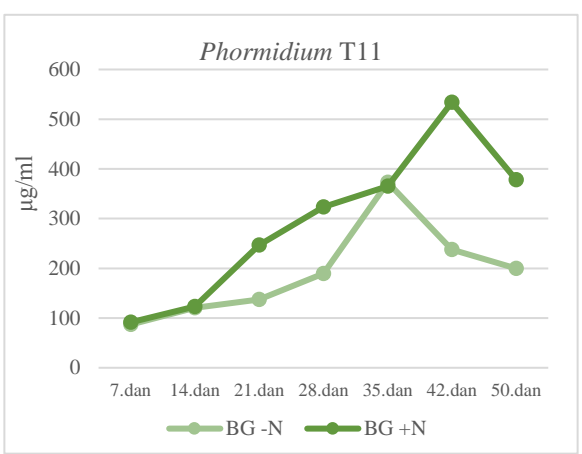
Grafik 9. Uticaj azota na produkciju biomase soja NSP5



Grafik 10. Uticaj azota na produkciju biomase soja NT7

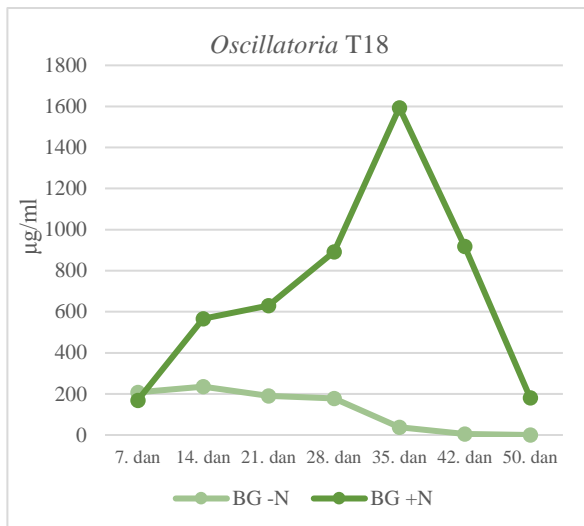


Grafik 11. Uticaj azota na produkciju biomase soja LT7

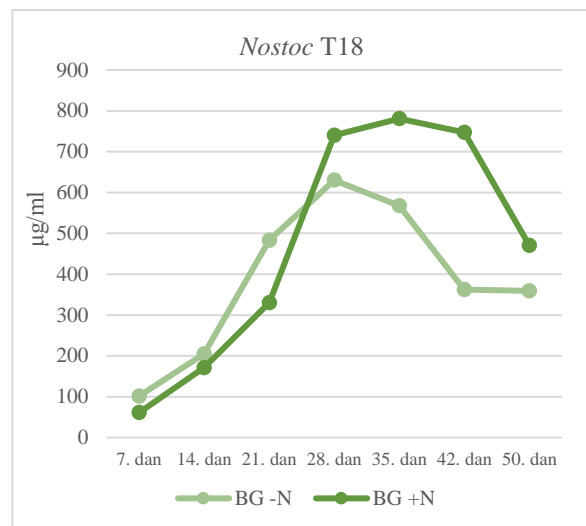


Grafik 12. Uticaj azota na produkciju biomase soja PT11

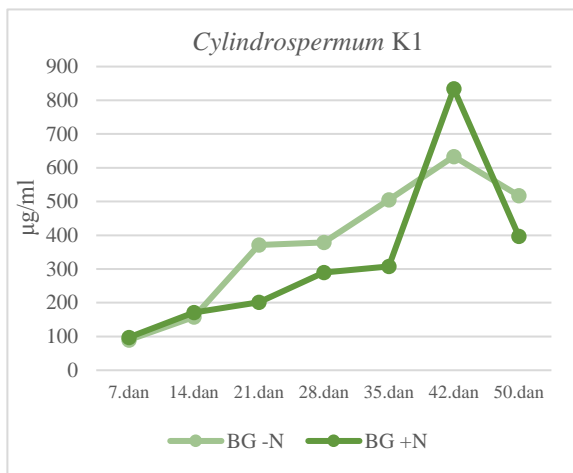




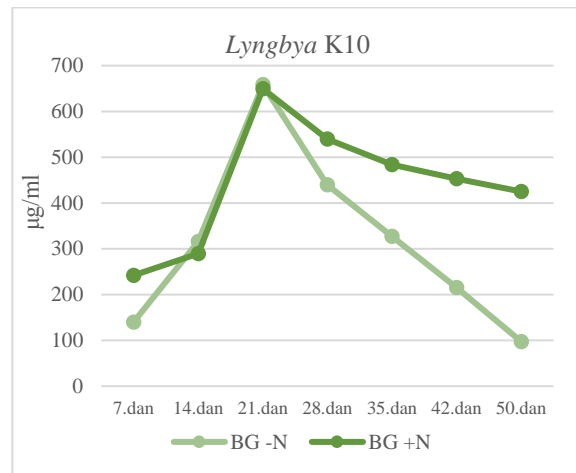
Grafik 13. Uticaj azota na produkciju biomase soja OT18



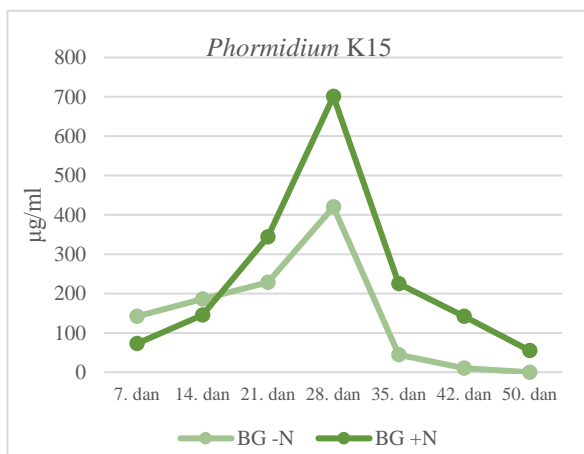
Grafik 14. Uticaj azota na produkciju biomase soja NT18



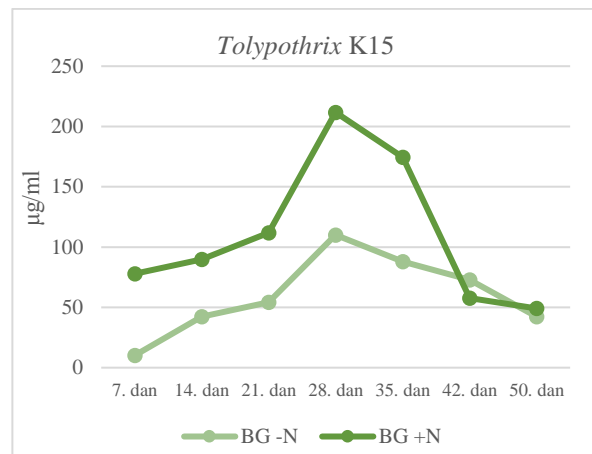
Grafik 15. Uticaj azota na produkciju biomase soja CK1



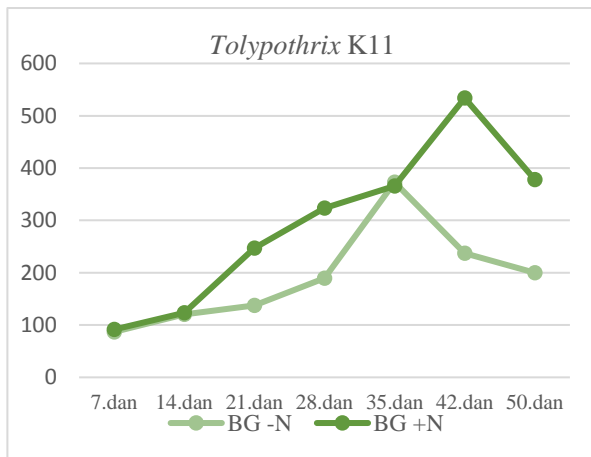
Grafik 16. Uticaj azota na produkciju biomase soja LK10



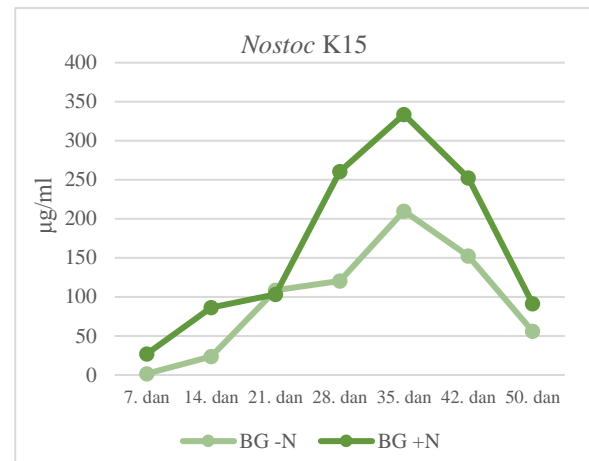
Grafik 17. Uticaj azota na produkciju biomase soja PK15



Grafik 18. Uticaj azota na produkciju biomase soja TK15



Grafik 19. Uticaj azota na produkciju biomase soja TK11



Grafik 20. Uticaj azota na produkciju biomase soja NK15

Tabela 23. Uticaj azota na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina kod testiranih sojeva

Koncentracija fikobiliproteina (mg/ml)						
Testirani soj	14. dan	21. dan	28. dan	35. dan	42. dan	50. dan
<b><i>Nostoc M1</i></b>						
APC (BG+ N)	0,00364	0,00876	0,006662	0,0037438	0,00245	0,000649
APC (BG- N)	0,00345	0,00778	0,007132	0,0163646	0,01019	0,005741
PC (BG+ N)	0,00359	0,00938	0,015727	0,01562	0,006	0,00557
PC (BG- N)	0,00367	0,00898	0,024124	0,0264	0,0159	0,01242
PE (BG+ N)	0,001397	0,002626	0,00322	0,0013349	0,00077	0,00063
PE (BG- N)	0,000604	0,001685	0,00278	0,00455	0,0035	0,00368
<b><i>Anabaena M2</i></b>						
APC (BG+ N)	0,006798	0,00318	0,0139	0,00216	0,005122	0,00054
APC (BG- N)	0,00275	0,0033	0,005883	0,0087481	0,004028	0,00184
PC (BG+ N)	0,00329	0,01305	0,026469	0,03082	0,04098	0,0161
PC (BG- N)	0,00281	0,00273	0,011184	0,0213	0,01672	0,01023
PE (BG+ N)	0,000149	0,001597	0,00192	0,00337	0,002627	0,002
PE (BG- N)	0,00134	0,00131	0,001565	0,00218	0,00138	0,0008453
<b><i>Calothrix M2</i></b>						
APC (BG+ N)	0,0012	0,00229	0,00439	0,0033415	0,00687	0,00054
APC (BG- N)	0,00105	0,00225	0,005201	0,0050939	0,00423	0,00332
PC (BG+ N)	0,00098	0,00166	0,003418	0,00254	0,01074	0,00451
PC (BG- N)	0,00088	0,00185	0,004571	0,00344	0,00073	0,000416
PE (BG+ N)	0,00094	0,001771	0,00256	0,0103	0,0244582	0,00073
PE (BG- N)	0,0009	0,0016629	0,002034	0,00513	0,0065466	0,00149
<b><i>Phormidium M1</i></b>						
APC (BG+ N)	0,00121	0,00245	0,004275	0,0321	0,0216	0,004
APC (BG- N)	0,00121	0,00233	0,002482	0,001452	0,00645	0,007725
PC (BG+ N)	0,0013	0,00176	0,003133	0,002115	0,00165	0,0005
PC (BG- N)	0,0013	0,00148	0,002424	0,00564	0,0109	0,00474
PE (BG+ N)	0,000796	0,00101	0,001749	n.d.	n.d.	n.d.

PE (BG- N)	0,007966	0,00098	0,000941	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Oscillatoria M2</b>						
APC (BG+ N)	0,00105	0,00198	0,002678	0,0033823	n.d.	n.d.
APC (BG- N)	0,00027	0,00245	0,002367	n.d.	n.d.	n.d.
PC (BG+ N)	0,00088	0,00147	0,002335	0,00235	n.d.	n.d.
PC (BG- N)	0,00038	0,00176	0,002138	n.d.	n.d.	n.d.
PE (BG+ N)	0,00081	0,001351	0,00105	0,001952	n.d.	n.d.
PE (BG- N)	0,0005036	0,000919	0,00101	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Oscillatoria SP2</b>						
APC (BG+ N)	0,002645	0,0021	0,00221	0,0061501	0,0053	0,000467
APC (BG- N)	0,00152	0,00249	0,002719	n.d.	n.d.	n.d.
PC (BG+ N)	0,001675	0,00175	0,00204	0,00347	0,0024	0,003
PC (BG- N)	0,00117	0,00158	0,002148	n.d.	n.d.	n.d.
PE (BG+ N)	0,00083	0,001114	0,001684	0,00275	0,0016	0,00051
PE (BG- N)	0,001131	0,00105	0,001093	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Anabaena SP2</b>						
APC (BG+ N)	0,00415	0,00526	0,006738	0,0020809	0,004811	0,0025
APC (BG- N)	0,0031	0,00428	0,006585	0,0030381	0,006568	0,00389
PC (BG+ N)	0,00369	0,00674	0,020251	0,00345	0,0762	0,02192
PC (BG- N)	0,0015	0,00282	0,00313	0,007153	0,0259	0,01056
PE (BG+ N)	0,000881	0,0018	0,0010477	0,00203	0,00794	0,00429
PE (BG- N)	0,001826	0,00175	0,002409	0,002441	0,00241541	0,0026
<b>Calothrix SP2</b>						
APC (BG+ N)	0,0257	0,0257	0,1429	0,009	0,0066	0,001
APC (BG- N)	0,0201	0,0305	0,0844	0,0344	0,0190	0,0144
PC (BG+ N)	0,0276	0,0276	0,01368	0,0084	0,0009	n.d.
PC (BG- N)	0,0201	0,0331	0,0812	0,0348	0,0137	0,0018
PE (BG+ N)	0,0037	0,0358	0,3172	0,0337	0,0207	0,0069
PE (BG- N)	0,0253	0,0426	0,1751	0,0439	0,0162	0,0014
<b>Nostoc SP5</b>						

APC (BG+ N)	0,0431	0,0436	0,0428	0,0547	0,0558	0,0462
APC (BG- N)	0,0418	0,0437	0,0440	0,0482	0,0491	0,0491
PC (BG+ N)	0,0442	0,0451	0,0445	0,0643	0,0686	0,0485
PC (BG- N)	0,0422	0,0447	0,0465	0,0526	0,0515	0,0511
PE (BG+ N)	0,0451	0,0637	0,0645	0,2053	0,1936	0,0685
PE (BG- N)	0,0442	0,0511	0,0669	0,1104	0,0932	0,0705
<b>Nostoc T7</b>						
APC (BG+ N)	0,0005	0,0043	0,0218	0,0024	0,0325	0,0058
APC (BG- N)	0,0047	0,0212	0,0216	0,0248	0,0174	0,005
PC (BG+ N)	0,014	0,0249	0,0415	0,0396	0,1057	0,0283
PC (BG- N)	0,0065	0,017	0,0559	0,1004	0,0617	0,0124
PE (BG+ N)	0,031	0,0553	0,0457	0,0352	0,0236	0,00851
PE (BG- N)	0,0162	0,0599	0,0684	0,0388	0,0381	0,00654
<b>Nostoc T18</b>						
APC (BG+ N)	0,0097	0,0063	0,0214	0,05393	0,032800	0,0388
APC (BG- N)	0,0033	0,0165	0,0249	0,0205	0,0124	0,00954
PC (BG+ N)	0,0085	0,0051	0,05280	0,0609	0,0748	0,0234
PC (BG- N)	0,0115	0,0156	0,0236	0,0377	0,0184	0,0101
PE (BG+ N)	0,0531	0,093	0,06921	0,0864	0,0818	0,0339
PE (BG- N)	0,0441	0,0522	0,062	0,0552	0,1239	0,031
<b>Oscillatoria T18</b>						
APC (BG+ N)	0,0018	0,0114	0,0162	0,0248	0,0296	0,0229
APC (BG- N)	0,0057	0,0105	0,0162	0,0276	0,0279	0,0153
PC (BG+ N)	0,0048	0,0129	0,0165	0,0256	0,0312	0,0229
PC (BG- N)	0,0055	0,012	0,0174	0,0304	0,0234	0,0155
PE (BG+ N)	0,0062	0,0202	0,0252	0,0351	0,0409	0,0331
PE (BG- N)	0,0037	0,0129	0,0216	0,0367	0,0299	0,0149
<b>Phormidium T11</b>						
APC (BG+ N)	0,0475	0,0455	0,0486	0,0487	0,0688	0,0486
APC (BG- N)	0,0477	0,0492	0,0519	0,0532	0,0469	0,0499

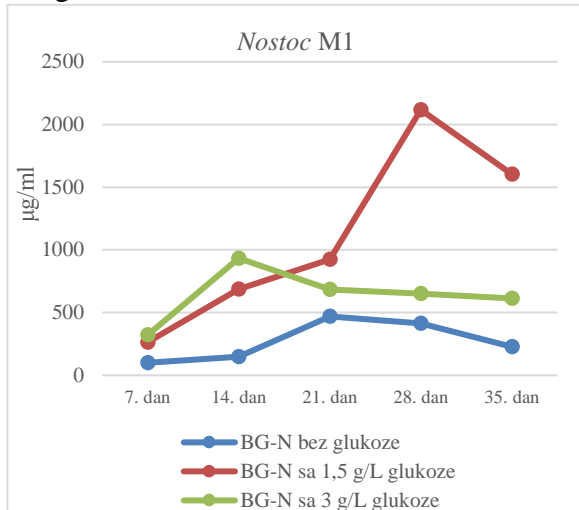
PC (BG+ N)	0,0481	0,0457	0,0489	0,0490	0,0692	0,0483
PC (BG- N)	0,0472	0,0489	0,0461	0,051	0,0503	0,0525
PE (BG+ N)	0,0478	0,0459	0,0489	0,0494	0,0563	0,0483
PE (BG- N)	0,0475	0,0513	0,0466	0,0512	0,0504	0,0521
<b>Lyngbya T7</b>						
APC (BG+ N)	0,0453	0,0493	0,0464	0,0442	0,0471	0,0469
APC (BG- N)	0,0476	0,1163	0,0486	0,0449	0,0497	0,0494
PC (BG+ N)	0,0461	0,0512	0,0474	0,0446	0,0480	0,0472
PC (BG- N)	0,0482	0,1144	0,0495	0,0455	0,0492	0,0496
PE (BG+ N)	0,0456	0,0528	0,0473	0,0452	0,0474	0,0467
PE (BG- N)	0,0506	0,1065	0,0498	0,0466	0,0487	0,0503
<b>Cylindrospermum K1</b>						
APC (BG+ N)	0,0474	0,0461	0,0479	0,0541	0,0614	0,0608
APC (BG- N)	0,0464	0,0470	0,0528	0,0541	0,0579	0,0544
PC (BG+ N)	0,0473	0,0489	0,0516	0,0602	0,0715	0,0604
PC (BG- N)	0,0475	0,0483	0,0571	0,0593	0,0626	0,0566
PE (BG+ N)	0,0475	0,0500	0,0523	0,0614	0,0671	0,0635
PE (BG- N)	0,0485	0,0494	0,0594	0,0598	0,0642	0,0583
<b>Lyngbya K10</b>						
APC (BG+ N)	0,0482	0,0462	0,0457	0,0487	0,0516	0,0514
APC (BG- N)	0,0449	0,0451	0,0449	0,0462	0,0437	0,0457
PC (BG+ N)	0,0494	0,0467	0,0468	0,0500	0,0528	0,0522
PC (BG- N)	0,0450	0,0457	0,0461	0,0479	0,0446	0,0466
PE (BG+ N)	0,0477	0,0482	0,0526	0,0539	0,0566	0,0539
PE (BG- N)	0,0470	0,0466	0,0459	0,0504	0,0466	0,0473
<b>Tolypothrix K11</b>						
APC (BG+ N)	0,0123	0,0467	0,0488	0,0516	0,0472	0,0466
APC (BG- N)	0,0091	0,0237	0,0417	0,0497	0,0321	0,0276
PC (BG+ N)	0,0400	0,0494	0,0521	0,0566	0,0477	0,002458



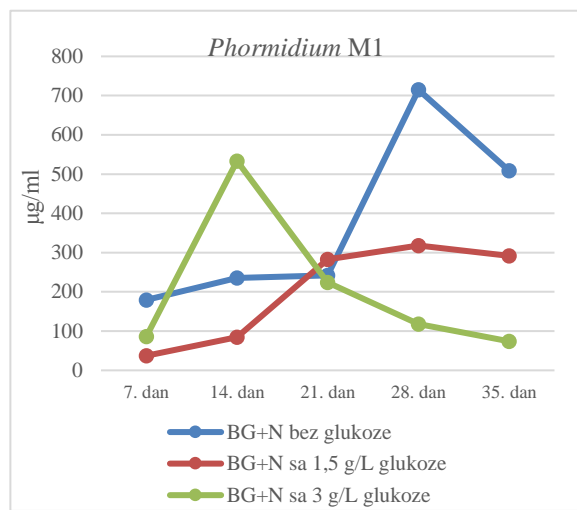
PC (BG- N)	0,0137	0,03569	0,0358	0,04758	0,05748	0,02412
PE (BG+ N)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE (BG- N)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Tolypothrix K15</b>						
APC (BG+ N)	0,0095	0,0181	0,0248	0,0248	0,0248	0,0114
APC (BG- N)	0,0144	0,0229	0,0371	0,0287	0,06086	0,0057
PC (BG+ N)	0,0121	0,0203	0,0267	0,0267	0,02879	0,0139
PC (BG- N)	0,0121	0,0139	0,0249	0,0293	0,05886	0,0065
PE (BG+ N)	0,012	0,0245	0,0305	0,0325	0,0345	0,0136
PE (BG- N)	0,003	0,0166	0,0309	0,0362	0,08103	0,0111
<b>Nostoc K15</b>						
APC (BG+ N)	0,0068	0,0034	0,0208	0,0259	0,0141	0,0035
APC (BG- N)	0,0028	0,0137	0,0203	0,0208	0,0166	0,06802
PC (BG+ N)	0,0044	0,0123	0,025	0,0246	0,0032	0,0381
PC (BG- N)	0,0047	0,0151	0,0117	0,026	0,0085	0,0665
PE (BG+ N)	0,0377	0,0352	0,0461	0,0506	0,0464	0,01453
PE (BG- N)	0,0306	0,0335	0,0426	0,0703	0,0419	0,08596
<b>Phormidium K15</b>						
APC (BG+ N)	0,0181	0,0199	0,022	0,0277	0,0287	n.d.
APC (BG- N)	0,0076	0,0153	0,0124	0,0265	0,0324	n.d.
PC (BG+ N)	0,0183	0,0209	0,0241	0,0293	0,0294	n.d.
PC (BG- N)	0,0072	0,0138	0,0155	0,0335	0,0349	n.d.
PE (BG+ N)	0,0207	0,0289	0,0342	0,0364	0,0324	n.d.
PE (BG- N)	0,0122	0,01656	0,0199	0,0411	0,0442	n.d.

n.d. – nije detektovano

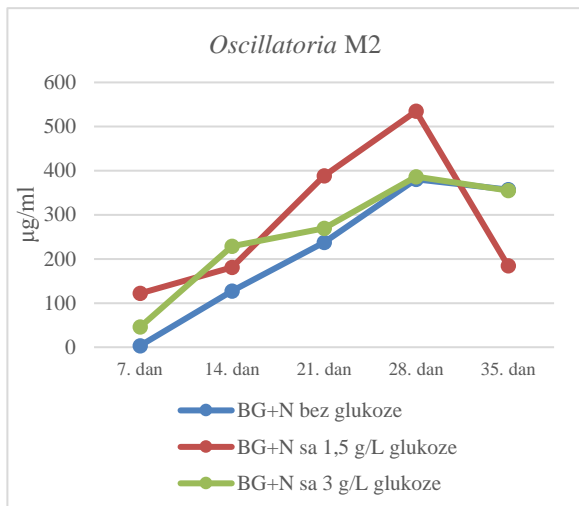
Prilog 5.



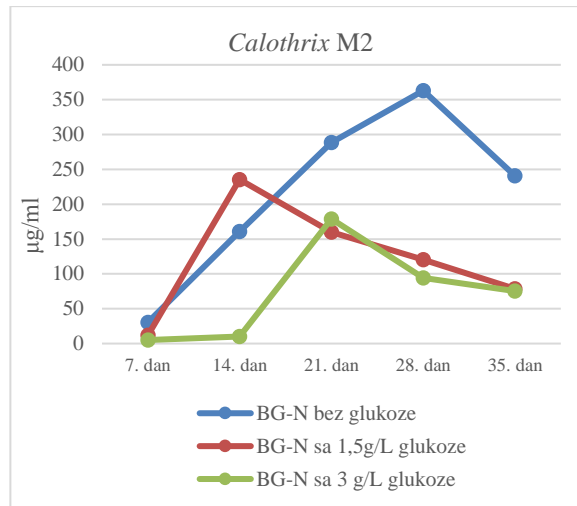
Grafik 22. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja NM1



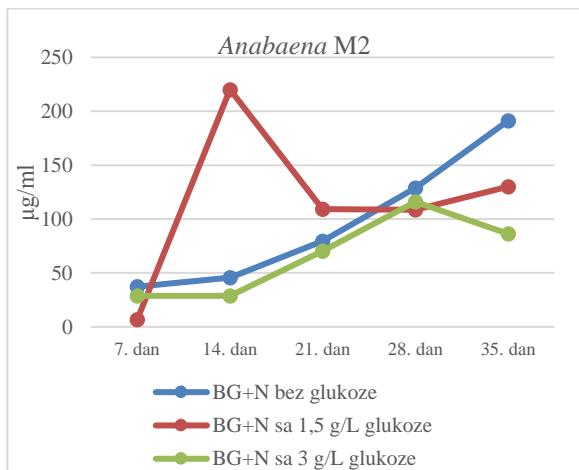
Grafik 23. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja PM1



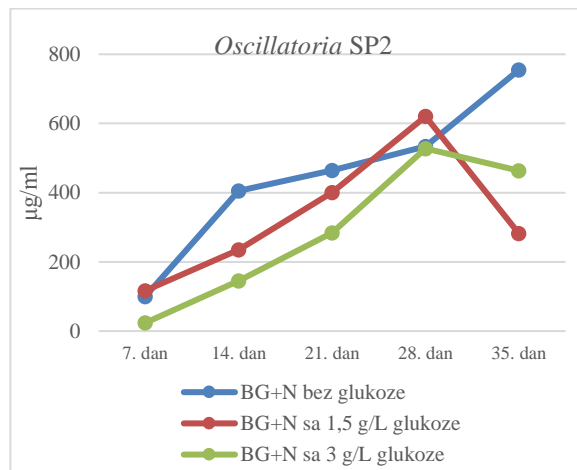
Grafik 24. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja OM2



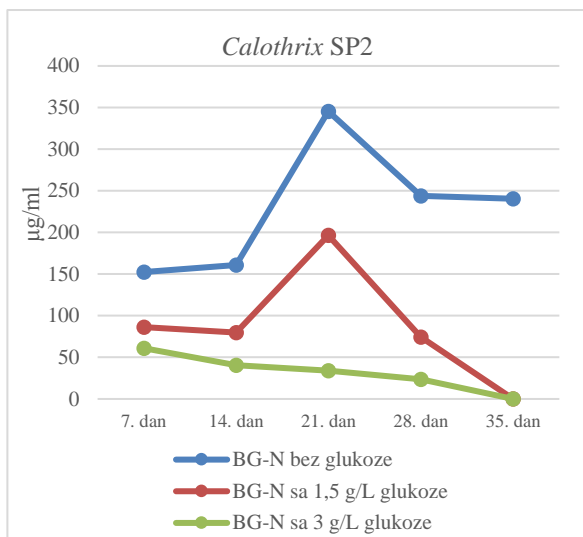
Grafik 25. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja CM2



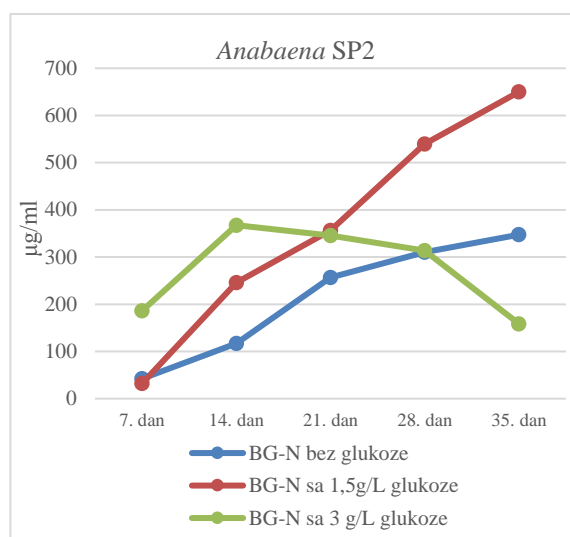
Grafik 26. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja AM2



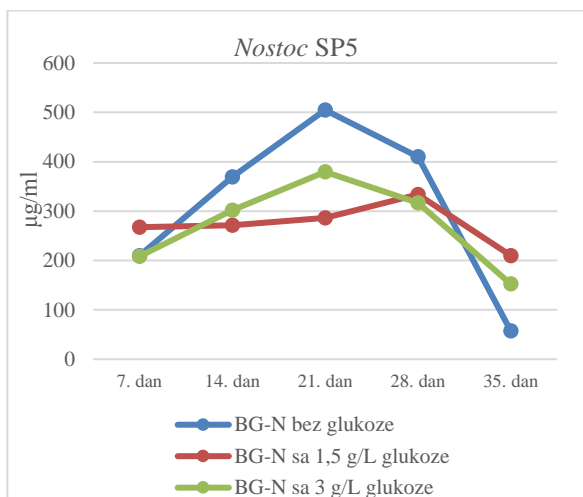
Grafik 27. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja OSP2



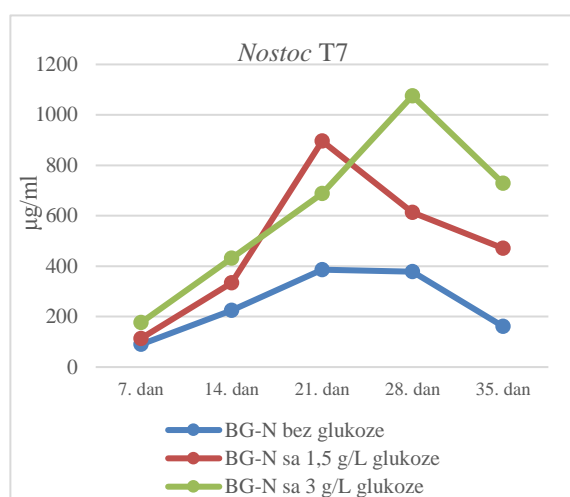
Grafik 28. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja CSP2



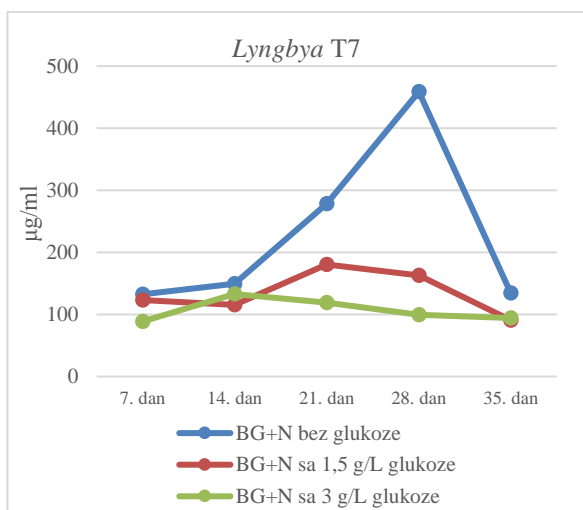
Grafik 29. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja ASP2



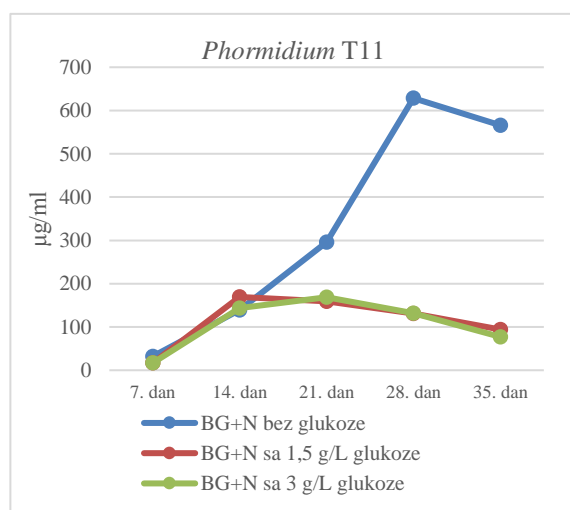
Grafik 30. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja NSP5



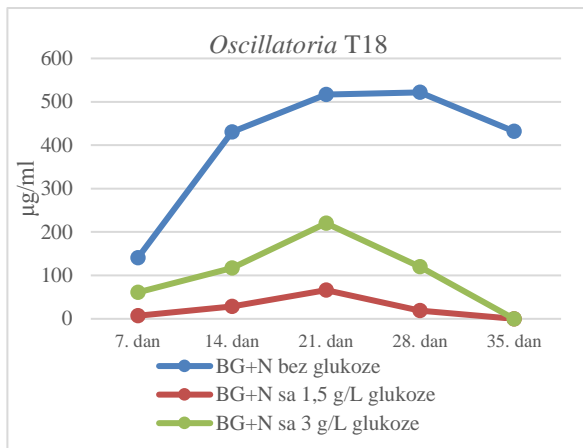
Grafik 31. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja NT7



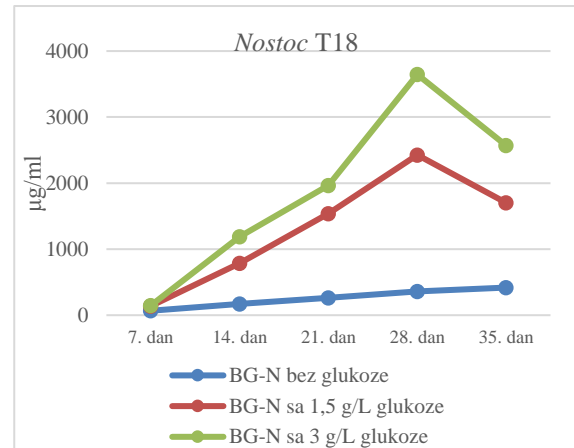
Grafik 32. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja LT7



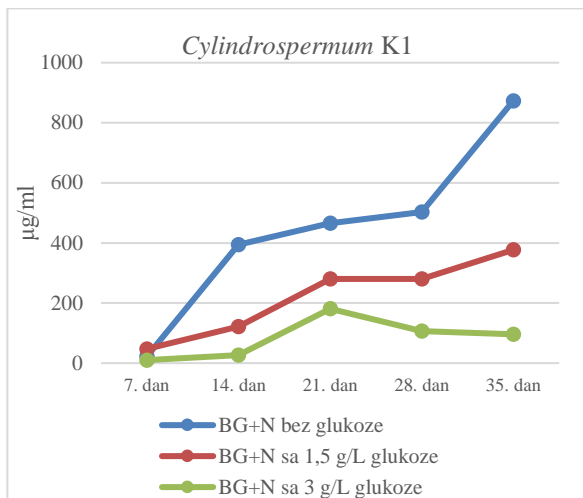
Grafik 33. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja PT11



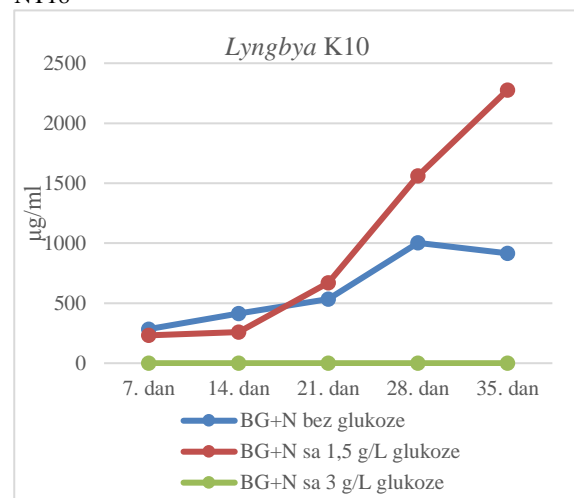
Grafik 34. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja OT18



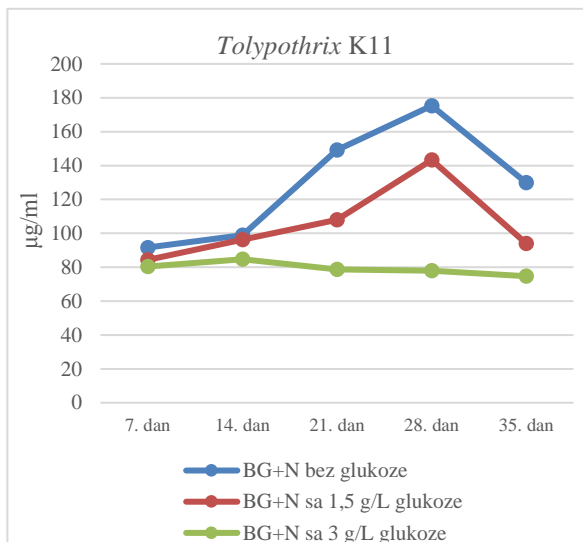
Grafik 35. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja NT18



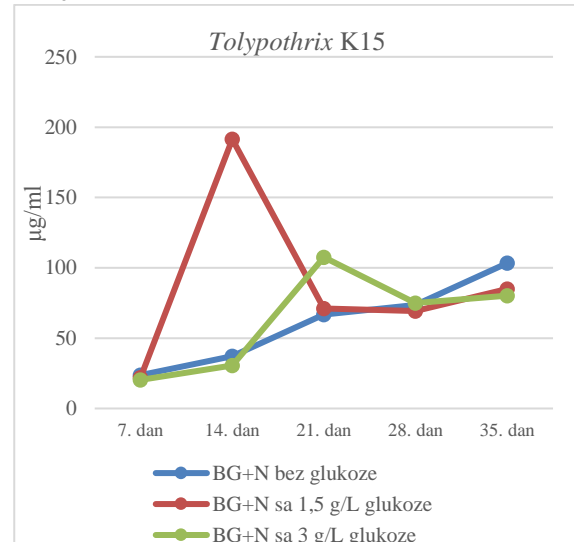
Grafik 36. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja CK1



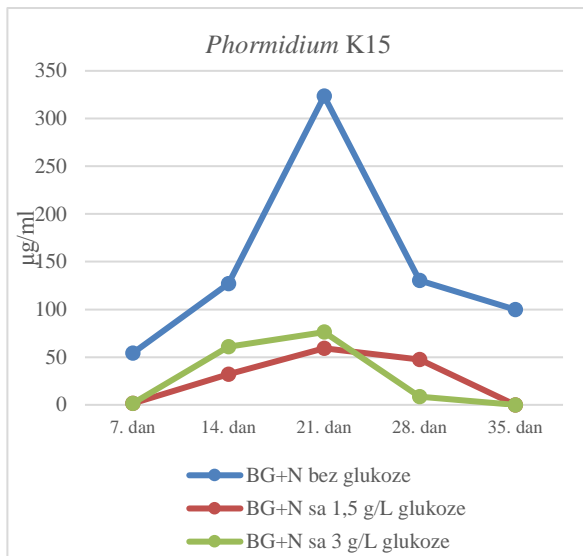
Grafik 37. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja LK10



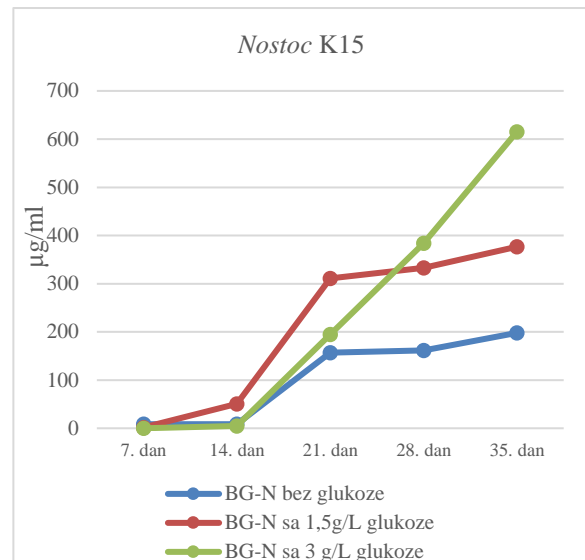
Grafik 38. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja TK11



Grafik 39. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja TK15



Grafik 40. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja PK15



Grafik 41. Uticaj glukoze na produkciju biomase soja NK15

Tabela 25. Uticaj glukoze na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina kod testiranih sojeva

Testirani soj	Koncentracija fikobiliproteina (mg/ml)				
	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan	35. dan
<b><i>Nostoc M1</i></b>					
PC*	0,00882	0,02022	0,06604	0,06315	0,05411
PC**	0,02911	0,113	0,23802	0,34412	1,037
PC***	0,04502	0,161	0,07749	0,05551	0,05086
APC*	0,00163	0,0191	0,01922	0,0293	0,00775
APC**	0,00877	0,04021	0,04606	0,08557	0,38407
APC***	0,00912	0,01377	0,03825	0,02562	0,02183
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Phormidium M1</i></b>					
PC*	0,00453	0,01184	0,05128	0,04197	0,03571
PC**	0,00688	0,01111	0,0421	0,04141	0,03305
PC***	0,01202	0,02286	0,0449	0,04146	0,0437
APC*	0,00616	0,01246	0,04632	0,04352	0,0365
APC**	0,01024	0,0095	0,04311	0,04191	0,03391
APC***	0,01046	0,02297	0,0419	0,04244	0,04414
PE*	0,00041	0,00664	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	0,00125	0,02762	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	0,0149	0,02314	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Oscillatoria M2</i></b>					
PC*	0,01137	0,02678	0,04658	0,04239	0,03878
PC**	0,05037	0,1772	0,04881	0,04146	0,04121
PC***	0,02749	0,03137	0,04671	0,0418	0,04036
APC*	0,0065	0,02381	0,051	0,04016	0,0432
APC**	0,017211	0,0655	0,04832	0,04364	0,04076
APC***	0,01581	0,06509	0,05289	0,04422	0,04368
PE*	0,01699	0,03164	0,06127	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Calothrix M2</i></b>					
PC*	0,02889	0,03584	0,04693	0,04336	0,03757
PC**	0,0082	0,0052	0,04944	0,04245	0,04249
PC***	0,00664	0,01384	0,04674	0,04249	0,04245
APC*	0,03369	0,0323	0,04481	0,04111	0,03928
APC**	0,00863	0,00875	0,05248	0,0426	0,0421
APC***	0,00371	0,01238	0,0492	0,04305	0,04123
PE*	n.d.	0,01627	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	0,00634	0,01246	n.d.	n.d.	n.d.



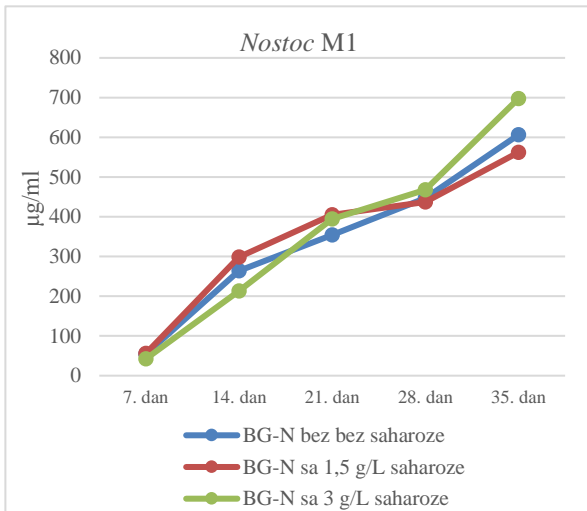
<b>Anabaena M2</b>					
PC*	0,03924	0,03556	0,0472	0,06485	0,05811
PC**	0,03542	0,03088	0,04498	0,04176	0,03764
PC***	0,05009	0,04644	0,0422	0,0451	0,03631
APC*	0,02928	0,04836	0,04629	0,0581	0,04836
APC**	0,02744	0,0304	0,04439	0,04024	0,03841
APC***	0,03918	0,04179	0,04201	0,04528	0,03876
PE*	0,00124	0,00399	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Oscillatoria SP2</b>					
PC*	0,00117	0,00664	0,04731	0,04769	0,04767
PC**	0,013975	0,04495	0,04752	0,05206	0,04414
PC***	0,0052	0,01311	0,05265	0,04605	0,03812
APC*	0,00204	0,00371	0,04947	0,05105	0,04976
APC**	0,013178	0,04189	0,04937	0,05327	0,04482
APC***	0,00875	0,00942	0,05444	0,04694	0,04078
PE*	0,001457	0,01034	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	0,00178	0,02808	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	0,000145	0,01543	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Calothrix SP2</b>					
PC*	0,00764	0,00837	0,00932	0,01146	0,00182
PC**	0,001002	0,00911	0,00846	0,00473	0,00177
PC***	0,01137	0,02178	0,00573	0,00573	0,00164
APC*	0,00367	0,00663	0,006	0,0055	0,00191
APC**	0,001055	0,00959	0,00563	0,00279	0,00132
APC***	0,0065	0,02401	0,00275	0,00275	0,00162
PE*	0,001587	0,00255	0,00724	0,00287	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Anabaena SP2</b>					
PC*	0,00493	0,02386	0,05431	0,0747	0,07835
PC**	0,0132	0,01449	0,07284	0,0749	0,14505
PC***	0,0102	0,01466	0,03944	0,04515	0,04111
APC*	0,01175	0,02293	0,04919	0,05643	0,0512
APC**	0,00842	0,01634	0,05042	0,05514	0,04855
APC***	0,00855	0,01434	0,04687	0,04196	0,04163
PE*	0,02955	0,00193	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	0,001548	0,01236	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	0,01661	0,01433	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Nostoc SP5</b>					
PC*	0,00091	0,002487	0,00646	0,00811	0,01746
PC**	0,00902	0,01557	0,01084	0,09907	0,00755
PC***	0,00035	0,01302	0,01093	0,02837	0,25907
APC*	0,00095	0,001	0,00963	0,00571	0,00526

APC**	0,00467	0,0153	0,01059	0,0125	0,02883
APC***	0,004	0,00581	0,01042	0,0115	0,06713
PE*	0,00128	0,0081	0,0134	0,0089	0,08743
PE**	0,0086	0,01189	0,01724	0,01637	0,04869
PE***	0,0133	0,0163	0,02249	0,02609	0,1387
<b><i>Nostoc T7</i></b>					
PC*	0,00173	0,00828	0,07743	0,02631	0,01029
PC**	0,00791	0,02149	0,02117	0,03475	0,06907
PC***	0,00473	0,00491	0,0112	0,06142	0,02722
APC*	0,00291	0,00763	0,07056	0,01785	0,00755
APC**	0,00067	0,01606	0,01687	0,01252	0,03005
APC***	0,00279	0,00079	0,00851	0,02638	0,01881
PE*	0,01165	0,04357	0,09383	0,02	0,01453
PE**	0,00812	0,02521	0,02511	0,01612	0,01965
PE***	0,00034	0,00674	0,01209	0,01436	0,01472
<b><i>Lyngbya T7</i></b>					
PC*	0,03941	0,0404	0,04151	0,04097	0,03908
PC**	0,04293	0,04992	0,04472	0,04095	0,04186
PC***	0,04347	0,04289	0,04295	0,04425	0,04117
APC*	0,04208	0,04083	0,04194	0,04005	0,04236
APC**	0,04278	0,05156	0,04619	0,04256	0,04362
APC***	0,04455	0,04437	0,04696	0,04472	0,04235
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Phormidium T11</i></b>					
PC*	0,01202	0,02304	0,04282	0,04562	0,05542
PC**	0,01757	0,01657	0,04706	0,04903	0,04336
PC***	0,00755	0,01075	0,04897	0,04699	0,04163
APC*	0,01046	0,02097	0,04398	0,04496	0,05691
APC**	0,01522	0,01526	0,04899	0,0504	0,04465
APC***	0,00467	0,0135	0,04881	0,04749	0,04283
PE*	0,02439	0,0169	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	0,02071	0,0203	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	0,001336	0,00662	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Oscillatoria T18</i></b>					
PC*	0,001275	0,00937	0,00946	0,00737	0,00602
PC**	0,00473	0,01384	0,01722	0,02469	0,02395
PC***	0,02833	0,03224	0,03389	0,03562	0,01849
APC*	0,001342	0,00659	0,00559	0,00667	0,00407
APC**	0,00279	0,01238	0,01922	0,02489	0,02193
APC***	0,02873	0,02956	0,03348	0,0364	0,01618
PE*	0,0001547	0,001253	0,00369	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

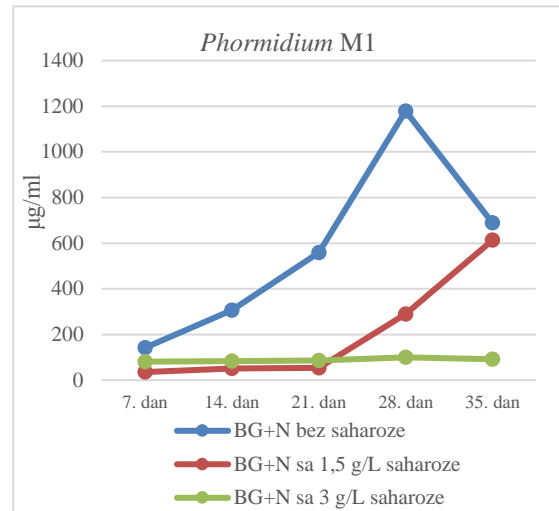
<b><i>Nostoc T18</i></b>					
PC*	0,00428	0,01931	0,02831	0,03431	0,0082
PC**	0,00755	0,03231	0,12067	0,23601	0,00026
PC***	0,00764	0,06169	0,18073	0,21329	0,05415
APC*	0,00779	0,01814	0,01777	0,01752	0,00863
APC**	0,00467	0,01761	0,05485	0,08002	0,003
APC***	0,00367	0,02338	0,04044	0,04409	0,02967
PE*	0,001254	0,01012	0,01447	0,02175	n.d.
PE**	0,00325	0,00457	0,01362	n.d.	n.d.
PE***	0,00264	0,00359	0,00585	n.d.	n.d.
<b><i>Cylindrospermum K1</i></b>					
PC*	0,00737	0,01366	0,05006	0,04092	0,03897
PC**	0,01857	0,01175	0,04842	0,04067	0,04329
PC***	0,0102	0,10121	0,06914	0,06523	0,06636
APC*	0,00667	0,01438	0,05106	0,04186	0,04135
APC**	0,01518	0,01346	0,04714	0,04237	0,04426
APC***	0,00855	0,0945	0,06851	0,06658	0,06723
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Lyngbya K10</i></b>					
PC*	0,00546	0,00637	0,03024	0,02722	0,01849
PC**	0,00082	0,02642	0,02986	0,02586	0,05956
PC***	0,0054	0,02012	0,02581	0,02566	0,01455
APC*	0,00575	0,00671	0,02965	0,01881	0,01618
APC**	0,00195	0,02781	0,02269	0,02285	0,04738
APC***	0,001588	0,01987	0,02264	0,02023	0,0221
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Tolypothrix K11</i></b>					
PC*	0,05215	0,041	0,04942	0,04659	0,04457
PC**	0,04643	0,04423	0,06095	0,0453	0,04572
PC***	0,04759	0,04468	0,0779	0,04791	0,04622
APC*	0,01218	0,04206	0,05048	0,04642	0,0456
APC**	0,04712	0,04492	0,06197	0,04637	0,04725
APC***	0,04867	0,0455	0,07762	0,04726	0,04723
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Tolypothrix K15</i></b>					
PC*	0,00846	0,02113	0,05497	0,04245	0,03758
PC**	0,01266	0,02113	0,04343	0,0383	0,03962
PC***	0,04444	0,04561	0,04446	0,04581	0,04787
APC*	0,00563	0,02006	0,05524	0,0425	0,0394

APC**	0,01442	0,02006	0,04615	0,04097	0,04072
APC***	0,03803	0,04959	0,0457	0,04964	0,04885
PE*	0,0247	0,0099	0,00012	n.d.	n.d.
PE**	0,00126	0,0237	0,00015	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Phormidium K15</b>					
PC*	0,00473	0,0112	0,0993	0,0092	0,00373
PC**	0,00246	0,00837	0,03316	0,02469	0,01757
PC***	0,02104	0,03142	0,02404	0,05056	0,001
APC*	0,00279	0,0085	0,09358	0,00283	0,00859
APC**	0,00587	0,00663	0,03052	0,02489	0,01522
APC***	0,02106	0,02761	0,02093	0,04775	0,01486
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Nostoc K15</b>					
PC*	0,00026	0,0032	0,04213	0,03532	0,04318
PC**	0,00455	0,05202	0,05431	0,04392	0,04953
PC***	0,00479	0,01228	0,05063	0,0639	0,11203
APC*	0,003	0,00883	0,04281	0,03871	0,04446
APC**	0,00479	0,00883	0,05258	0,04174	0,0458
APC***	0,00746	0,00916	0,05143	0,0467	0,06128
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

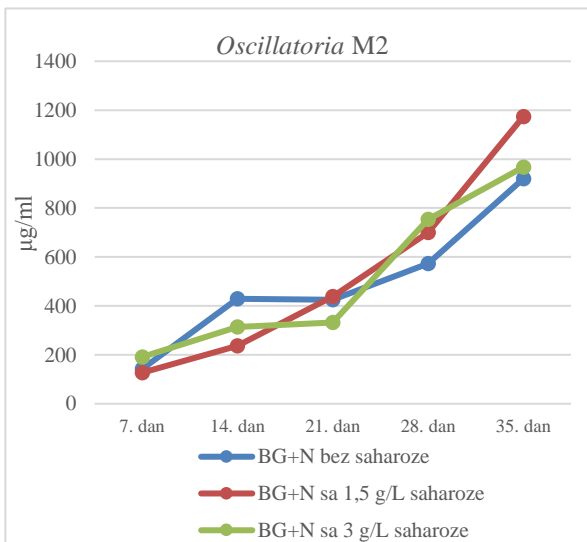
PC\*, APC\*, PE\* - mineralni medijum BG-11 bez dodatka glukoze;  
 PC\*\*, APC\*\*, PE\*\* - mineralni medijum BG-11 sa 1,5 g/L glukoze;  
 PC\*\*\*, APC\*\*\*, PE\*\*\* - mineralni medijum BG-11 sa 3g/L glukoze.  
 n.d. – nije detektovano



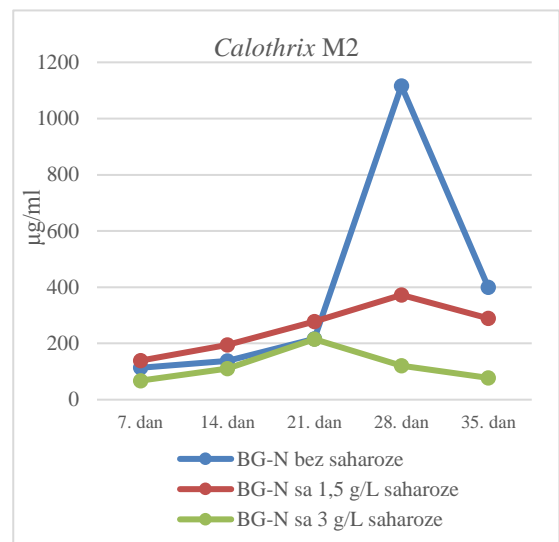
Grafik 43. Uticaj saharaoze na produkciju biomase soja NM1



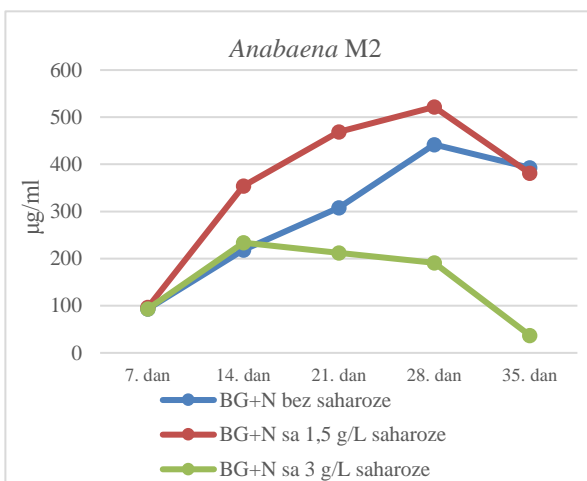
Grafik 44. Uticaj saharaoze na produkciju biomase soja PM1



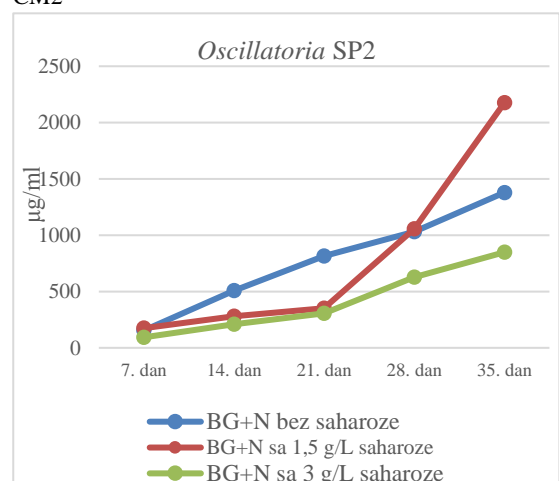
Grafik 45. Uticaj saharaoze na produkciju biomase soja OM2



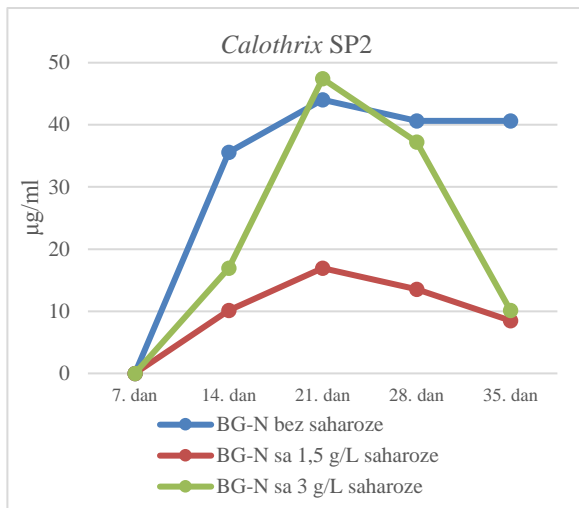
Grafik 46. Uticaj saharaoze na produkciju biomase soja CM2



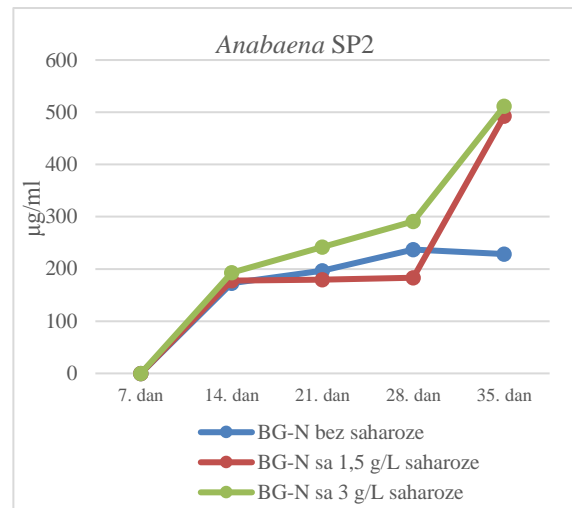
Grafik 47. Uticaj saharaoze na produkciju biomase soja AM2



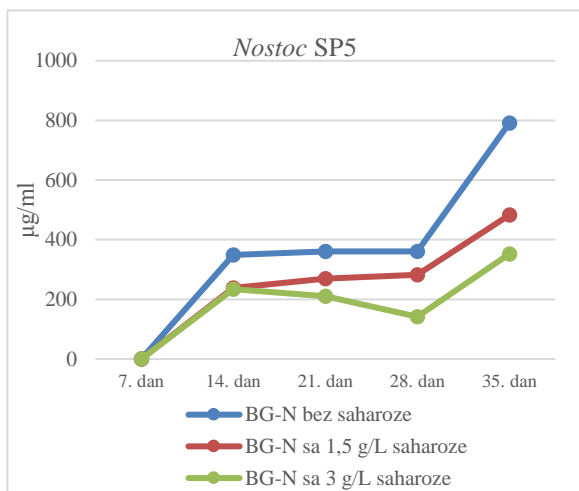
Grafik 48. Uticaj saharaoze na produkciju biomase soja OSP2



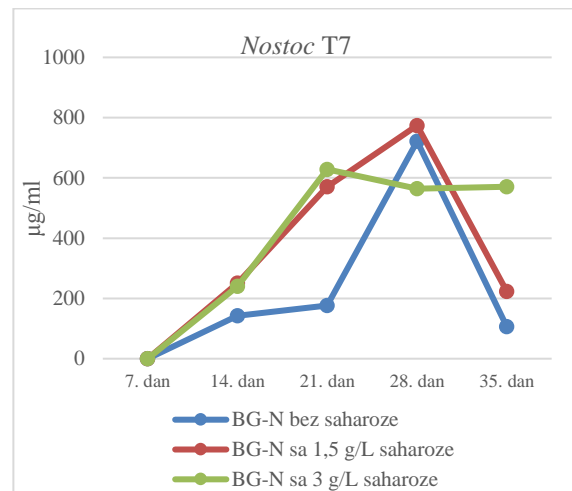
Grafik 49. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja CSP2



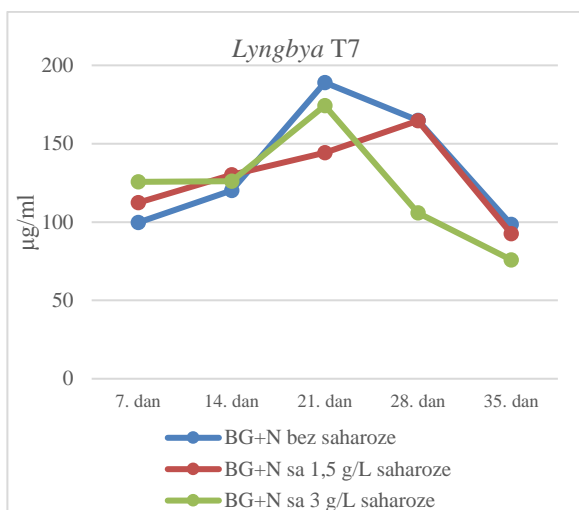
Grafik 50. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja ASP2



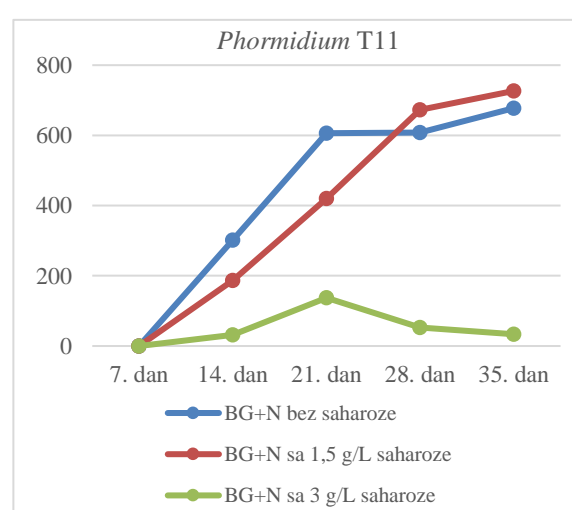
Grafik 51. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja NSP5



Grafik 52. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja NT7

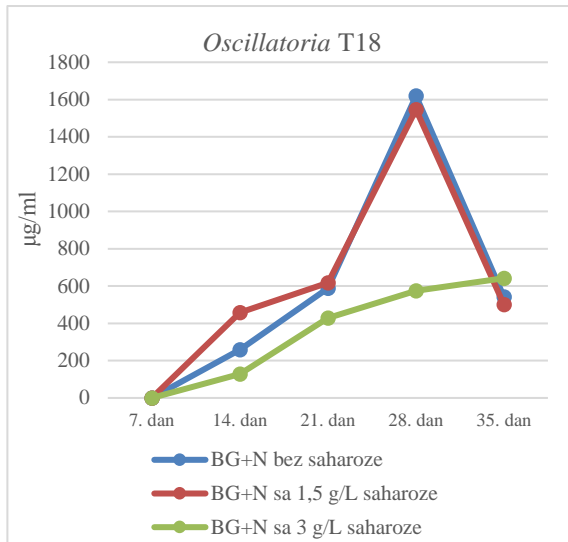


Grafik 53. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja LT7

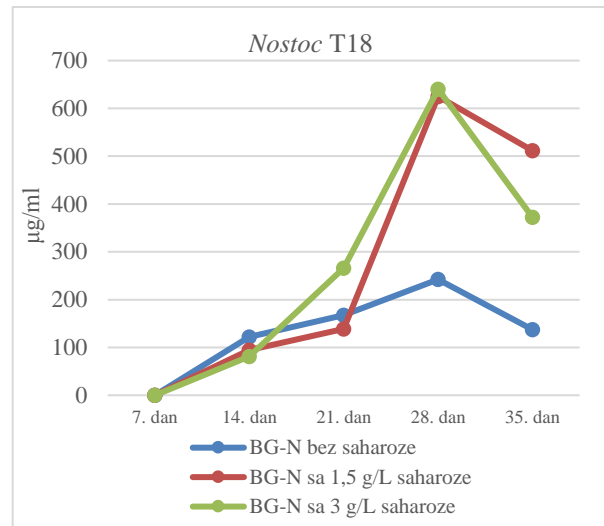


Grafik 54. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja PT11

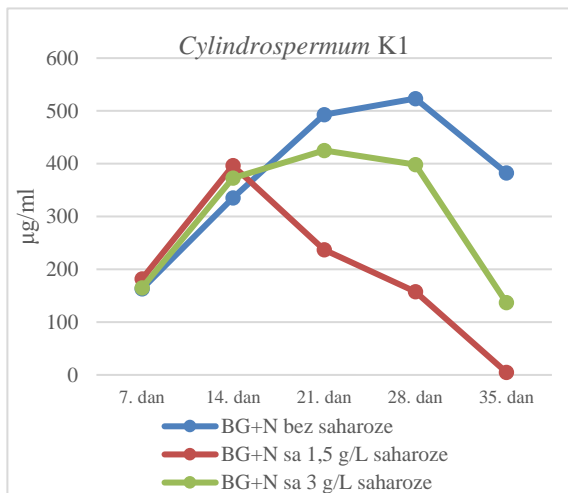




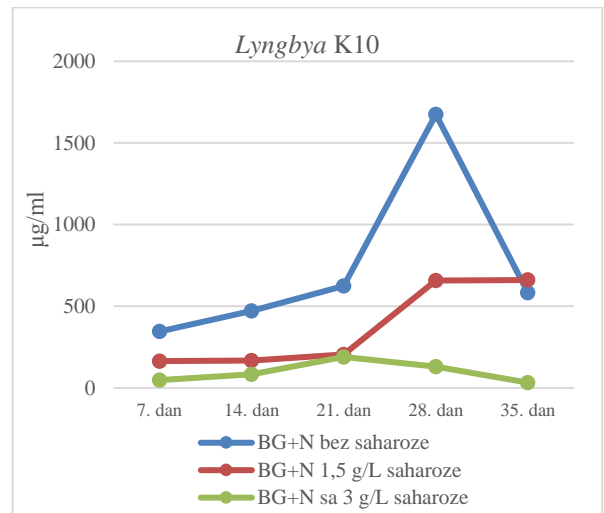
Grafik 55. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja OT18



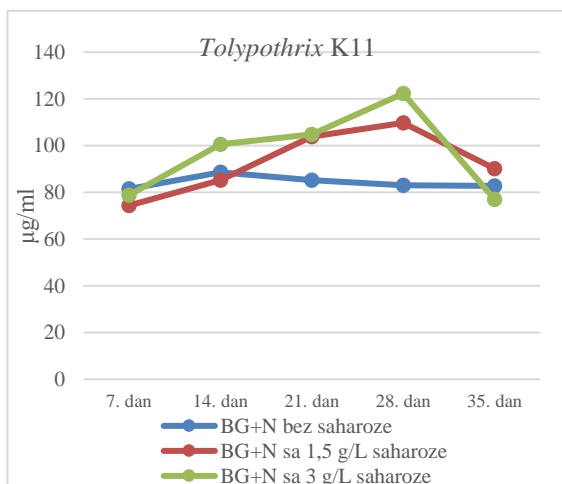
Grafik 56. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja NT18



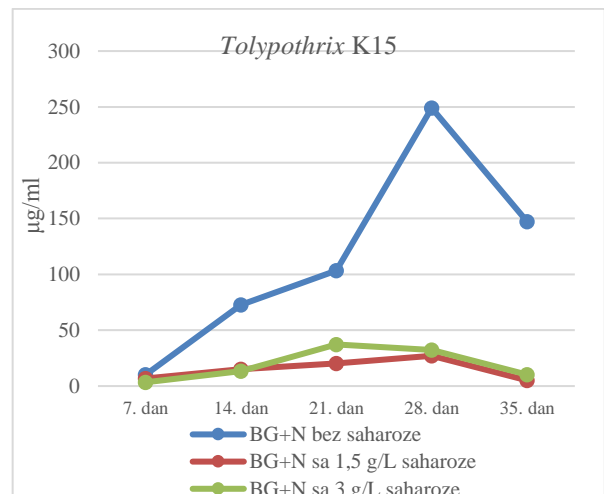
Grafik 57. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja CK1



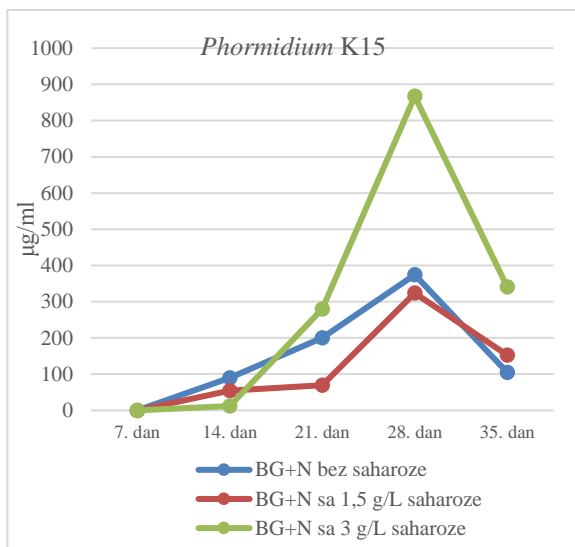
Grafik 58. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja LK10



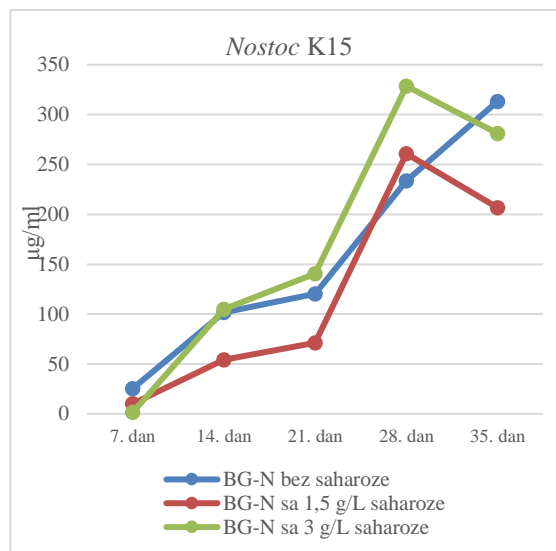
Grafik 59. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja TK11



Grafik 60. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja TK15



Grafik 61. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja PK15



Grafik 62. Uticaj saharoze na produkciju biomase soja NK15

Tabela 27. Uticaj saharoze na sadržaj pojedinačnih fikobiliproteina kod testiranih sojeva

Testirani soj	Koncentracija fikobiliproteina (mg/ml)				
	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan	35. dan
<b><i>Nostoc M1</i></b>					
PC*	0,00664	0,00606	0,02764	0,02937	0,10015
PC**	0,01102	0,02402	0,04966	0,07189	0,11671
PC***	0,01135	0,03142	0,06775	0,05822	0,04675
APC*	0,00285	0,00263	0,00371	0,00577	0,02779
APC**	0,00997	0,0105	0,01291	0,03193	0,03209
APC***	0,02761	0,0109	0,01118	0,01203	0,01754
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Phormidium M1</i></b>					
PC*	0,00282	0,01657	0,03498	0,00773	0,00273
PC**	0,00464	0,01766	0,03362	0,02004	0,00835
PC***	0,00737	0,01949	0,01566	0,01202	0,00524
APC*	0,00187	0,01526	0,03244	0,00287	0,00267
APC**	0,00379	0,01422	0,03648	0,0211	0,00432
APC***	0,00667	0,01614	0,0143	0,01046	0,01416
PE*	0,00157	0,00223	0,00651	n.d.	n.d.
PE**	0,0012	0,00176	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	0,00245	0,00124	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Oscillatoria M2</i></b>					
PC*	0,00235	0,0082	0,02989	0,02278	0,00664
PC**	0,01657	0,02387	0,03744	0,01493	0,00928
PC***	0,02113	0,04318	0,08481	0,03671	0,01949
APC*	0,00408	0,00863	0,03365	0,02397	0,00371
APC**	0,01526	0,02293	0,03832	0,01134	0,00759
APC***	0,02006	0,04107	0,07724	0,03536	0,01614
PE*	0,00214	0,00531	0,00421	0,0032	0,0014
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Calothrix M2</i></b>					
PC*	0,002	0,00655	0,01166	0,02631	0,00691
PC**	0,00508	0,0184	0,0194	0,01549	0,00648
PC***	0,00146	0,01175	0,02195	0,00579	0,00235
APC*	0,00245	0,01446	0,01785	0,00471	0,00071
APC**	0,0012	0,01718	0,01714	0,0163	0,00084
APC***	0,00408	0,00591	0,01346	0,02201	0,00497
PE*	0,00418	0,00117	0,00293	0,0035	0,00652
PE**	0,00101	0,00228	0,00262	0,00197	0,00105
PE***	0,00579	0,00185	0,00631	0,0045	0,00356

<b>Anabaena M2</b>					
PC*	0,03186	0,05946	0,06204	0,09851	0,06957
PC**	0,03493	0,04855	0,12804	0,07831	0,07775
PC***	0,00534	0,01182	0,01184	0,00555	0,00648
APC*	0,00354	0,01938	0,02261	0,02387	0,01309
APC**	0,00299	0,01052	0,01668	0,01573	0,01077
APC***	0,0015	0,02671	0,01246	0,00475	0,00084
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Oscillatoria SP2</b>					
PC*	0,01549	0,01466	0,02178	0,01775	0,00784
PC**	0,02122	0,02049	0,09027	0,03269	0,01478
PC***	0,0184	0,045	0,05894	0,03086	0,02924
APC*	0,01434	0,02401	0,0163	0,01263	0,01322
APC**	0,01906	0,0161	0,08299	0,0243	0,02456
APC***	0,01718	0,04299	0,05438	0,02969	0,02265
PE*	0,00105	0,002261	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Calothrix SP2</b>					
PC*	0,0120	0,0124	0,01475	0,01349	0,00173
PC**	0,00185	0,00264	0,00555	0,01249	0,00546
PC***	0,00123	0,001	0,00191	0,01066	0,00546
APC*	0,00101	0,001	0,01334	0,01638	0,00291
APC**	0,00211	0,00387	0,00475	0,01642	0,00575
APC***	0,00354	0,0084	0,0091	0,0145	0,00575
PE*	0,00156	0,00187	0,01774	0,05295	0,00143
PE**	0,00185	0,00371	0,00781	0,02555	0,00668
PE***	0,00019	0,00059	0,00268	0,02499	0,00668
<b>Anabaena SP2</b>					
PC*	0,00262	0,00326	0,01682	0,03522	0,03822
PC**	0,00896	0,01382	0,02282	0,04466	0,00206
PC***	0,0648	0,01382	0,0222	0,05984	0,07704
APC*	0,00127	0,0013	0,00312	0,01848	0,01836
APC**	0,00154	0,00142	0,00106	0,01204	0,01312
APC***	0,0011	0,00142	0,00806	0,01262	0,01877
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Nostoc SP5</b>					
PC*	0,00217	0,01575	0,00937	0,00035	0,00026
PC**	0,00853	0,00928	0,00355	0,00574	0,0042
PC***	0,0124	0,0253	0,03033	0,01884	0,01284
APC*	0,00497	0,00659	0,0133	0,01235	0,003

APC**	0,00216	0,00483	0,00759	0,01246	0,00879
APC***	0,00085	0,001	0,02865	0,01242	0,01218
PE*	0,00217	0,00418	0,01314	0,019	0,01062
PE**	0,00289	0,00705	0,00999	0,03064	0,0229
PE***	0,00552	0,00787	0,03664	0,07105	0,01449
<b><i>Nostoc T7</i></b>					
PC*	0,00056	0,001	0,00173	0,00902	0,00346
PC**	0,00453	0,00986	0,01028	0,00946	0,00808
PC***	0,00237	0,00473	0,01475	0,01217	0,00526
APC*	0,00126	0,00142	0,00291	0,01059	0,00583
APC**	0,00101	0,001	0,00755	0,00559	0,00132
APC***	0,00253	0,00279	0,01334	0,00249	0,0032
PE*	0,0015	0,00159	0,00243	0,02068	0,00687
PE**	0,00351	0,00787	0,00362	0,00246	0,00269
PE***	0,00113	0,00165	0,00312	0,01074	0,01559
<b><i>Lyngbya T7</i></b>					
PC*	0,04256	0,04379	0,04409	0,0421	0,0454
PC**	0,04231	0,05588	0,04472	0,04219	0,04153
PC***	0,04082	0,05822	0,05532	0,04801	0,04191
APC*	0,04359	0,04543	0,04542	0,04311	0,04746
APC**	0,043	0,0563	0,04619	0,04321	0,04284
APC***	0,04187	0,058	0,05582	0,04955	0,04302
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n..d	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Phormidium T11</i></b>					
PC*	0,000562	0,00091	0,00837	0,00793	0,00082
PC**	0,00578	0,01128	0,05402	0,02687	0,01291
PC***	0,0021	0,01393	0,02204	0,0284	0,01111
APC*	0,00051	0,00095	0,00663	0,01163	0,00195
APC**	0,0021	0,0075	0,05358	0,02281	0,00046
APC***	0,00862	0,01138	0,02101	0,01677	0,0095
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Oscillatoria T18</i></b>					
PC*	0,0121	0,01757	0,01028	0,00464	0,00464
PC**	0,01467	0,01684	0,0264	0,00637	0,00664
PC***	0,0286	0,0408	0,05529	0,03515	0,00091
APC*	0,0123	0,01522	0,00755	0,00379	0,00379
APC**	0,0102	0,01226	0,01685	0,00671	0,00371
APC***	0,0201	0,0342	0,05054	0,03044	0,00095
PE*	0,00247	0,00952	0,0052	n.d.	n.d.
PE**	0,00596	0,00934	0,0049	n.d.	n.d.
PE***	0,0028	0,00124	0,0001	n.d.	n.d.

<b><i>Nostoc T18</i></b>					
PC*	0,00214	0,00346	0,02304	0,00644	0,00828
PC**	0,00326	0,00837	0,00928	0,01763	0,02155
PC***	0,00098	0,001	0,00946	0,01873	0,02584
APC*	0,00384	0,00583	0,02097	0,00395	0,00763
APC**	0,00428	0,00663	0,00759	0,00642	0,0041
APC***	0,00362	0,00586	0,00559	0,00222	0,01189
PE*	0,00512	0,00712	0,01939	0,0399	0,00134
PE**	0,00482	0,00577	0,00705	0,02885	0,04268
PE***	0,0025	0,00459	0,01269	0,00934	0,01866
<b><i>Cylindrospermum K1</i></b>					
PC*	0,0125	0,0364	0,04018	0,00717	0,00164
PC**	0,0212	0,02395	0,00837	0,00273	0,00355
PC***	0,029	0,05702	0,04609	0,03886	0,03753
APC*	0,01556	0,0214	0,0412	0,00228	0,00391
APC**	0,01985	0,02193	0,00663	0,00287	0,00483
APC***	0,0345	0,05346	0,04195	0,03732	0,001
PE*	0,00231	0,0121	0,0259	0,00101	n.d.
PE**	0,00399	0,0052	0,01484	n.d.	n.d.
PE***	0,00487	0,00641	0,05812	n.d.	n.d.
<b><i>Lyngbya K10</i></b>					
PC*	0,003	0,00546	0,08063	0,02678	0,0102
PC**	0,01011	0,01202	0,02187	0,03871	0,01475
PC***	0,01457	0,05976	0,03398	0,01666	0,0072
APC*	0,00012	0,00575	0,0794	0,02381	0,00855
APC**	0,00955	0,01046	0,02301	0,03528	0,01334
APC***	0,01534	0,05634	0,03248	0,01426	0,00867
PE*	0,00532	0,00821	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Tolypothrix K11</i></b>					
PC*	0,00125	0,02113	0,0194	0,00655	0,00546
PC**	0,01358	0,01931	0,01913	0,00455	0,00344
PC***	0,02496	0,24534	0,12372	0,09565	0,02386
APC*	0,0132	0,02006	0,01714	0,00471	0,00575
APC**	0,0129	0,01814	0,02014	0,00624	0,00479
APC***	0,0154	0,23308	0,12148	0,08975	0,02293
PE*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Tolypothrix K15</i></b>					
PC*	0,01164	0,01182	0,01275	0,003	0,00273
PC**	0,01102	0,01255	0,01895	0,0082	0,00646
PC***	0,01966	0,0512	0,0338	0,03298	0,02222
APC*	0,0035	0,00175	0,01342	0,00287	0,00012



APC**	0,00487	0,01051	0,02214	0,00863	0,00571
APC***	0,01414	0,05171	0,03448	0,03252	0,01901
PE*	0,0021	0,01018	n.d.	n.d.	n.d.
PE**	0,00018	0,0004	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Phormidium K15</b>					
PC*	0,0125	0,01384	0,00546	0,00246	0,01211
PC**	0,0366	0,06247	0,00637	0,0102	0,02286
PC***	0,0298	0,04062	0,12417	0,07734	0,01913
APC*	0,0101	0,01238	0,00575	0,00587	0,00946
APC**	0,0251	0,04826	0,00671	0,00855	0,02297
APC***	0,0152	0,0362	0,11648	0,07156	0,02014
PE*	n.d.	n.d.	0,00253	n.d.	n.d.
PE**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PE***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Nostoc K15</b>					
PC*	0,00464	0,01293	0,02569	0,0062	0,00062
PC**	0,00282	0,01166	0,01957	0,00746	0,00246
PC***	0,01193	0,01484	0,00391	0,004	0,00326
APC*	0,00379	0,01142	0,02485	0,00871	0,007
APC**	0,00187	0,01446	0,01514	0,00587	0,00567
APC***	0,01146	0,01234	0,00083	0,00016	0,00013
PE*	0,00452	0,02118	0,02411	0,03112	0,01628
PE**	0,00296	0,01139	0,03252	0,02053	0,0195
PE***	0,0135	0,01577	0,02186	0,01963	0,01837

PC\*, APC\*, PE\* - mineralni medijum BG-11 bez dodatka saharoze;

PC\*\*, APC\*\*, PE\*\* - mineralni medijum BG-11 sa 1,5 g/L saharoze;

PC\*\*\*, APC\*\*\*, PE\*\*\* - mineralni medijum BG-11 sa 3g/L saharoze.

n.d. -nije detektovano

## Prilog 6.

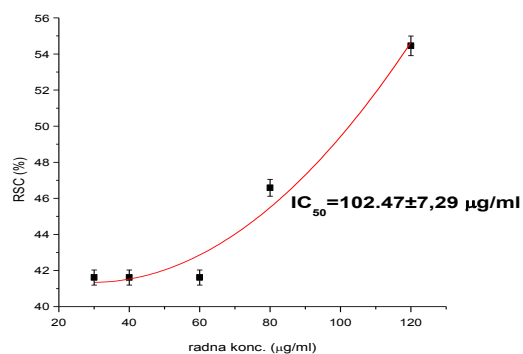
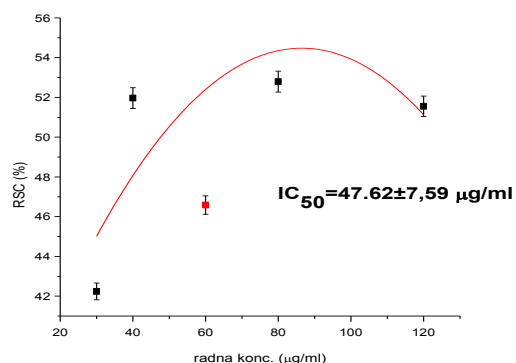
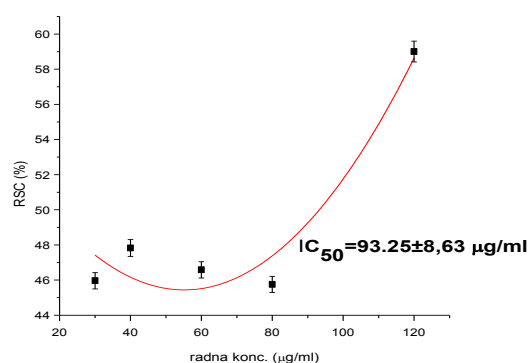
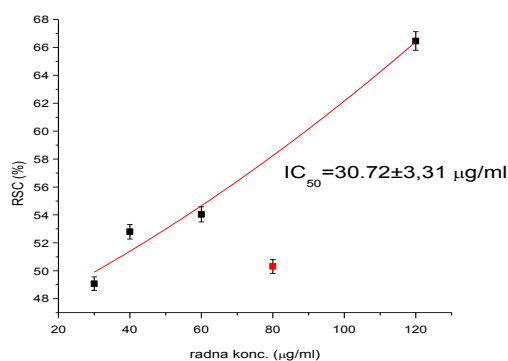
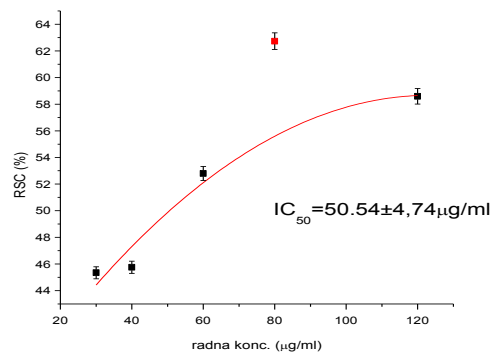
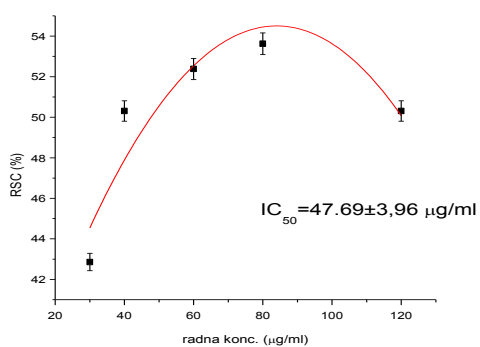
Tabela 32. Analizirane masne kiseline primenom metode gasne hromatografije GC-FID kod 20 cijanobakterijskih sojeva

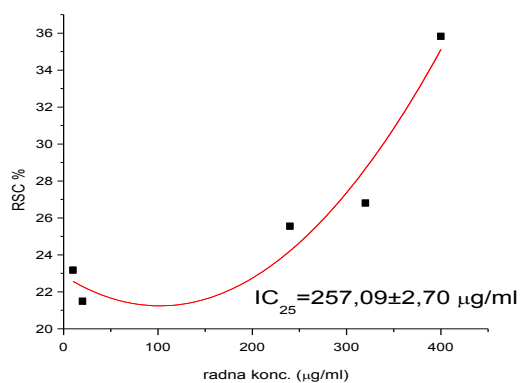
Masna kiselina	Trivijalni naziv (hemijski naziv)	Tip	Hemijska struktura
6;0	Kaprnska kis. (heksanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8;0	Kaprilna kis. (oktanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10;0	Kaprinska kis. (dekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
11;0	Undekanska kis. (undekanoinska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
12;0	Laurinska kis. (dodekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
13;0	(tridekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$
14;0	Miristinska kis. (tetradekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
14;1	Miristoleinska kis. (5-tetradecenska kis.)	Mononezasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
15;0	(pentadekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$
15;1	Cis-10-pentadekanska kis.	Nezasićena masna kis.	
16;0	Palmitinska kis. (heksadekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
16;1	Palmitoleinska kis. (9-heksadecenska kis.)	Mononezasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
17;0	(heptadekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$
17;1	Cis-10-heptadekanska kis.	Nezasićena masna kis.	
18;0	Stearinska kis. (oktadekanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
18;1n9t	Elaidinska kis.	Mononezasićena masna kis.	Trans izomer oleinske kiseline
18;1n9c	Oleinska kiselina (9-oktadecenska kis.)	Mononezasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18;2n6t	Linoleinska kis. (TFA)	Polinezasićena masna kis.	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18;2n6c*	Linolna kis. (TA)	Polinezasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18;3n6c	$\gamma$ -linolenska kis. (GLA) (6,9,12-oktadekatrienska kis.)	Polinezasićena masna kis.	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{C}^{12}\text{H}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}^9\text{H}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}^6\text{H}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$
18;3n3*	$\alpha$ -linoleinska kis. (ALA) (9,12,15-oktadekatrienska kis.)	Polinezasićena masna kis.	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}^{15}\text{H}=\text{CH}-\text{C}^{12}\text{H}_2-\text{CH}=\text{CH}^9-\text{CH}_2-\text{C}^9\text{H}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
20;0	Arahinska kis. (eikozanska kis.)	Zasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
20;1n9	Cis-11-eikozenoinska kis.	Mononezasićena masna kis.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

20;2	Cis-11,14-eikozadienoinska kis.	Nezasićena masna kis.	$C_{19}H_{35}CO_2H$
20;3n6	Cis-8,11,14-eikozatrienoinska kis.	Nezasićena masna kis.	
20;3n3	Cis-11,14,17-eikozatrienoinska kis.	Nezasićena masna kis.	$C_{19}H_{33}CO_2H$
20;4n6*	Arahidonska kis. (5,8,11,14-eikozatetraenska kis.)	Polinezasićena masna kis.	$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_3-COOH$
20;5n3	Eikozapentaenska kis. (EPA) (7,10,13,16,19-eikozapentaenska kis.)	Polinezasićena masna kis.	
21;0	Heneikozanoinska kis.	Zasićena masna kis.	$CH_3(CH_2)_{19}COOH$
22;0	Behenska kis. (dokozaenska kis.)	Zasićena masna kis.	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
22;1n9	Eruka kis. (13-dokozaenska)	Mononezasićena masna kis.	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$
22;2	Cis-13,16-dokozadienoinska kis.	Polinezasićena masna kis.	
22;6n3	Cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenoinska kis	Polinezasićena masna kis.	
23;0	Trikozilna kis.	Zasićena masna kis.	$CH_3(CH_2)_{21}COOH$
24;0	Lignocerinska kis. (tetrakozanska kis.)	Zasićena masna kis.	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
24;1n9	Nervonska kis.	Mononezasićena masna kis.	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$

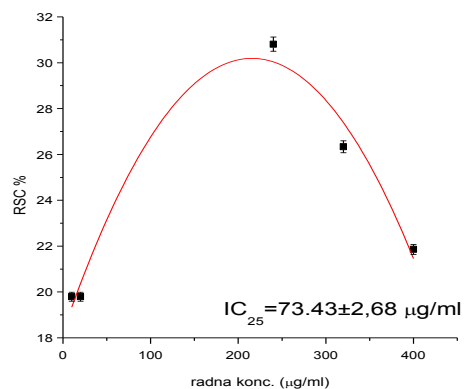
\* - esencijalne masne kiseline

## Prilog 7

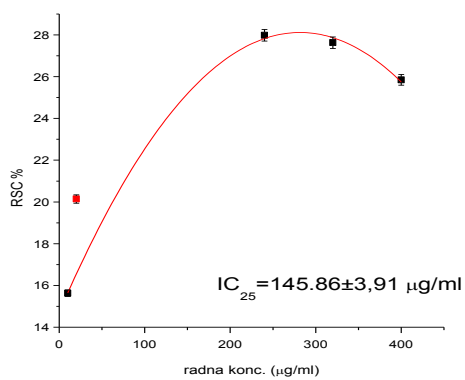
Grafik 66. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Nostoc* M1Grafik 67. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Phormidium* M1Grafik 68. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Oscillatoria* M2Grafik 69. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Calothrix* M2Grafik 70. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Anabaena* M2Grafik 71. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Oscillatoria* SP2



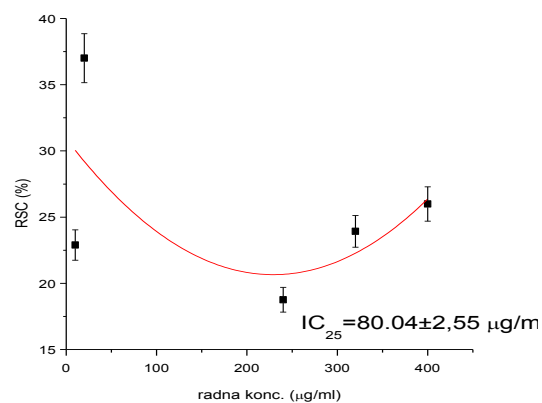
Grafik 72. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Calothrix* SP2



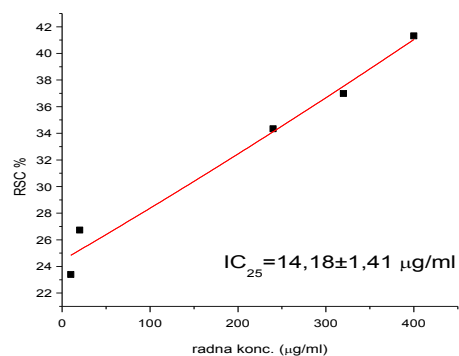
Grafik 73. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Anabaena* SP2



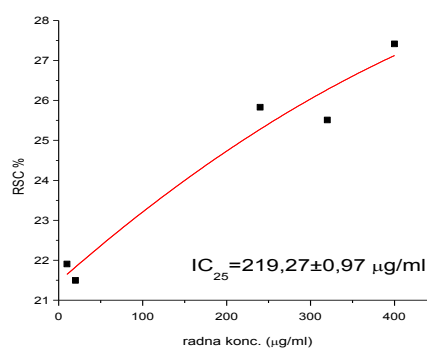
Grafik 74. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Nostoc* SP5



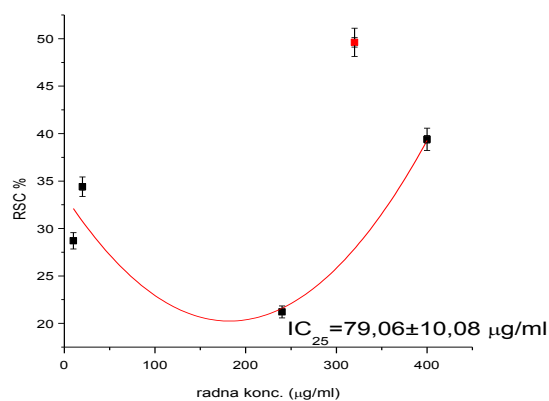
Grafik 75. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Nostoc* T7



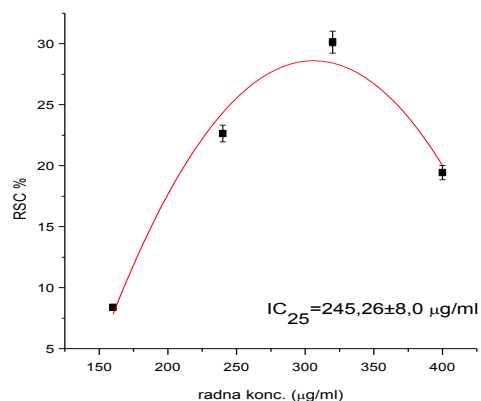
Grafik 76. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Lyngbya* T7



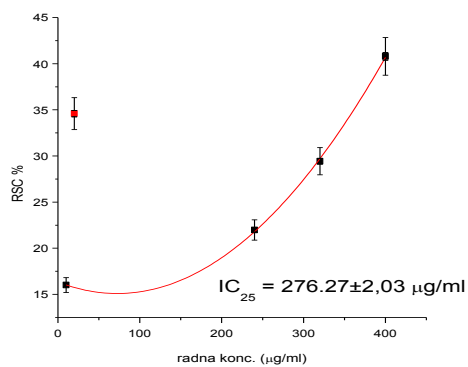
Grafik 77. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Phormidium* T11



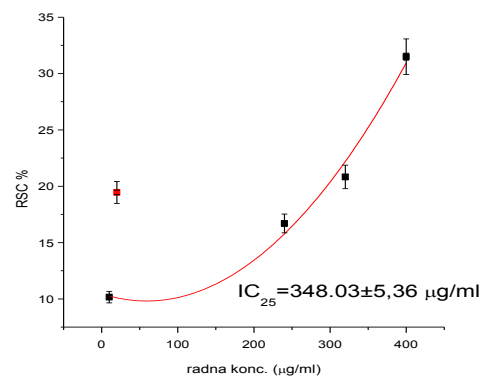
Grafik 78. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Oscillatoria* T18



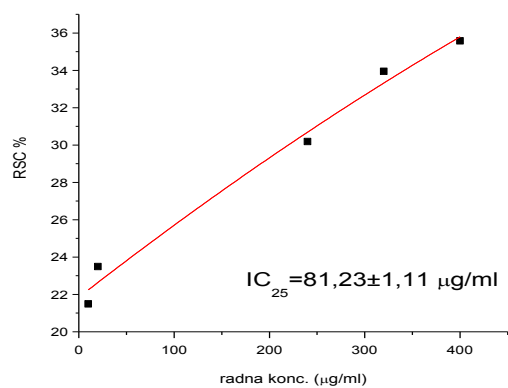
Grafik 79. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Nostoc* T18



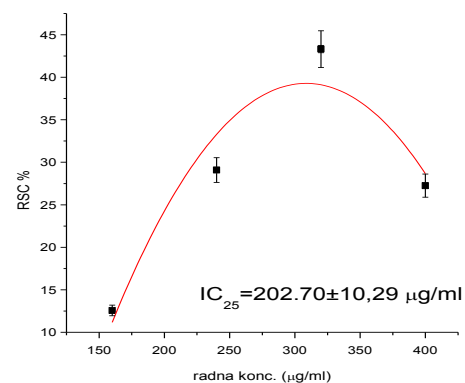
Grafik 80. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Lyngbya* K10



Grafik 81. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Tolypothrix* K15

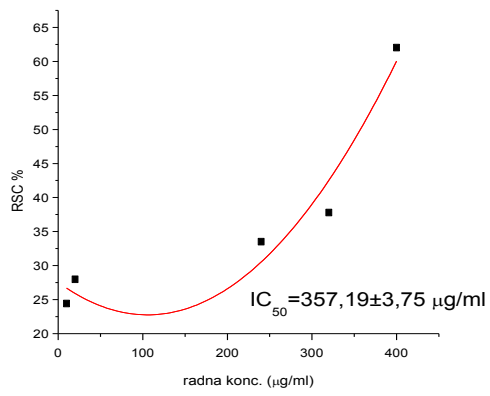


Grafik 82. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Phormidium* K15

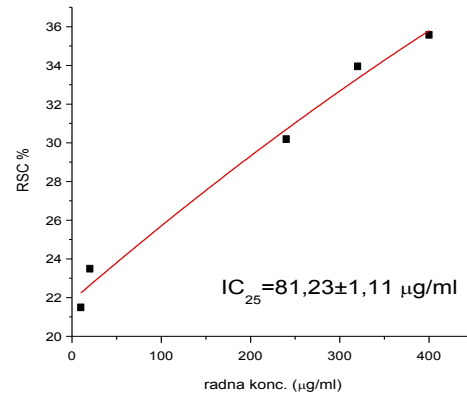


Grafik 83. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Nostoc* K15



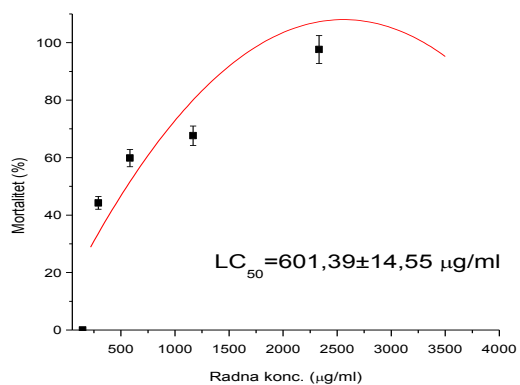
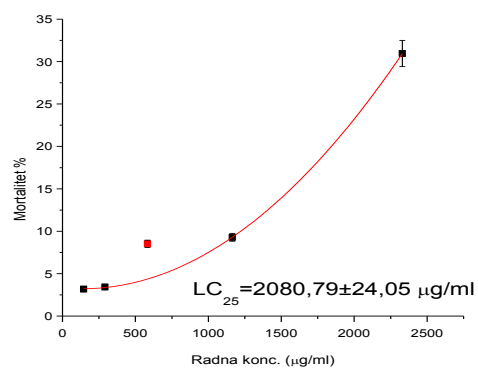
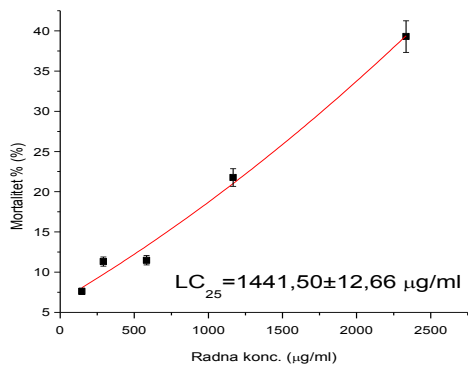
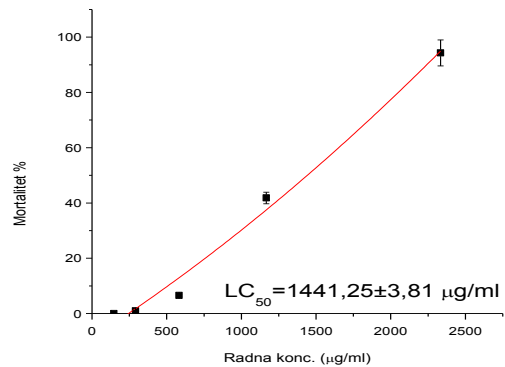
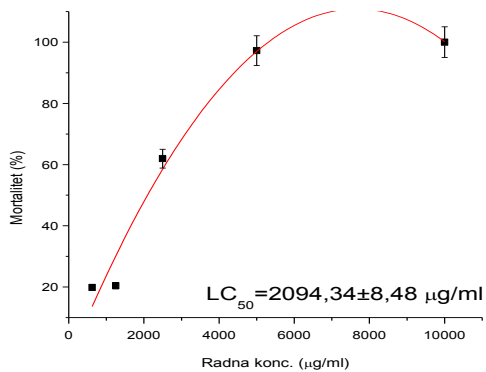
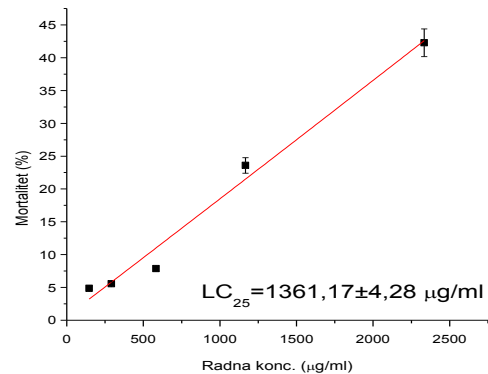


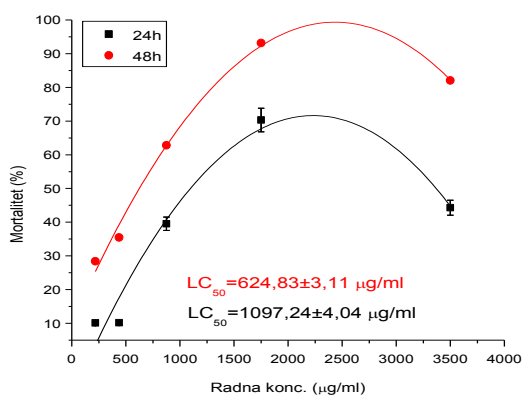
Grafik 84. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Cylindrospermum* K1



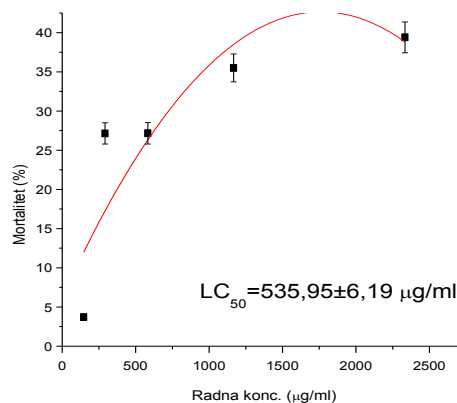
Grafik 85. Rezultati DPPH testa dobijeni za *Phormidium* K15

## Prilog 8.

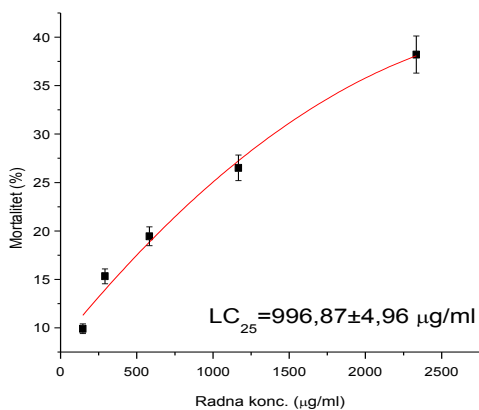
Grafik 87. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Nostoc* M1Grafik 88. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Phormidium* M1Grafik 89. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Calothrix* M2Grafik 90. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Oscillatoria* M2Grafik 91. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Oscillatoria* SP2Grafik 92. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Nostoc* SP5



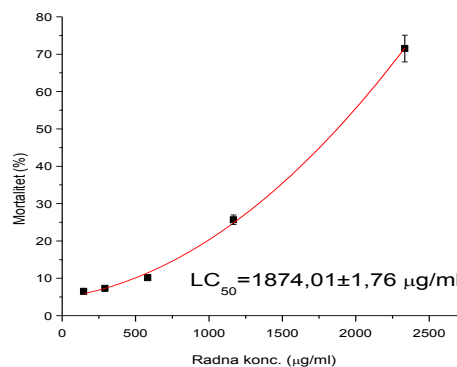
Grafik 93. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Nostoc* T7



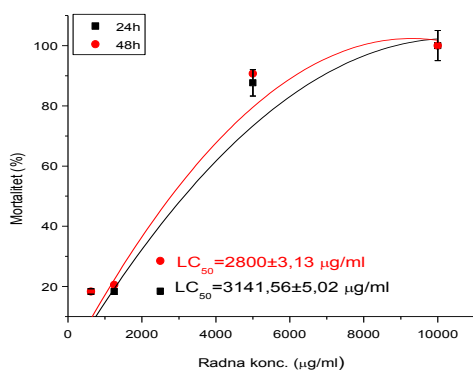
Grafik 94. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Phormidium* T11



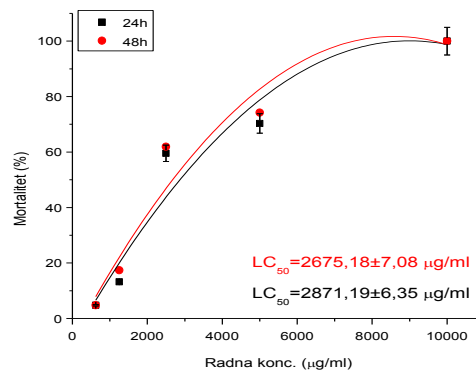
Grafik 95. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Nostoc* T18



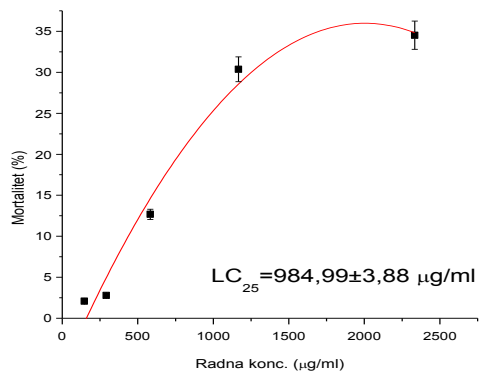
Grafik 96. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Oscillatoria* T18



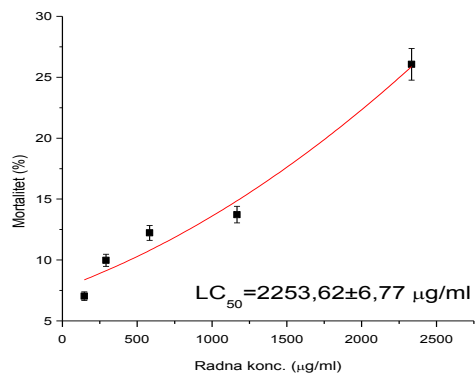
Grafik 97. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Cylandrospermum* K1



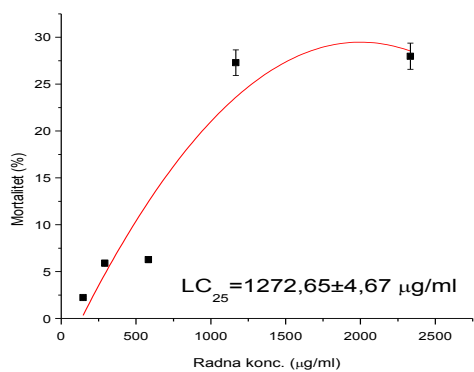
Grafik 98. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Lyngbya* K10



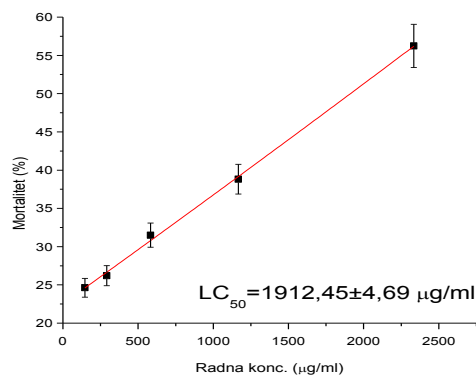
Grafik 99. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Tolypothrix* K11



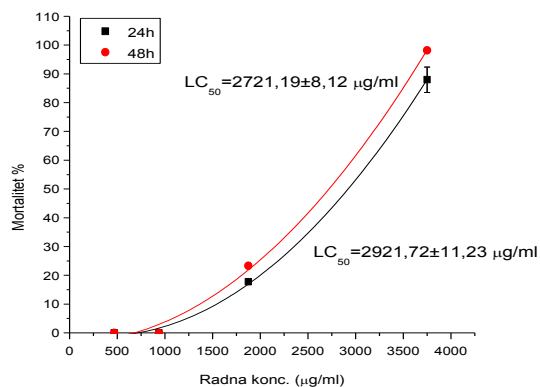
Grafik 100. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Tolypothrix* K15



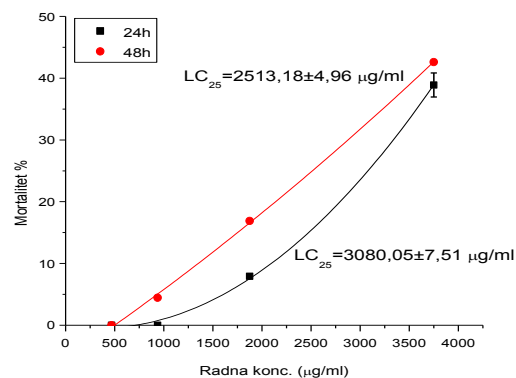
Grafik 101. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Phormidium* K15



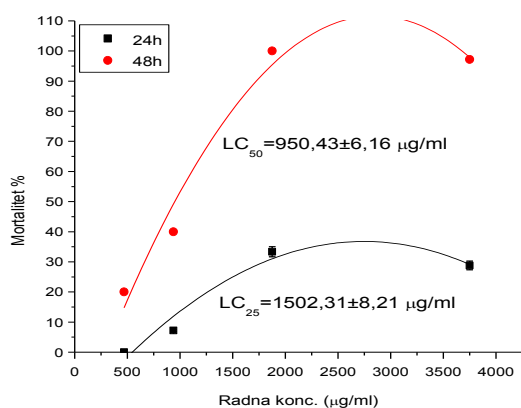
Grafik 102. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za 75% MeOH ekstrakte za soj *Nostoc* K15



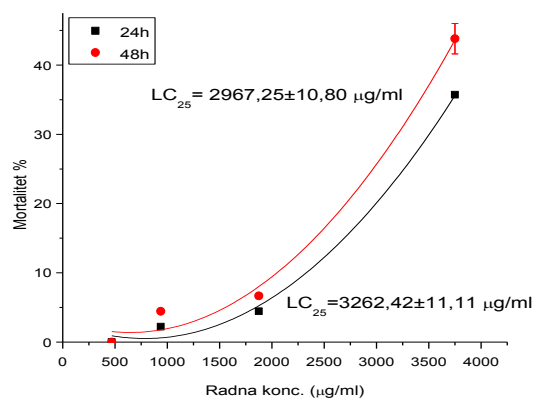
Grafik 103. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za DMSO ekstrakte za soj *Anabaena M2*



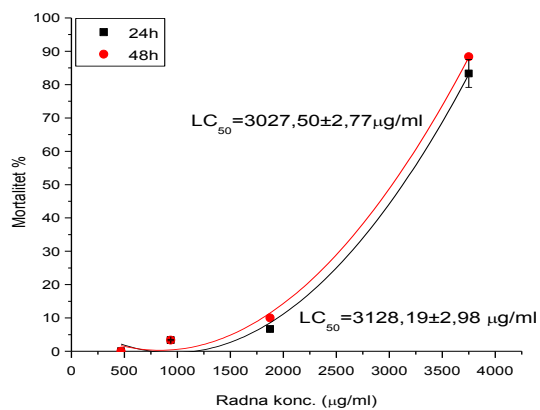
Grafik 104. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za DMSO ekstrakte za soj *Nostoc SP5*



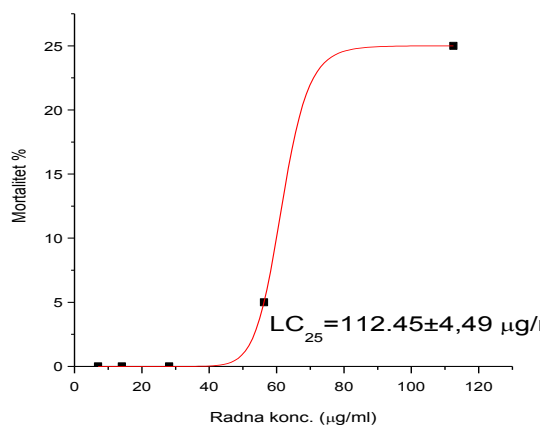
Grafik 105. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za DMSO ekstrakte za soj *Nostoc T7*



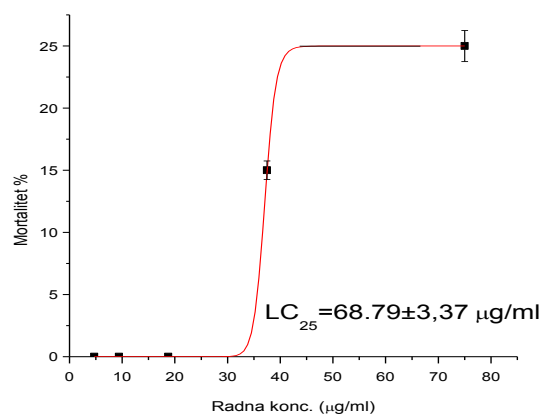
Grafik 106. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za DMSO ekstrakte za soj *Nostoc T18*



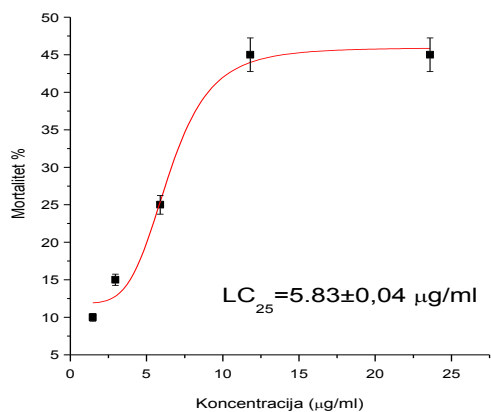
Grafik 107. Rezultati *A. salina* bioeseja dobijeni za DMSO ekstrakte za soj *Cyldrospermum K1*



Grafik 108. Rezultati dobijeni u *D. magna* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Calothrix* M2 nakon 48h

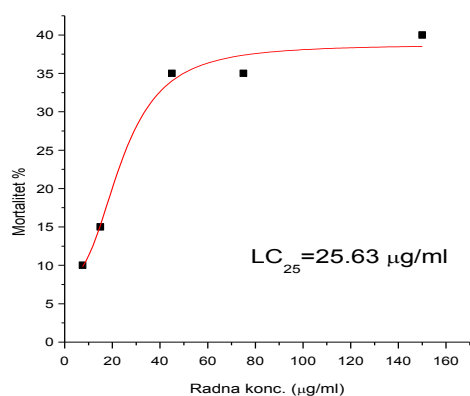
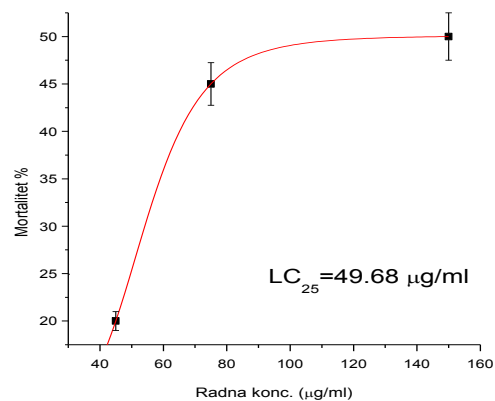
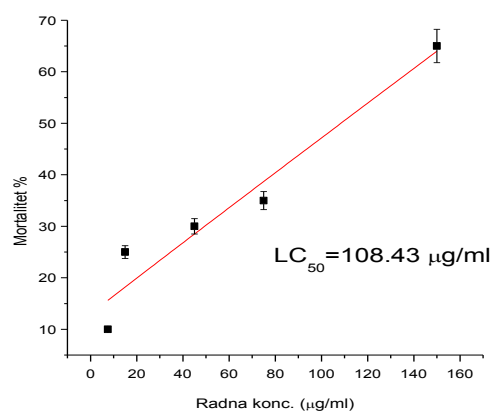
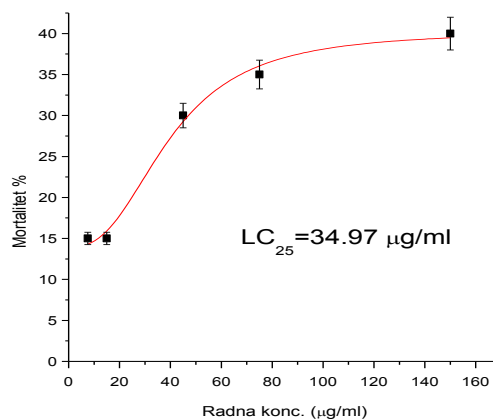
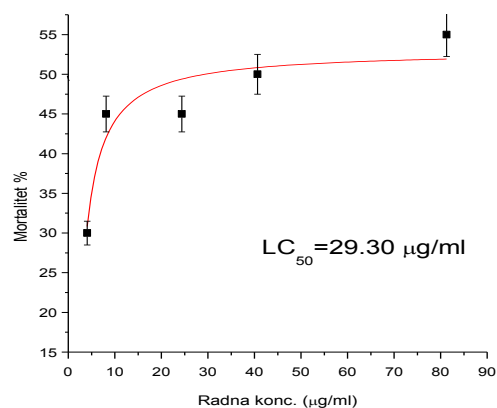
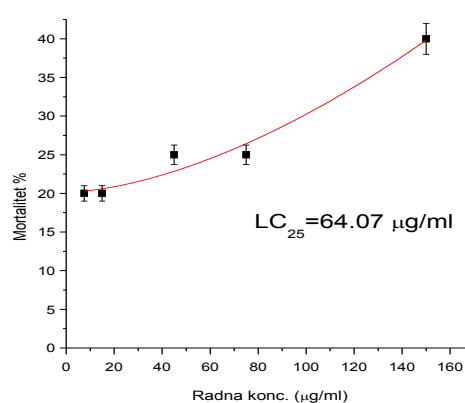


Grafik 109. Rezultati dobijeni u *D. magna* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Nostoc* T7 nakon 48h



Grafik 110. Rezultati dobijeni u *D. magna* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Tolypothrix* K15 nakon 48h



Grafik 111. Rezultati dobijeni u *D. rerio* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Oscillatoria* M2 nakon 48hGrafik 112. Rezultati dobijeni u *D. rerio* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Nostoc* T7 nakon 48hGrafik 113. Rezultati dobijeni u *D. rerio* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Nostoc* T18 nakon 48hGrafik 114. Rezultati dobijeni u *D. rerio* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Oscillatoria* T18 nakon 48hGrafik 115. Rezultati dobijeni u *D. rerio* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Cylandrospermum* K1 nakon 48hGrafik 116. Rezultati dobijeni u *D. rerio* bioeseju za DMSO ekstrakte soja *Nostoc* K15 nakon 48h

## BIOGRAFIJA



Olivera B. Babić je rođena 14.04.1986. godine u Novom Sadu, gde je završila Medicinsku školu "7. april". Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog – molekularni biolog upisala je školske 2005/2006 godine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,10. Školske 2010/2011 upisala je diplomske akademske studije-master na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, smer master biolog (molekularni biolog). Master studije završila je 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,69. Školske 2011/2012 upisala je doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 10,00.

Od 2012. godine je kao Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije priključena na projekat pod nazivom "Biosenzing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima" (Evidencioni broj projekta: III 43002) Ministarstva za nauku, prosvetu i tehnološki razvoj Republike Srbije". Godine 2010. je izabrana u zvanje istraživača-pripravnik dok je 2013. i 2015. godine izabrana i reizabrana u zvanje istraživač-saradnik za užu naučnu oblast Mikrobiologija na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

U toku osnovnih akademskih studija i doktorskih studija je učestvovala u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju u okviru predmeta Osnove mikrobiologije i Biologija algi i gljiva za studenta osnovnih akademskih studija, kao i na predmetima Biologija pijaćih i otpadnih voda i Antimikrobni agensi za studente master akademskih studija.

U okviru Erasmus+ programa za studente doktorskih studija 2016. godine boravila je tri meseca u Turku (Finska) u laboratoriji za Biohemiju. Godine 2015. boravila je u Brnu (Češka) kao dobitnik CYANOCOST granta gde je pohađala letnju školu pod nazivom "11th summer school on toxic compounds in the environment 2015 with special topic (co-organized with the EU cost action CYANOCOST): toxic cyanobacterial blooms". Godine 2014. je bila na tromesečnom studijskom boravku u Baselu (Švajcarska) u okviru realizacije međunarodnog SCOPES projekta pod nazivom "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)" koji finansira Švajcarska.

Učestvovala je u realizaciji 2 nacionalna i jednog internacionalnog projekta. Autor i koautor je 8 radova u vodećim međunarodnim i u domaćim časopisima. Autor i koautor je preko 30 saopštenja na međunarodnim skupovima i skupovima nacionalnog značaja.

Novi Sad, 01.12.2017.

Olivera Babić

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:	
Identifikacioni broj: <b>IBR</b>	
Tip dokumentacije: <b>TD</b>	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: <b>TZ</b>	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: <b>VR</b>	Doktorska disertacija
Autor: <b>AU</b>	Olivera Babić
Mentor: <b>MN</b>	dr Jelica Simeunović, vanredni profesor
Naslov rada: <b>NR</b>	„Karakterizacija zemljišnih cijanobakterijskih sojeva izolovanih iz šumskih ekosistema planinskih područja Republike Srbije“
Jezik publikacije: <b>JP</b>	srpski jezik
Jezik izvoda: <b>JI</b>	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: <b>ZP</b>	Srbija
Uže geografsko područje: <b>UGP</b>	Vojvodina
Godina: <b>GO</b>	2018
Izdavač: <b>IZ</b>	Autorski reprint
Mesto i adresa: <b>MA</b>	Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Fizički opis rada: <b>FO</b>	Broj poglavlja (7), strana (247), broj lit. citata (898), tabela (42), slika (48), grafika (116), priloga (8)
Naučna oblast: <b>NO</b>	Biologija
Naučna disciplina: <b>ND</b>	Mikrobiologija
Ključne reči: <b>PO</b>	Cijanobakterije, šumski ekosistemi, biološki aktivni metaboliti
UDK:	
Čuva se: <b>ČU</b>	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: <b>VN</b>	

Izvod:

**IZ**

Kao jedna od najstarijih grupa fotoautotrofnih mikroorganizama, cijanobakterije predstavljaju široko rasprostranjene prokariote sa raznovrsnim metaboličkim strategijama u cilju preživljavanja i adaptacije na različite uslove životne sredine. Upravo zbog toga, cijanobakterije su značajne kao producenti različitih biološki aktivnih metabolita. Međutim, većina studija o cijanobakterijama uglavnom je vezana za cijanobakterije vodenih ekosistema. Predmet istraživanja ovog rada je utvrđivanje diverziteta autohtonih cijanobakterija šumskih ekosistema i karakterizacija odabranih terestričnih cijanobakterijskih predstavnika planinskih područja Srbije izolovanih tokom trogodišnjeg monitoringa kroz utvrđivanje njihovih osnovnih ekofizioloških, biohemijskih i genetičkih karakteristika. Rezultati dobijeni u ovom radu su ukazali na diverzitet zemljišnih cijanobakterija šumskih staništa ispitivanih planinskih područja kao i na njihov metabolički diverzitet, odnosno potencijal produkcije različitih bioaktivnih jedinjenja. Na osnovu taksonomski važnih odlika identifikovano je i okarakterisano 20 cijanobakterijskih sojeva za koje je utvrđeno da pripadaju sledećim rodovima: *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*. Identifikacija izolovanih cijanobakterija primenom molekularnog markera 16S rRNK u većini slučajeva (90%) je potvrdila preliminarnu identifikaciju rodova na osnovu morfoloških kriterijuma. U pogledu produkcije biomase dobijeni rezultati su pokazali da je produkcija biomase kod odabranih testiranih cijanobakterijskih sojeva zavisila od primenjenih uslova kultivacije. Utvrđeno je da su azot, glukoza i saharoza delovali u pravcu stimulacije produkcije biomase kod velikog broja sojeva. Najveća produkcija biomase detektovana je kod soja *Calothrix* M2 u prisustvu azota u medijumu. Kod soja *Nostoc* T18 zabeleženo je najveće povećanje produkcije biomase u prisustvu glukoze i saharoze u medijumu. Takođe, sadržaj fikobiliproteina bio je povećan kod većine testiranih sojeva u prisustvu glukoze i saharoze u medijumu. Ispitivanjem sadržaja ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze i ksiloze) konstatovano je prisustvo sva tri monosaharida kod svih sojeva pri čemu je svaki soj imao specifičan ugljeno-hidratni profil. Sadržaj monosaharida kod svih testiranih sojeva opadao je u sledećem redosledu glukoza > fruktoza > ksiloza. Izuzetnu sposobnost produkcije heksoza i pentoza ispoljila su tri soja *Nostoc* M1, *Phormidium* T11 i *Calothrix* M2. Antibakterijska aktivnost intracelularnih ekstrakata registrovana je kod 16 testiranih cijanobakterijskih sojeva i zavisila je od kombinacije cijanobakterijski-bakterijski soj i tipa primenjenog ekstrakta. U odnosu na heksanske ekstrakte, metanolni ekstrakti su pokazali veću efikasnost, ukazujući na prirodu bioaktivnih jedinjenja sa antibakterijskim delovanjem. Najefikasnijim su se pokazali 75% MeOH ekstrakti cijanobakterijskih sojeva *Oscillatoria* M2, *Calothrix* M2, *Lyngbya* T7 i *Cylindrospermum* K1 koji su ispoljili antibakterijsku aktivnost na 4 testirane bakterije. Hemijskom analizom masno kiselinskog sastava utvrđeno je da je masno kiselinski sadržaj cijanobakterijskih sojeva varirao u zavisnosti od soja. Najznačajniji konstituenti testiranih cijanobakterijskih sojeva bile su 18-to i 16-to ugljenične masne kiseline poput linolne kiseline i  $\alpha$ -linoleinske. Najveći sadržaj linolne kiseline detektovan je kod sojeva *Phormidium* T11 i *Tolypothrix* K11 što ukazuje na sojeve kao potencijalno značajne izvore esencijalnih masnih kiselina. Antiradikalska aktivnost detektovana je kod svih testiranih cijanobakterijskih sojeva. U DPPH eseju, etanolni ekstrakti soja *Calothrix* M2 ispoljili su najefikasniju sposobnost „hvatanja“ DPPH· radikala dok je u slučaju FRAP metode najveću redukujuću moć imao etanolni ekstrakt soj *Cylindrospermum* K1. Hemijskom analizom fenolnog sastava kod analiziranih cijanobakterijskih sojeva identifikovano je i kvantifikovano ukupno 21 fenolno jedinjenje. Fenolni sastav je varirao u zavisnosti od soja, a najčešće detektovana fenolna jedinjenja bila su luteolin-7-O-glukozid, bajkalin i kemferol. Soj sa najznačajnijom sposobnošću produkcije fenolnih jedinjenja bio je *Phormidium* M1 kod koga je identifikovano prisustvo 11 fenolnih jedinjenja. Testiranjem toksičnosti intracelularnih ekstrakata u biotestovima *A. salina*, *D. magna* i *D. rerio* ukupno 40% testiranih sojeva ispoljilo je toksičan efekat. Najtoksičnijim sojem se pokazao soj *Nostoc* T7 koji je ispoljio toksičnost u sva tri testa. U slučaju biotesta *A. salina* najtoksičnijim sojevima pokazali su se *Nostoc* T7, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18 i *Nostoc* K15. Cijanobakterijski sojevi koji su ispoljili najpotentniju aktivnost u biotestu *D. magna* bili su *Tolypothrix* K15, *Nostoc* T7 i *Calothrix* M2. U biotestu sa embrionima zebrica, soj sa najznačajnijim teratogenim efektom bio je *Cylindrospermum* K1. U pogledu uticaja ekstrakta testiranog soja na ekspresiju gena kod model organizma *D. rerio*, *Cylindrospermum* K1 je ispoljio

sposobnost modulacije bioloških procesa poput cirkadijalnog ritma kao i sposobnost produkcije jedinjenja sa estrogenim efektom. Rezultati analize toksigeničnosti testiranih cijanobakterijskih sojeva su pokazali da geni *mcyB* i *mcyE* koji su uključeni u produkciju cijanotoksina mikrocistina nisu detektovani ni u jednom od testiranih sojeva. Odsustvo dva gena iz *mcy* genskog klastera ukazuje na to da su druga jedinjenja odgovorna za uočen toksični efekat u primenjenim biotestovima. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj ispitivanja zemljišnih cijanobakterija, s obzirom na to da su rezultati ovog rada ukazali na velik metabolički diverzitet ispitivanih sojeva i izražen potencijal produkcije različitih bioaktivnih jedinjenja.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

29.10.2015.

**DP**

Datum odbrane:

**DO**

Članovi komisije:

**KO**

**Predsednik:** dr Zorica Svirčev, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

**Član:** dr Simonida Đurić, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

**Mentor:** dr Jelica Simeunović, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCE  
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number: <b>ANO</b>	
Identification number: <b>INO</b>	
Document type: <b>DT</b>	Monograph type
Type of record: <b>TR</b>	Textual printed material
Contents Code: <b>CC</b>	PhD Thesis
Author: <b>AU</b>	Olivera Babić
Mentor: <b>MN</b>	dr Jelica Simeunović, Associate professor
Title: <b>TI</b>	„Characterization of soil cyanobacterial strains isolated from forest ecosystems of mountain areas of the Republic of Serbia“
Language of text: <b>LT</b>	Serbian
Language of abstract: <b>LA</b>	Serbian/English
Country of publication: <b>CP</b>	Serbia
Locality of publication: <b>LP</b>	Vojvodina
Publication year: <b>PY</b>	2018
Publisher: <b>PU</b>	Author's reprint
Publ. place: <b>PP</b>	Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia
Physical description: <b>PD</b>	chapters (7), pages (247), references (898), tables (42), figures (48), graphs (116), supplemental data (8)
Scientific field: <b>SF</b>	Biology
Scientific discipline: <b>SD</b>	Microbiology
Key words: <b>KW</b>	cyanobacteria, forest ecosystems, biologically active metabolites
Holding data: <b>HD</b>	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**

As one of the oldest groups of photoautotrophic microorganisms, cyanobacteria represent widespread prokaryotes with diverse metabolic strategies in order to survive and adapt to different environmental conditions. For this reason, cyanobacteria are significant as producers of various biologically active metabolites. However, most of the studies are mainly related to cyanobacteria of aquatic ecosystems. The subject of the research of this dissertation is to determine the diversity of autochthonous cyanobacteria of forest ecosystems and to characterize selected terrestrial cyanobacterial representatives of mountainous areas of Serbia isolated during three year monitoring by determining their basic ecophysiological, biochemical and genetic characteristics. The results obtained in this dissertation have show the diversity of soil cyanobacteria of forest habitats of the investigated mountain areas as well as their metabolic diversity and potential to produce various bioactive compounds. Based on taxonomically important features, 20 cyanobacterial strains have been identified to belong to the following genera: *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*. Identification of the isolated cyanobacteria using the molecular marker 16S rRNA in most cases (90%) confirmed the preliminary identification of genera based on morphological criteria. In terms of biomass production, the obtained results showed that the production of biomass in the selected tested cyanobacterial strains depended on the applied cultivation conditions. It was found that nitrogen, glucose and sucrose acted towards the stimulation of biomass production in a large number of strains. The largest biomass production was detected in strain *Calothrix* M2 in the presence of nitrogen in the medium. In the presence of glucose and sucrose in the medium the highest increase in biomass production was recorded in cyanobacterial strain *Nostoc* T18. Also, the content of phycobiliproteins has been increased in most of the tested strains in the presence of glucose and sucrose in the medium. Examination of the carbohydrate content (glucose, fructose and xylose) showed that all three monosaccharides were present in all strains and that each strain had a specific carbohydrate profile whereby the content of monosaccharides in all tested strains declined in the following order: glucose > fructose > xylose. Among the tested strains, three strains namely *Nostoc* M1, *Phormidium* T11 and *Calothrix* M2 showed the exceptional ability to produce hexose and pentose. The antibacterial activity of intracellular extracts was recorded in 16 tested cyanobacterial strains and depended on the combination of cyanobacterial-bacterial strain and the type of applied extract. Compared to hexane extracts, methanol extracts showed greater efficiency, indicating on the nature of bioactive compounds with antibacterial activity. The most effective were 75% MeOH extracts of cyanobacterial strains *Oscillatoria* M2, *Calothrix* M2, *Lyngbya* T7 and *Cylindrospermum* K1 which exhibited antibacterial activity on 4 tested bacteria. Results of the analysis of the fatty acid composition showed that the fatty acid content of tested cyanobacterial strains varied depending on the strain. The most significant constituents of the tested cyanobacterial strains were 18 and 16 carbonic fatty acids such as linoleic acid,  $\alpha$ -linoleic. The highest content of linoleic acid was detected in two strains, *Phormidium* T11 and *Tolypothrix* K11, indicating that these strains can be potentially significant sources of essential fatty acids. Results of antioxidant tests showed that all tested strains had antiradical activity. In the case of DPPH assay, ethanolic extracts of *Calothrix* M2 exhibited the most effective ability to scavenge DPPH  $\cdot$  radical while in the case of the FRAP method, ethanolic extract of *Cylindrospermum* K1 had the greatest reduction power. According to data obtained from chemical analysis of the phenolic composition of the analyzed cyanobacterial strains, a total of 21 phenol compounds were identified and quantified. The phenolic composition varied depending on the strain, and the most frequently detected phenolic compounds were luteolin-7-O-glucoside, baicalin and kaempferol. The strain with the most significant ability to produce phenolic compounds was *Phormidium* M1, in which the presence of 11 phenolic compounds was identified. The results of the toxicity of intracellular extracts obtained in *A. salina*, *D. magna* and *D. rerio* biotests, showed that a total of 40% of the tested strains exhibited a toxic effect. The most toxic strain was *Nostoc* T7 due to the fact that it showed toxicity in all three tests. In the case of *A. salina* biotest, the most potent strains were *Nostoc* T7, *Oscillatoria* M2, *Oscillatoria* T18 and *Nostoc* K15. Cyanobacterial strains that exhibited the most prominent activity in *D. magna* biotest were *Tolypothrix* K15, *Nostoc* T7 and *Calothrix* M2. In biotest with zebrafish embryos, the strain with the most significant teratogenic effect was *Cylindrospermum* K1. Regarding the effect of cyanobacterial

extract on gene expression in model organism *D. rerio*, cyanobacterial strain *Cylindrospermum* K1 exhibited the ability to modulate biological processes such as circadian rhythm as well as the ability to produce compounds with an estrogenic effect. The results of the toxicogenetic analysis of the tested cyanobacterial strains have shown that the genes *mcyB* and *mcyE* involved in the production of cyanotoxin microcystins have not been detected in any of the tested strains. The absence of two genes from the *mcy* gene cluster indicates that other compounds are responsible for the observed toxic effect in applied biotests. The obtained results point out on the importance of the study of soil cyanobacteria, since the obtained results have indicated that the tested strains possess a large metabolic diversity and potential to produce various bioactive compounds.

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 Simonida Đurić, Associate Professor,  
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad;  
**Mentor:** Dr Jelica Simeunović, Associate Professor,  
Faculty of Sciences, University of Novi Sad.