



Биолошки мониторинг цијанобактерије
***Planktothrix rubescens* у акумулацији Врутци**

Мастер рад

Кандидат

Горан Кнежевић

Ментор

Доцент др Милена Рикаловић

Београд, јул 2018. година

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ЈАВНУ ОДБРАНУ МАСТЕР РАДА

МЕНТОР:

- **др Милена Рикаловић**, доцент, Факултет за примењену екологију Футура, Универзитет Сингидунум Београд

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

- **др Борис Вакањац**, ванредни професор, председник Комисије, Факултет за примењену екологију Футура, Универзитет Сингидунум Београд
- **др Милена Рикаловић**, доцент, члан комисије, Факултет за примењену екологију Футура, Универзитет Сингидунум Београд

ДАТУМ ЈАВНЕ ОДБРАНЕ МАСТЕР РАДА: 17.07.2018. године

Мастер рад је израђен у склопу пројекта „Биолошки аспект оперативног мониторинга акумулације Врутци“ у реализацији Факултета за примењену екологију Футура у сарадњи са Јавним комуналним предузећем Водовод Ужице.

Велику захвалност дугујем својој менторки Доцент др Милени Рикаловић на свим сугестијама, саветима, детаљним упутствима и несебичној помоћи у изради мастер рада.

Проф др Борису Вакањцу хвала на сугестијама и што је прихватио улогу председника Комисије за оцену и јавну одбрану мастер рада.

Велику захвалност дугујем Проф др Јордану Алексићу што ми је пружио шансу и био подршка при реализацији истраживања и израде мастер рада.

Проф др Гордани Дражић, асистентима Невени Милошевић и Слободану Стефановићу, као и колеги Бошку Стаменковићу, хвала на корисним саветима и помоћи приликом прикупљања резултата и реализације спроведеног истраживања.

Хвала запосленима ЈКП Водовод Ужице на сарадњи и помоћи приликом прикупљања узорака на терену и обради узорака у лабораторији.

Ватрогасцима спасиоцима Ватрогасне станице Ужице хвала што су ми омогућили излазак на терен и својим ангажовањем допринели реализацији мастер рада.

Посебну захвалност дугујем својој породици што су веровали у мене, подржавали ме у сваком тренутку и били моја највећа инспирација.

Београд, јул 2017. године

Аутор

*Мојим најмилијима,
Александри, Огњену и Исидори*

Извод

У раду су приказани резултати биолошког мониторинга цијанобактерије *Planthotrix rubescens* акумулације Врутци која је коришћена за водоснабдевање града Ужица до децембра 2013. године када је забележена појава масовног цветања ове цијанобактерије. Цветање цијанобактерија у акватичним екосистемима, које се може дефинисати као појава више од 10 000 cel/ml воде, је изузетно значајан и глобално присутан еколошки проблем. Битан аспект цветања цијанобактерија је продукција њихових секундарних метаболита – цијанотоксина, које је као и феномен цветања дириговано факторима спољашње средине (нутријенти, температура, рН, количином азота и фосфора и њиховим односом). *P. rubescens* као продукте секундарног метаболизма синтетише хепатотоксине, који испољавају токсичне ефекте на хепатично ткиво и изазивају канцер јетре, али и негативно утичу на друге органе и функције организма. Узорковање воде је вршено квартално: 08.09.2017., 09.12.2017., 12.03.2018. и 07.06.2018. године. Узорци су захватани из површинског слоја (дубина 0,3m) и дуж воденог стуба (на дубинама 3, 7 и 30m) у близини водозахвата код бране. У свим изорцима Utermöhl-овом методом одређена је бројност *P. rubescens*. Добијени резултати су показали да цветање *P. rubescens* показује динамику - периодично масовно цветање на одређеним дубинама (бројност већа од 100 000 cel/ml на дубини од 7m у два термина узорковања: 08.09.2017. и 12.03.2018. године). Према препорукама Светске Здравствене Организације бројност цијанобактерија у акумулацији Врутци указује на опасност виског ризика. Како у Републици Србији не постоји легислатива којом се прописују максимално дозвољене вредности за бројност цијанобактерија и концентрацију цијанотоксина, добијени резултати као и доступни подаци указују да је потребно имплементирати мониторинг цијанобактерија у законе и правилнике везано за водне ресурсе.

САДРЖАЈ:

1. УВОД	1
1.1. ЦИЈАНОБАКТЕРИЈЕ	1
1.1.1. Биологија цијанобактерија	2
1.1.2. Секундарни метаболити цијанотоксини	8
1.1.3. Методе за одређивање цијанотоксина	9
1.1.4. Цијанобактерије рода <i>Planktothrix</i>	11
1.1.5. Евтрофикација	15
1.1.6. Цветање цијанобактерија	16
1.2. АКУМУЛАЦИЈА ВРУТЦИ	18
1.3. ОКВИРНА ДИРЕКТИВА ЕВРОПСКЕ УНИЈЕ О ВОДАМА И РЕЗИМЕ ДИРЕКТИВЕ СВЕТСКЕ ЗДРАВСТВЕНЕ ОРГАНИЗАЦИЈЕ	20
2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ РАДА	23
3. МЕТОДЕ РАДА	24
3.1. РЕКОГНИСЦИРАЊЕ ТЕРЕНА	24
3.2. УЗОРКОВАЊЕ	25
3.3. КОНЦЕНТРОВАЊЕ УЗОРКА	28
3.4. МИКРОСКОПИРАЊЕ	29
4. РЕЗУЛТАТИ	30
4.1. ОПИС ЛОКАЛИТЕТА И УЗОРКОВАЊЕ	30
4.2. ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ	31
4.3. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА НА ОСНОВУ МИКРОСКОПСКИХ ПРЕПАРАТА	33
4.3.1. Прецизност бројања трихома	36
4.4. ДИНАМИКА ДИСТРИБУЦИЈЕ <i>P. rubescens</i> ДУЖ ВОДЕНОГ СТУБА	38
4.5. ПРЕДЛОГ ПРОТОКОЛА ЗА МОНИТОРИНГ ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА	42
5. ЗАКЉУЧАК	46
ЛИТЕРАТУРА	47

1. Увод

1.1. Цијанобактерије

Цијанобактерије су разноврсни и широко распрострањени филум који припада царству *Bacteria*. У оквиру филума присутне су различите врсте и све врсте имају једну ствар заједничку која их чини различитим од осталих бактерија, а то је да су фотоаутотрофни организми. Ови микроорганизми користе процес фотосинтезе при чему сунчеву светлост претварају у хемијску енергију коју депонују у ћелијама у виду молекула шећера. За процес фотосинтезе цијанобактеријама је поред светлосне енергије неопходан угљен-диоксид и вода. Као нуспроизвод у спољашњу средину ослобађају кисеоник. Такође, способни су да се хране и фотохетеротрофно, аутохетеротрофно, хетероаутотрофно и хетеротрофно зависно од услова средине (Cvijan *et al*, 1996).

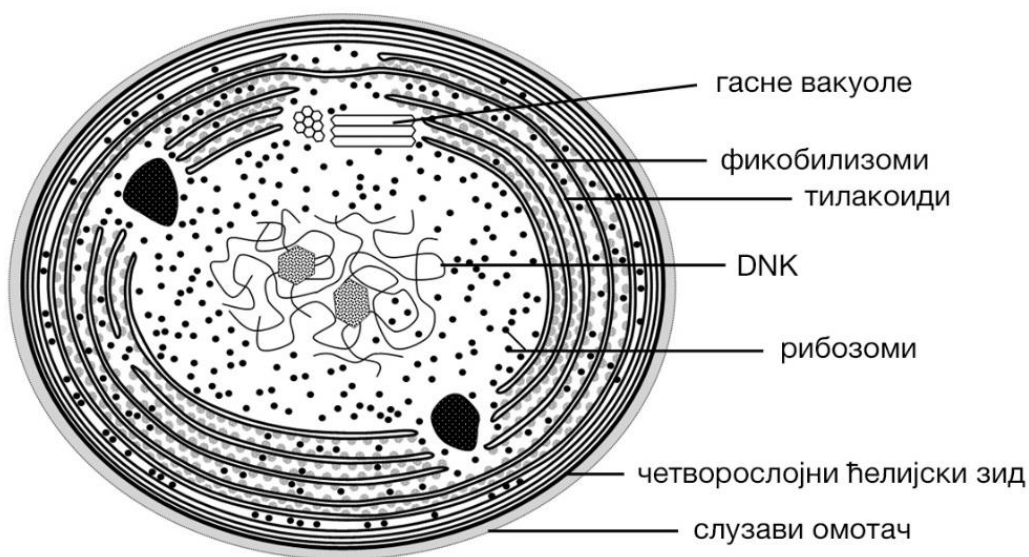
Цијанобактерије су еуривалентни организми и насељавају широк ареал. Космополити су, насељавају различита станишта почевши од терестричних па до водених екосистема, укључујући површинске слојеве земљишта и стена, песак у пустињама, океане, мора, реке, језера и резервоаре широм света. Могу да преживе на Антартику на -83°C , као и у термалним водама топлијим од 70°C (Blaženčić *et al* 1998). Познате су и као пионирски и екстремофилни организми јер могу да насељавају све типове земљишта, пешчаре, бунаре, планинске врхове, минералне воде, термалне изворе, фасаде, слатине, стене, лесне седименте, лишајеве и друга станишта (Whitton i Potts *et al*, 2000). У еутрофичним водама под посебним условима могу да увећају своју биомасу, што је повазно са цветањем воде, а самим тим и појаву скраме на површини. Поједине врсте имају велики значај у слатким водама, јер учествују у формирању стена као што су седра, туфови или травертина, а у морима строматолити (Stewart *et al*, 1985).

Цијанобактерије су најстарија група фотоаутотрофних организама на Земљи, и први су организми који су преко процеса фотосинтезе ослободили кисеоник у

атмосферу и тако допринели саставу атомосфере и утицали на развој и опстанак аеробних организама. Старост цијанобактерија се процењује на око 3,5 милијарди година и у том периоду нису значајно еволуирале тако да и данас поседују низ примитивних својстава од којих су најизраженије: прокариотски тип ћелије, релативно ниска морфолошка диференцијација талуса, присуство фикобилина и одсуство полног процеса и покретних стадијума у процесу развића. Одсуство полног процеса сматра се једним од основних разлога, у целини посматрано ниског еволуционог нивоа ове групе организама (Blaženčić, 1997; Holt *et al*, 2001; Rippka, 1988;).

1.1.1. Биологија цијанобактерија

Структура ћелије цијанобактерија карактеристична је за прокариоте (Слика 1). Вегетативне ћелије цијанобактерија изграђене су код већине припадника раздела из четири основна дела: спољашњи слузни омотач, ћелијски зид, хроматоплазма (периплазма и процитоплазма), нуклеоплазма (центроплазма и прокарион), (Свијан, 1996).



Слика 1. Шематски приказ вегетативне ћелије цијанобактерија

На површини самих ћелија налази се слузави, галертни, желатинасти омотач који није саставни део ћелијског зида што је посебно уочљиво у току ћелијске деобе у којој овај омотач не учествује. Присутан је код већине цијанобактерија, мада је понекад толико танак да није уочљив обичним оптичким микроскопом. Значај овог омотача огледа се у заштити од исушивања, интензивног зрачења, епифита и паразита и хербивора. Лучење слузи има и посебан значај у кретању појединих врста овог раздела (Cvijan, 1996).

Око ћелије је вишеслојан ћелијски зид, али код многих цијанобактерија ћелијски зид поседује три или чак само два слоја, према неким истраживачима слој Л1 уопште не постоји. Више од четири слоја поседују ћелије бактерија које се крећу, као и неки специфични типови ћелија као што су хетероцисте (Cvijan, 1996).

Испод ћелијског зида се налази ћелијска мембрана односно плазмалема која окружује цитоплазму односно процитоплазма. Инвагинацијом плазмалеме током еволуције настали су тилакоиди, појединачне мешколике структуре на којима се налазе фикобилини са пигментима: хлорофили и каротеноиди (Cvijan, 1996).

Процитоплазма је густа и непокретна и у њој су смештени рибозоми (70S) који су укључени у процес фотосинтезе у ћелији, резервне супстанце, различити кристали и гасне вакуоле. Резервне материје чине гликопротеиди, липидне инклузије, полифосфатна тела и цијанофицинска зрнца. Полифосфатна тела су лоптаста телашца која у себи садрже фосфате. Код младих ћелија, у одсуству фосфата у околној средини, забележено је и одсуство полифосфатних тела. Цијанофичин је полимер који функционише као привремена резерва азота, у облику је зрнаца која нису обавијена засебним мембранама (Subakov Simić, 2009).

Гасне вакуоле се састоје од различитог броја малих гасних мехурића (везикула) или цилиндричних цеви. Не поседује протеинско – липидну мембрану, као праве биљне вакуоле. Омотач, који је једнослојна протеинска мембрана, прилично је чврст и пропушта гасове. Зато је однос садржаја гасова у вакуолама у равнотежи са односом садржаја гасова у околној средини. Унутрашња мембрана вакуола је хидрофобна, водонепропусна. Код планктонских цијанобактерија присуством гасних вакуола је омогућено њихово „лебдење“ у води (смањује се

специфична тежина ћелије). Код цијанобактерија које живе ван воде, гасне вакуоле штите наследни материјал од штетног утицаја зрачења, посебно уколико такве цијанобактерије живе у условима интензивне осветљености (површини снега и леда), (Cvijan, 1996).

Постоје три групе пигмената: хлорофили, каротеноиди и фикобилини (фикобилипротеини). Хлорофили су пигменти зелене боје и основни су пигменти у процесу фотосинтезе. Огромна већина цијанобактерија поседује само хлорофил А, код мањег броја утврђено је присуство и хлорофила Б, док хлорофил Д поседује само једна прокариотска врста што представља изузетак међу цијанобактеријама. Каротеноиди су пигменти жуте, наранџасте и црвене боје и најразноврснији су пигменти код цијанобактерија, познато их је око 30, имају доминантно заштитну улогу. Фикобилини (пигменти плаве и црвене боје) су тетрапироли удружени са протеином у веома стабилан комплекс и тада се обично говори о фикобилипротеинима (или билипротеинима), (Takodi, 2016).

Нуклеоплазма (центроплазма) је централни део ћелије који не поседује једарце. Количина ДНК је приближна количини као код других бактерија ($1 - 3,6 \times 10^9$ bp). У хиалоплазми се налазе округла влакна ДНК, ређе у облику штапића или зрнаца. Код цијанобактерија нису пронађени током ћелијске деобе типични хромозоми и митотичке фигуре, што је уобичајена појава код еукариотских алги. Међутим, репликација ДНК се догађа, и нуклеоплазма се дели, и на тај начин се генетске информације преносе са мајке на ћерке ћелије (Cvijan i Blaženčić, 1996).

Карактеристике нуклеоплазме су да се око ње никада не образује мембрана и не поседује једарце, хистоне, хромозоме и једрово вретено (Blaženčić, 1998).

Као специфичне типове ћелија можемо издвојити хетероцисте и акинете (споре) карактеристичне за трихалне цијанобактерије (Blaženčić, 1998).

Хетероцисте (Слика 2) воде порекло од вегетативних ћелија, и то од ћелија у којима се растварају грануле гликогена, при чему се губе тилакоиди, а самим тим и пигменти. Око хетероцисти се формира спољашњи омотач од седам слојева, а нови слојеви настају споља у односу на зид ћелије из које хетероциста настаје. Образују се поре на једном или оба краја хетероцисте. Монопорне хетероцисте могу

бити или базалне или апикалне, док су бипорне интеркаларне. Хетроцисте нису у стању да се деле. Како нису у стању да се деле, након угинућа, одвајају се од вегетативних ћелија трихома изазивајући његову фрагментацију. Преко пора хетероцисте успостављају цитоплазматичне везе са суседном или суседним вегетативним ћелијама и тим путем се одвија неопходна размена између вегетативних ћелија и хетероцисте. Из хетероцисте у вегетативну ћелију преносе се везани азот у облику глутамина, а из вегетативне ћелије у хетероцисту продукти фотосинтезе (Blaženčić, 1998).



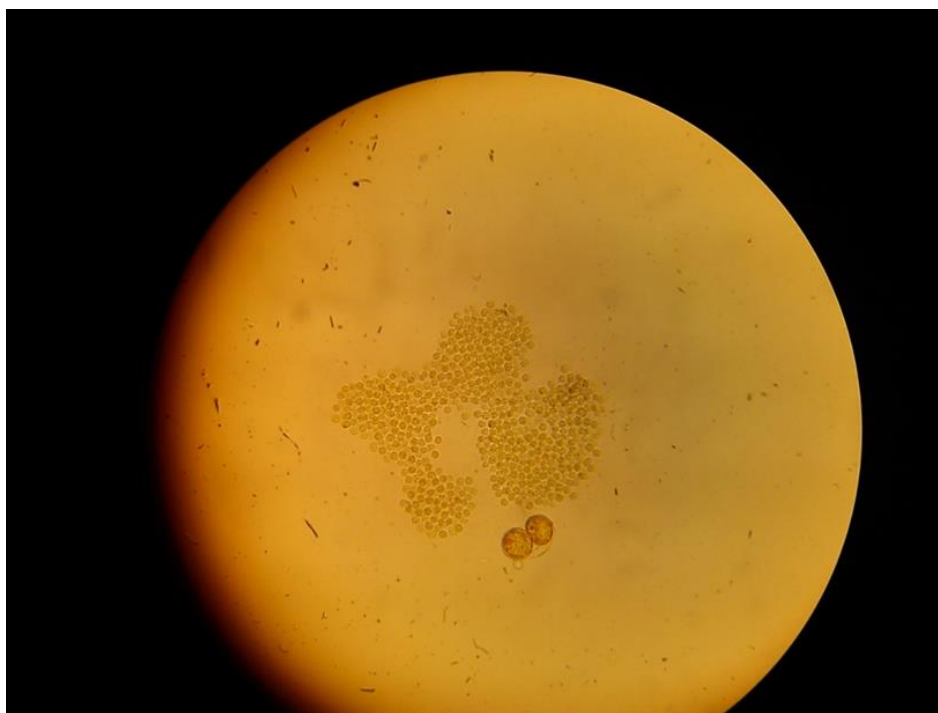
Слика 2. *Anabaena* sp. са уочљивом хетероцистом (фотографисао Горан Кнежевић)

Акинети воде порекло од вегетативних ћелија од којих се разликују по већим димензијама и изразито већом густином зрнаца цијанофицина, из тог разлога су оптички тамније од вегетативних ћелија. Једно од најбитнијих својстава које их издвајају од вегетативних ћелија јесте висока отпорност на хладноћу, али и на неке друге екстремне услове животне средине. Имају задебљао ћелијски зид, богати су хранљивим материјама и високим садржајем DNA (20-30 пута више него у вегетативним ћелијама). Доказано је преживљавање акинета у сувом земљишту и по 70 година (Blaženčić, 1998).

Већ на нивоу морфолошке организације огледа се једноставност цијанобактерија – оне могу да буду на једноћелијске, колонијске и трихалне (Subakov Simić, 2009).

Једноћелијски облици су заступљени великим бројем родова и врста. Како се око појединачних ћелија формира слузни омотач (галерта), након деобе мајке ћелије две новонастале ћерке ћелије могу привремено да остану слепљене. У случају њихових поновљених деоба могу да настану групе од по 4, 8 ређе 16 или више ћелија (јединки). Такве групације се означавају као агрегати ћелија. Агрегати ћелија сматрају се прелазним обликом од једноћелијских ка колонијском типу (Cvijan, 1996).

Колонијски ниво организације може да буде релативно разноврсног облика и величине (Слика 3). У најједноставнијем облику могу бити аморфне (једноћелијске јединке микроскопских димензија). Уколико су изграђене од кончастих јединки, често се виде голим оком, понекад достижу и знатне димензије. Виши еволуциони ниво чине колоније правилног облика, облика плоче, сасвим ретко могу бити и кубичне (Cvijan, 1996).



Слика 3. Колонија *Myrocystis* spp. (фотографисао Горан Кнежевић)

Највиши ниво еволуције цијанобактерија исказана је у уређивању ћелија у низове – трихоме, који је обавијен слузним омотачем (сара). Трихом и сара граде јединствену целину – филамент. Код различитих родова и врста, трихом може да буде хомоцитан или хетероцитан, гранат или негранат. Уколико је хетероцитан, поред вегетативних ћелија у трихому се налазе и хетероцисте и/или акинети (Blaženčić, 1998).

Релативно велики број алги има способност кретања тј. активног померања у простору. Кретање се најчешће јавља код једноћелијских, нешто ређе колонијских и трихалних цијанобактерија. Позната су два облика кретања и то кретање пузањем (неке трихалне) које се одвија искључиво у контакту са чврстом подлогом захваљујући слузи коју лучи кроз поре, кретање у супротном смеру од кретања слузи, и кретање трзањем (једноћелијских алги) и то захваљујући густо распоређеним протеинским израштајима на површини ћелијског зида. Кретање се заснива на сталном истезању и везивању за подлогу ових израштаја, а потом и њиховог грчења (Cvijan, 1996).

Код цијанобактерија доказано је вегетативно и спорулативно размножавање, док полно није запажено, међутим, на основу индукованих мутација, доказано је постојање рекомбинације гена (Cvijan, 1996; Takodi, 2016).

Вегетативно размножавање код једноћелијских цијанобактерија деобом ћелије, код колонијских раскидањем колонија, док код трихалних хормогонијама и хетероцистама (Cvijan, 1996).

Код једноћелијских деобе ћелија различитих јединки не стоје у међусобној вези. Код колонија изграђених од једноћелијских јединки деоба ћелије може да се одвија независно од деобе других. Ређе се јавља општа деоба ћелија истовремено као код микроцистиса (Cvijan, 1996; Takodi, 2016).

Код колонијских алги деоба ћелија може да буде ограничена на одређену раван или равни, резултат је веома правилан облик колоније – меризмопедија (Subakov Simić, 2009).

Код трихалних облика деоба ћелије може бити дифузна када се догађа у великом броју ћелија у било ком делу трихома и интеркаларна, када је ограничена на мали број ћелија у базалном делу трихома, ређе у његовом вршном делу. Све претходно речено важи само за вегетативне ћелије не и за хетероцисте и акинете. Спорулативно размножавање (егзо- или ендоспоре) сретано је код веома малог броја припадника овог раздела (Cvijan, 1996).

1.1.2. Секундарни метаболити цијанотоксини

Услед физиолошке и еколошке разноврсности, изузетне способности да се прилагоде и богатог генетског потенцијала, цијанобактерије су способне да производе велики број различитих биолошки активних супстанци, секундарних метаболита, које се могу сврастати у три групе (Singh *et al*, 2006; Takodi, 2016):

1. Високовредни метаболити цијанобактерија (антитуморни метаболити, антибактеријске, антифунгалне и антивирусне супстанце);
2. Биомодулатори (антифламаторне супстанце, имуностимулатори и др.);
3. Цијанотоксини (супстанце са потенцијалним токичним ефектом зависно од структуре и концентрације)

Производња цијанотоксина регулисана је на три нивоа (Zurawell *et al*, 2005):

- Генетички ниво (важан фактор токсичности за сваки сој посебно);
- Ћелијски ниво (производња токсина код токсичних сојева условљена факторима средине);
- Популацијски ниво (концентрација цијанотоксина условљена је уделом токсичних, потенцијално токсичних и нетоксичних сојева у заједници цијанобактерија).

Постоји значајна разлика између нетоксичних, потенцијално токсичних и токсичних цијанобактерија. Сви сојеви који поседују гене за кодирање синтезе

одређених токсина сматрају се потенцијално токсичним. Код највећег броја врста цијанотоксина се не синтетишу у првој фази раста популације, већ уласком у секундарни метаболизам, који је условљен факторима стреса (Carmichael, 1992; Kurmayer and Christiansen, 2009), из чега се може и претпоставити физиолошка улога ових метаболита, а то је: конкуритивна предност и физиолошка помоћ. Предност у конкуренцији се огледа у томе што цијанотоксини представљају одбрамбени механизам, као одговор на притисак приликом исхране, односно борбе за ресурсе. Физиолошка помоћ објашњава се као допринос секундарних метаболита физиологији ћелије у остварењу хомеостазе, убрзане стопе раста и фотосинтетске ефикасности (Holland and Kinnear, 2013).

У зависности од дејства цијанотоксина на циљни, односно таргетни орган, могу се условно поделити у четири групе (Carmichael, 1992; Codd *et al*, 2005):

1. Хепатотоксини (микроцистини, нодуларини);
2. Неуротоксини (анатоксини и сакситоксини);
3. Дерматотоксини (аплазиатоксин, дебромоеплазиатоксин и лингбиатоксин);
4. Цитотоксини (цилиндропермопсин и липополисахариди).

Цијанотоксини су на основу хемијске структуре подељени на (Codd *et al*, 2005):

- Циклични пептиди (микроцистини и нодуларини);
- Алкалоиди (анатоксини, сакситоксини, цилиндроспермопсин, аплазиатоксин и лингбиатоксин);
- Липополисахариди (липололисахаридни ендотоксини).

1.1.3. Методе за одређивање цијанотоксина

Методе за одређивање цијанотоксина обухватају од једноставних метода за "скрининг" биолошких узорака до високософистицираних аналитичких метода

којима се може урадити квалитативна и квантитативна анализа. Треба напоменути да како су цијанотоксини веома разноврсна група једињења и продукују се у смеши не постоји универзална метода детекције (Takodi, 2016).

За детекцију цијанотоксина користе се биолошки тестови, биохемијске методе и физичко-хемијске методе (Takodi, 2016).

Употреба биолошких тестова са микроорганизмима омогућава детектовање биотоксичности у кратком временском периоду. Употреба вируса у идентификацији цијанотоксина није се показала као добра метода. Биолошки тестови који користе различите популације бактерија приликом детекције цијанотоксина дају опречне резултате, јер у једном случају микробне популације нису смањивале концентрацију цијанотоксина, док је у другим случајевима контакт са екстрактима цијанобактерија доводио до повећања бројности популације бактерија. Приликом мерења биолуминисценције добијени су контрадикторни резултати (Christoffersen, 1996; Jones *et al*, 1994; Takodi, 2016).

Ситни бескичмењаци, пре свега зоопланктон, затим ларве и неонате риба, ракова, анелида, комараца и воћне мушице које се хране фитопланктоном, односно цијанобактеријама, могу да послуже као добар индикатор присуства цијанотоксина. Од кичмењака, у тестовима токсичности за цијанотоксине најчешће се користе мишеви, као и неке врсте риба. Због етичких разлога користе се култивисане ћелијске линије сисара и риба уместо животињских биотестова. Користе се и неке биљне врсте и њихови екстрати, међутим, потребно их је боље истражити (Takodi, 2016).

Приликом коришћења биохемијских методе, може се издвојити ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), (Lidner *et al*, 2004) као најосетљивији комерцијални тест. ELISA тест је дизајниран тако да се користи директно, без концентровања узорка воде, уз ниске границе детекције помоћу којих се утврђује да ли је гранична вредност, предложена од SZO прекорачена. Да би се са сигурношћу идентификовала појединачна хемијска једињења потребно је урадити додатну физичко-хемијску методу (Carmichael and An, 1999; Takodi, 2016).

Поред ELISA теста користи се и PP1 есеј (есеј инхибиције ензима протеин фосфатазе 1). ELISA и PP1 есеји су групно селективне методе и њиховом применом се не могу разликовати нити квантификовати различите варијанте цијанотоксина (McElhiney and Lawton, 2005).

За квалитативну и квантитативну анализу цијанотоксина користе се и физичко-хемијске методе. Због веома мале концентрације потребно је издвајање, односно екстракција токсина из узорка, као и његова рерагасија. Једна од метода која се користи је HPLC (high performance liquide chromatography) Применом оваквих метода не могу се одредити токсични ефекти анализираног узорка што отежава и успорава процес детекције цијанотоксина (Takodi, 2016).

Течна хроматографија куплована са (MS) масеном спектрометријом или MS-тандем масеном спектрометријом (HPLC-MS или HPLC-MS-MS) представља моћну аналитичку методу. Применом ове методе могуће је урадити комплетну квалитативну и квантитативну анализу смеша различитих класа токсина (Такоди, 2016). Недостатак представља захтев за одговарајућим стандардима, поготово у случајевима када су аналити комплексни као што је случај са микроцистинима или нодуларинима (Kubwabo *et al*, 2004; McElhiney and Lawton, 2005; Welker *et al*, 2002).

1.1.4. Цијанобактерије рода *Planktothrix*

Planktothrix је род из групе филаментозних цијанобактерија. Попут свих припадника реда *Oscillatoriales* не образују акинете и не садрже хетероцисте, али су јединствене по томе што су планктонски организми, трихалне грађе са полупропустљивим гасним вакуолама. Два припадника овог реда *P. agardhii* и *P. rubescens* су се дуго времена означавали као врсте *Oscillatoria*. Огроман рад на проучавању екологије и морфологије *Planktothrix* урадио је Anthony E. Walsaby који је са својим тимом успео да секвенцира 55,6kb микроцистин синтетисани ген карактеристичан само за ове две врсте (Christiansen *et al* 2003).

P. agardhii i *P. rubescens* су највише изучаване у језерима северне хемисфере где су познати као продуценти хепатотоксина односно микроцистина (Anagnostidis and Komárek, 1988).

Као већина припадника реда *Oscillatoriales*, *Planktothrix* се развија и расте у облику засебних трихалних ћелија формирајући филаменте дужине и до 4mm. али за разлику од других *Oscillatoriales*, ови трихоми су фототактични омогућајући тако преживљавање у условима слабе осветљености и на већим дубинама. Неколико врста поседује константан однос два главна фотосинтетичка пигмента – фикоцијанина и фикоеритрина. Продукција цијанотоксина је факултативна и врсте које не производе микроцистин се обично налазе у природним екосистемима. За разлику од микроцистина могу да продукују различите цикличне полипептиде као што је осцилапептин (Anagnostidis and Komárek, 1988).



Слика 4. *P. rubescens* (фотографисао Горан Кнежевић)

Обе врсте *P. agardhii* i *P. rubescens* су познате по појави масовног цветања у језерима и резервоарима свеже воде. *P. agardhii* поседује само фикоцијанине (zeleni pigmenti), што даје њену обојеност. Налазе се на свим географским ширинама у плитким и проточним језерима где могу толерисати мешање воде дуж воденог стуба (Reynolds et al, 2002).

P. rubescens (produkuje crevene pigmete, fikoeritrin) (Слика 4) се уобичајено налази у чистим, прозирним и дубоким алпским и пре-алпским језерима која су сезонски стратификована. Цветање *P. rubescens* је познато и као „феномен бургундијске крви“. Расте на великим дубинама у условима слабе осветљености металимниона где може максимално апсорбовати зелени сноп светлости уз помоћ фикоеритрина. Под дејством вертикалних струјања воде, *P. rubescens* се може кретати неколико метара вертикално пратећи кретање металимниона, иако то за последицу има наглу промену интензитета светлости. Ово показује да значајно утиче на брзину фотосинтезе и производњу кисеоника у језеру посебно у стајаћим акватичним екосистемима где доминира у заједници фитопланктона као што су акумулације за водоснабдевање (Walsby *et al*, 2005).

P. rubescens је кончаста цијанобактерија са полупропустљивим гасним вакуолама. Ова врста поседује низ адаптација као што су: у процесу фотосинтезе способна је да користи читав спектар (од 400 до 700 nm) светлосне радијације, што јој омогућава живот на великим дубинама; прилагођена је на услове слабе осветљености, може да користи фосфор органског и неорганског порекла и неповољне услове преживљава формирањем хормогонија (Komárek and Komárková, 2004)

P. rubescens уобичајено се налази у чистим и прозирним, дубоким алпским и пре-алпским језерима са присутном сезонском стратификацијом на надморским висинама преко 500 mnn (Reynolds *et al*, 2005).

Za razliku od većine cijanobakterija koje карактерише космополитизам, *P. rubescens* је детектован на само пар локалитета у свету и Србији. Потребно је напоменути да је распрострањеност дефинисана на основу пријављених акцидената у језерским екосистемима, док је заступљеност свакако већа (Извор: Database of International Guidance Manual for the management of toxic *Cyanobacteria*).

Цветање *P. rubescens* је забележено на следећим локацијама у свету (Слика 5.), (Chorus and Bartram, 1999):

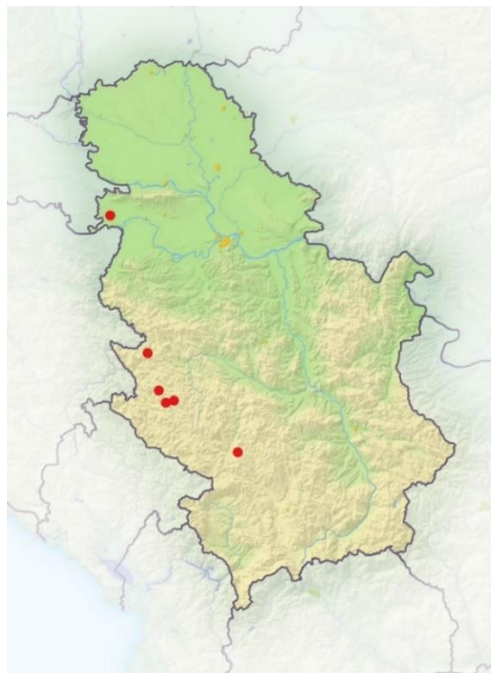
- Циришко језеро (Швајцарска)
- језеро Гарда (Италија)

- језеро Мондсе (Аустрија)
- језера Нантуа и Боургет (Француска)
- језера у Мађарској, Канади, Норвешкој, Турској и Шпанији.

У Србији је забележено цветање *P. rubescens* у акумулацији Врутци, док је присуство забележено и у Сјеничком језеру, језеру Газиводе, ХЕ Кокин брод, ХЕ Потпећ и река Босут (Слика 6), (Subakov Simić, 2015; Takodi, 2016).



Слика 5. Појава цветања *P. rubescens* у свету (мапу израдио Горан Кнежевић)



Слика 6. Распрострањеност *P. rubescens* у Србији (мапу израдио Горан Кнежевић)

1.1.5. Еутрофикација

Еутрофикација представља процес повећане продукције органских материја у акватичном екосистему и природан је процес „старења“ сваког воденог екосистема. Узроци еутрофикације су многобројни и комплексни, а најчешћи су повећање нивоа нутријената попут фосфата и азотних једињења. У оваквим условима цијанобактерије могу да се пренамноже што резултира драстичним повећањем укупне биомасе. Овако убрзан степен репродукције цијанобактерија познат је под називом цветање воде и дефинише се као *brojnost* цијанобактерија која је од 10,000 *ćelija/ml* воде (Fleming *et al*, 2002; Takodi, 2016).

Већи део природних и вештачких акумулација временом стари при чему се дубока, олиготрофна језера са ниском концентрацијом нутријената, услед честих осцилација нивоа воде у језеру и сталног прилива органских материја, трансформишу у еутрофна језера (Ђековић *et al*, 2010).

Природна еутрофикација се остварује кроз дуги временски период и у великој мери се разликује од еутрофикације вештачких акумулација која је највише резултат антропогене активности. Убрзана еутрофикација ремети равнотежу између продукције органске компоненте и њене минерализације, при чему је продукција вишеструко већа од минерализације. Већина органских супстанци које доспевају у језеро се не разграђују у потпуности, већ се акумулирају у седименту, где се њихова разградња наставља (Ђековић *et al*, 2010).

Директна последица прекорачења капацитета минерализације седимента је стварање редукционе зоне у седименту, као и анаеробних услова разградње органске материје на већим дубинама. Анаеробија за последицу има повећање концентрације амонијака, фосфора гвожђа, мангана, микроелемената, и других једињења у води. Такође може доћи до стварања водоник-сулфида и метана који узрокују промену укуса и мириса воде. Оптерећење језера нутријентима има за последицу масовно цветање различитих врста алги, прекомерну бројност фито- и зоопланктона и макрофита. Изумирањем ових живих организама убрзава се процес

еутрофикације, смањује се садржај кисеоника у води, мења се боја и мирис воде (Milošević *et al*, 2014; Salama *et al*, 2013).

Биолошке карактеристике акумулација су резултат морфометријских и других облика језерског дна, као и абиотичких и биотичких чинилаца у оквиру целог слива. Антропогени фактор има доминантан утицај на квалитет воде у акумулацијама (Anđelković *et al*, 2014).

Сви наведени фактори, начин коришћења земљишта у зони акумулације пре потапања и у зони заштите акумулације, као и начин самог коришћења водног потенцијала језера, заједно у највећој мери одређују динамику биолошких процеса старења акумулације, густину популација и органску продукцију у језерској води (Rossi *et al*, 2007).

1.1.6. Цветање цијанобактерија

Цветање воде може бити опасно када је повезано са негативним последицама у воденом екосистему као што су морталитет живог света услед недостатка кисеоника, смањење субмерзне акватичне вегетације, поремећај стабилности екосистема, негативан утицај на ланце исхране, продукција активних токсичних супстанци и слично. У слатководним екосистемима, највећи проблем представља производња високоактивних токсичних метаболита, односно цијанотоксина (Takodi, 2016).

Цветање цијанобактерија је регистровано у свим деловима света управо због њихове космополитске распрострањености. Масовна цветања и тровања цијанотоксинима су до сада описана у САД, Канади, Бразилу, Африци, Кини и у свим земљама Европе (Chorus and Cavalieri, 2000).

До високог интересовања јавности у Србији дошло 2009. године након морталитета риба и неколико стотина домаћих животиња (краве и свиње) које су пиле воду из реке Поњавице, у близини града Панчево. Тачан узрок смрти ових животиња није утврђен. Међутим, истраживања током 2008. и 2009. године на

Поњавици указала су на присуство микроцистина у води, муљу, макрофитама и рибама. Могуће је да су микроцистини на неки начин допринели морталитету животиња, иако је остало неутврђено. Микроцистини су детектовани у Криваји, Тамишу, Тиси и Бегеју и забележено је цветање *Aphanizomenon flos-aquae*, *Myrocystis flos-aquae* i *P. agardhii*. Цветања цијанобактерија су забележена у многим другим рекама широм Републике Србије (Subakov Simić, 2011).

Најдрастичнија последица цветања цијанобактерија забележена је на акумулацији Врутци, децембра 2013. године. Истовремено, масовно цветање цијанобактерија је довело до тога да се водоснабдевање града Ужица премести са ове акумулације на алтернативне водозахвате. Тренд цветања цијанобактерија (Слика 7) је настављен и у наредном периоду током 2014., 2015., 2016. и 2017. године (Ђековић *et al*, 2017).



Слика 7. Цветање цијанобактерије *P. rubescens* (фотографисао Горан Кнежевић)

Услед прекомерног повећања биомасе цијанобактерија смањује се провидност воде и блокира продор сунчевих зрака, чиме се спречава процес фотосинтезе, а самим тим долази и до смањења количине кисеоника у води. Када се потроше залихе једног или више неопходних елемената за раст, цијанобактерије почињу да одумиру. Као последица тога долази до интензивних процеса труљења

који захтевају додатну потрошњу кисеоника. Концентрација кисеоника се даље смањује и то нарочито ноћу, што може проузроковати недостатак кисеоника за остала жива бића у води. Оваква хипоксија, а у тежим случајевима и аноксија, нарочито у дубљим слојевима воде може да доведе до масовног угинућа аеробних организама (Svirčev, 2001).

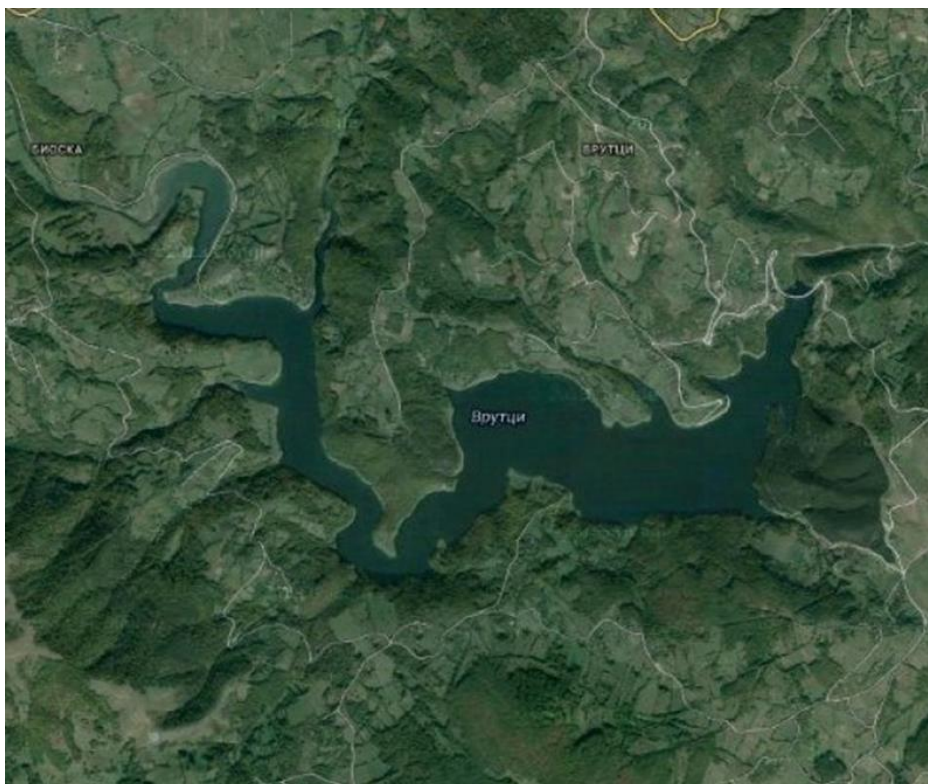
Публиковане научне студије су показале да је процес цветања цијанобактерија повезан са нарушавањем баланса укупног N/P, односно да је заступљеност доступних фосфата у органском и неорганском облику већа, што због горе наведених карактеристика и адаптилности, *P. rubescens* ствара услове за цветање.

1.2. Акумулација Врутци

Језеро Врутци (Слика 8) формирано је 1984. године када је изграђена бетонска брана на реци Ћетињи 77m висока и 241m дугачка. Дошло је до акумулације 54 000 000m³ воде. Река Ћетиња је лоцирана 11km западно од Ужица, а њеним преграђивањем обезбеђена је квалитетна вода за водоснабдевање града. На круни бетонске бране изграђен је друмски пут ширине 3,6m (Ђековић *et al*, 2017).

Река Ћетиња је дугачка је 74km, има слив површине 566km², просечан протицај 4m³/s у средњем делу тока, 6m³/s код ушћа, са максималним водостајем у марту и априлу, а минималним у августу и септембру. Вода акумулирана у језеро потиче са северних падина Златибора и југоисточних падина Таре. Површина саме акумулације Врутци износи 160km² (Ђековић *et al*, 2017).

Приликом формирања акумулације Врутци са терена су уклоњени грађевински објекти, посечена је вегетација, санирана су и дезинфикована сметлишта, септичке јаме и извршено је пошумљавање околине како би се спречила ерозија земљишта и засипање воденог басена. Дефинисана је зона заштите језера Врутци и одређене су посебне норме за изградњу објеката и за коришћење земљишта. (Ђековић *et al*, 2017).



Слика 8. Акумулација Врутци (Извор: www.googleearth.com)

Потопљена је површина кањона и речне долине од укупно 221ha у селима Врутци и Биоска. Структура потопљеног земљишта је била: 17% оранице, 6% воћњаци, 42% ливаде и пашњаци, 35% неплодна и остала земљишта. Исељено је 45 сеоских домаћинстава. Акумулациом је потопљено гробље у селу Врутци са 700 гробних места која су измештена на три локације (Ђековић *et al*, 2017).

Једна од функција бране поред водоснабдевања града Ужица је и прихватање поплавног таласа насталих у горњем току реке.

На основу доступних научних података, сматра се да је тренутно стање акумулације Врутци условљено спољашњим, унутрашњим оптерећењем и ерозијом. Посебно се истиче спољашње оптерећење акумулације у виду сточног фонда (фарми) у региону слива реке Ћетиње пре акумулације, као расутих извора загађења. Додатно спољашње оптерећење представљају домаћинства са нерешеним одлагањем комуналног отпада као и ерозија и испирање земљишта у притокама реке Ћетиње пре акумулације што директно узрокује повећање наноса (Ђековић *et al*, 2014, 2017).

Везано за унутрашење оптерећење акумулације литературни подаци указују на нарушен однос укупног N/P, као и повећану укупну количину P, који диригују умножавање цијанобактерија. Потенцијални разлози за унутрашње оптерећење фосфором према Ђековићу (2017) је помор рибе. Наиме, примећено је смањење броја толстолобика у води услед неадекватног управљање рибљим фондом („ловљене“ динамитом), услед чега један део њих падне на дно језера. Риба је богата фосфатима и када се распада на дну, фосфор се ослобађа, а то нарочито погодује размножавању алги (Simić, 1999).

1.3. Оквирна Директива Европске Уније о водама и резиме Директиве Светске здравствене организације

Мониторинг квалитета воде се врши редовним анализама узорака воде, као и дефинисањем узорка и последица еутрофикације водених екосистема услед цветања цијанобактерија. Посебно је значајно да се мониторинг врши редовно и у континуитету у акумулацијама и у водозахватима које се користе приликом прераде површинских вода у воду за пиће.

За успешно управљање животном средином и постизање „доброг статуса“ свих вода, како површинских, тако и подземних, створена је Оквирна Директива Европске Уније о водама (2000/60/EC). Имплементација директиве у Републици Србији је предвиђена до 2015. године у складу са преговорима о приступању Европској Унији. Значај Директиве се огледа у томе што су сви већ постојећи закони сада обухваћени једним законом, усвајање директиве је предуслов за улазак у ЕУ, директива решава све проблеме везане за воду и представља приручник како треба газдовати водама у складу са одрживим развојем, регулише употребу воде, спречава загађење, штити све водотокове, омогућује поштовање међународних обавеза везаних за присуство токсичних супстанци у води.

Директива обухвата 20 поддиректива и одлука које се односе на квалитет воде за пиће, површинских вода за водоснабдевање, за узгој шкољки, за узгој риба,

за купање и рекреацију. Прописане су максимално дозвољене концентрације опасних супстанци и предвиђене су мере за управљање комуналним отпадним водама. Главни циљ директиве је очување еколошког статуса вода.

По Директиви о води за пиће утврђена је препоручена динамика мониторинга вештачких акумулација које се користе за водоснабдевање (Табела 1), и то оних акумулација које обезбеђују просечно дневно више од 100m³ и тиме ће бити подвргнута додатном мониторингу.

Табела 1. Учесталост мониторинга у зависности од броја становника/корисника

Број корисника	Учесталост мониторинга
<10 000	4 пута годишње
10 000 до 30 000	8 пута годишње
>30 000	12 пута годишње

Данас се у Србији врши мониторинг над 26 језера (акумулација) једном годишње, на три дубине и на три одабране тачке, али само квалитативни састав и сапробиолошка анализа према застарелим биоиндикаторским листама. Граничне воде се узоркују сваког месеца, док се неке реке узоркују четири пута годишње и врши се анализа само квалитативног састава заједнице фитопланктона и сапробног индекса. Препоручена анализа фитопланктона према Европској Директиви обухвата анализу квалитативног, квантитативног састава и биомасе.

Важно је истаћи да у Републици Србији не постоји легислатива са граничним вредностима за различита излагања људи цијанотоксинима која је неопходна како би се спроводила превенција потенцијалног здравственог ризика. У многим земљама су граничне вредности цијанотоксина реализоване применом оријентационих граничних вредности предложених од стране Светске Здравствене Организације. Препоручене вредности не представљају интернационалне стандарде, али их се неке земље придржавају. Предлог формирања националне легислативе (Drobac, 2015) је да се ревидирају подаци граничних вредности за

цијанотоксине (Burch and Humpage 2005; Chorus, 2012; Fawel *et al*, 1999; СЗО, 1998; Свирчев *et al*, 2011) а потом пажљиво уведу у легислативу.

У склопу директиве Светске здравствене организације за управљање водама представљен је и кратак приказ начина и нивоа излагања људи цијанобактеријама и цијанотоксинима, опис потенцијалног здравственог ризика и препоручених активности за воде намењене за водоснабдевање (Табела 2).

Табела 2. Резиме директиве WHO за управљање водама намењеним за водоснабдевање које могу да садрже цијанобактерије (Chorus and Bertram, 1999)

Ниво упозорења	Стање – густина и бројност ћелија	Активности
Опасност ниског степена	200 cel/ml	- нецветајући услови; - цијанобактерије се детектују у малом броју; - недељни мониторинг.
Опасност средњег степена	2.000 cel/ml или 1 $\mu\text{g/l}$ хлорофила А са доминацијом цијанобактерија	- тренд кретања ка повећаном броју или одржавању средњег броја цијанобактерија; - вода може бити неупотребљива за пиће без претходне обраде; - у фабрикама воде уводи се тестирање токсина, нарочито уколико су у узорку доминантне познате токсичне врсте – понављати недељно анализе; - низак ризик за иритацију коже и гастроинтестиналне проблеме кроз контакт током активности у води; - континуирано недељно одређивање бројности цијанобактерија и давање извештаја јавности.

Опасност високог степена	100.000 ćel/ml или 50 µg/l Іхлорофила А са доминацијом цијанобактерија	- стално висок број потенцијално токсичних цијанобактерија у води и/или видљиво локализоване формиране накупине; - вода може бити неупотребљива за пиће без претходног одговарајућег третмана; - уводи се редовно дневно тестирање токсина; - ако је могуће заменити извор снабдевања водом; - недељно узимање узорака и одређивање бројности цијанобактерија; - висок ризик од негативних здравствених ефеката; - шире медијско извештавање јавности.
--------------------------	--	--

2. Предмет и циљ рада

Предмет рада је биолошки мониторинг и праћење динамике цветања цијанобактерије *P. rubescens* у еутрофној акумулацији Врутци која је део система за водоснабдевање града Ужица и везан је за актуелни еколошки проблем цветања цијанобактерија који се бележи у континуитету од децембра 2013. године.

Циљ мастер рада је да се утврди динамика цветања цијанобактерије *P. rubescens* на различитим дубинама, и да се на основу анализа доступних научних података истражи узрок те појаве и предвиде последице које се очекују. Посебан акценат је и примена Оквирне Директиве Европске Уније о водама (2000/60/ЕС) и њена имплементација, као и предлог мера за сузбијање цветања цијанобактеријских ћелија од стране ЕРА – Environmental Protection Agency (Токсичне цијанобактерије у води; Водич за њихове последице по јавно здравље, мониторинг и управљање). Мастер рад је урађен у склопу пројекта „Биолошки

аспект оперативног мониторинга акумулације Врутци“ у реализацији тима Факултета Футура у сарадњи са ЈКП Водовод Ужице у периоду од септембра 2017. године до краја јуна 2018. године.

3. Методе рада

3.1. Рекогносцирање терена

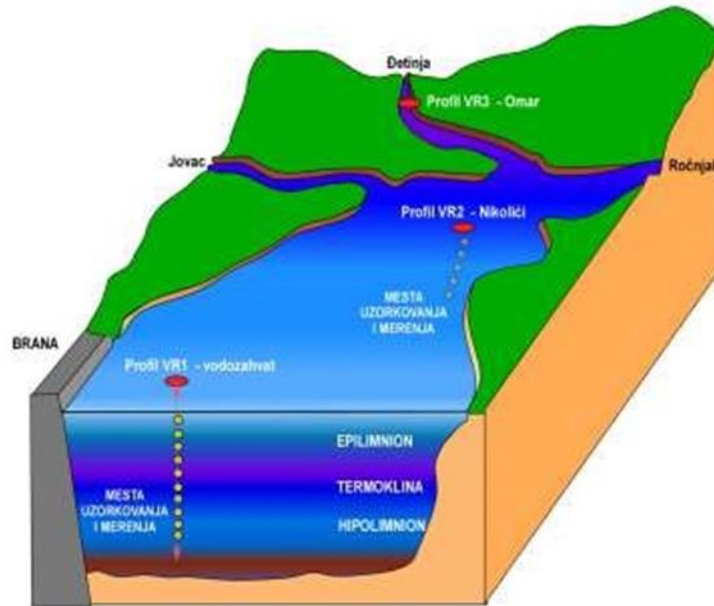
Како би постигли тражене резултате рада, урађена су узорковања воде на локалитету Брана – водозахват. Језеро Врутци се налази на 700mnnv док је место узорковања на коти 627m. Дубина самог језера на месту узорковања варира између 40 и 45m у зависности од висине водостаја. Водено огледало је изложено дејству сунчевог зрачења током целе године. Ширина самог језера на подручју водозавата је 240m и водозахват је са једне стране окружен бетонском браном висине 77m, са две стране је приобаље са доминацијом шумске вегетације док се осталим делом пружа акумулација у дужини од 8km (Слика 9). Забележено је одсуство макрофита дуж већег дела обале језера. Такође, важно је истаћи да је након изградње бране приобаље већим делом пошумљено вегетацијом четинара. У околини самог језера је изграђен мањи број викендица и имања, али је њихов број занемарив.



Слика 9. Мерно место Брана – водозахват, акумулација Врутци (фотографисао Горан Кнежевић)

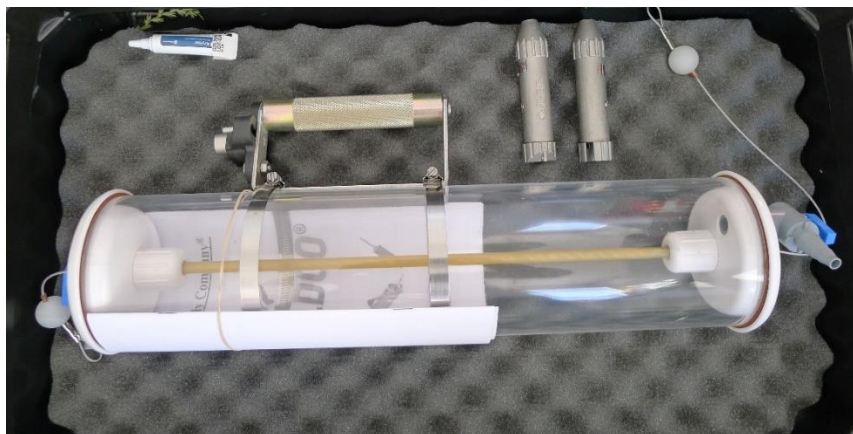
3.2. Узорковање

Узорковања су вршена квартално (08.09.2017., 09.12.2017., 12.03.2018. и 07.06.2018. године) у сарадњи са ватрогасцима спасиоцима из Ватрогасне станице Ужице. Узорци су узети из чамца непосредно изнад водозахвата (мерно место Брана-водозахват), (Слика 10).



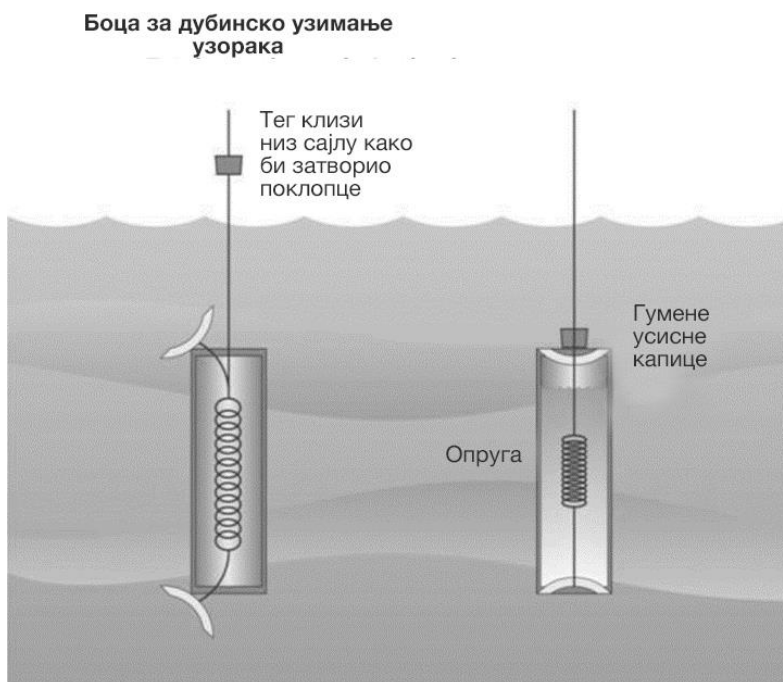
Слика 10. Мерно место Брана - водозахват (Извор: Пројекат Института за водoprивреду Јарослав Черни)

Узорци воде за квалитативну и квантитативну анализу фитопланктона су узети са површине на дубини од 0,3m и са дубина где се налазе цеви које се користе за водозахват и то: 3, 7 и 30m (дубина на којима су инсталиране цеви које одводе воду из акумулације на даљу прераду у фабрику). За узорковање је коришћена боца за дубинско узорковање воде (Wildco Alpha, Ben Meadows, USA), (Слика 11).



Слика 11. Боца за дубинско узорковање воде

Метода прикупљања узорака воде на различитим дубинама је приказана шематски (Слика 12).



Слика 12. Шематски приказ рада Wildco боце (Извор: www.waterra.com.au)

Узорци се узимају у чисте обележене пластичне боце (локација, датум и време узорковања, (Слика 13) и пуне се до 4/5 запремине. Ако узорак није могуће обрадити у наредних 24 часа, или ако је дефинисано сврхом узорковања, узорак се фиксира Луголовим раствором (Subakov Simić, 2011), уколико се Луголов раствор

прави потребно је дати и рецептуру како се прави, до бледо жуте боје или раствором формалдехида, до коначне концентрације од 4%.

Узети и обележени узорци се транспортују до лабораторије у расхладним кутијама (максимална температура до 8°C) и током обраде се држе на мрачном месту и на температури од 2°C до 5°C.



Слика 13. Обележавање узорака (фотографисао Горан Кнежевић, 07.12.2017. године)

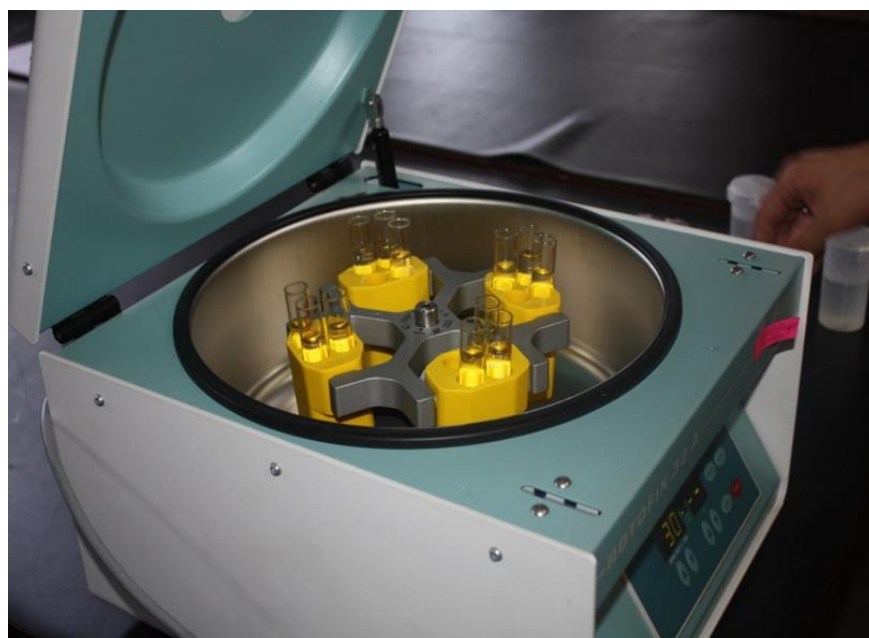
Упоредо са узимањем узорака извршена су мерења физичко-хемијских параметара коришћењем мултипараметарске сонде (EXO1, Lake scientist, USA), (Слика 14) и узете су вредности за следеће параметаре (са свих наведених дубина) концентрације хлорофила А, температура воде, растворени кисеоник и рН вредност.



Слика 14. Мултипараметарска сонда EXO1 коришћена приликом узорковања
(фотографисао Горан Кнежевић)

3.3. Концентровање узорка

Након допремања у лабораторију, узорци воде су одмерени у епрувете запремине 10ml, а затим концентровани центрифугирањем (Слика 15). За центрифуговање је коришћен уређај марке ROTOFIX 32 A (GmbH & Co, Germany), при брзини од 3000 rpm/min у трајању од 2 минута добијен је концентровани раствор узорка. Из епрувета је одливена вода тако да је остао талог приближне запремине од 1ml. Тако припремљени узорци су обележени и одложени до микроскопирања.



Слика 15. Центрифуговање узорака (фотографисао Слободан Стефановић)

3.4. Микроскопирање

За микроскопирање је коришћен светлосни микроскоп марке Olympus CX2 (Japan), (Слика 14). Такође, ради што прецизнијег одређивања бројности и детерминације присутних цијанобактерија, коришћен је и инвертни микроскоп марке Olympus CKX53 (Japan), (Слика 16).

Квантитативна анализа фитопланктона извршена је по Utermöhl - овој методи (1958), према стандарду. Сви узорци су урађени у трипликату.



а)



б)

Слика 16. а) Светлосни микроскоп, б) Инвертни микроскоп
(фотографисао Горан Кнежевић)

4. Резултати

4.1. Опис локалитета и узорковање

У случају акумулације Врутци приликом цветања цијанобактерија уочена је интензивна обојеност саме воде. Вода је црвено – мрке боје док је у приобаљу запажена скрама на површини језера (Слика 17). Такође, уочено је одсуство макрофита како у приобаљу, тако и дуж површине воденог огледала.



Слика 17. Визуелна инспекција акумулације Врутци (фотографисао Горан Кнежевић)

Интересантно је да је у зимском периоду забележено цветање цијанобактерија и као и врло ретке појаве „црвеног леда“ (Слика 18) што је последица масовног цветања цијанобактерија у претходном периоду.



Слика 18. Појава „црвеног леда“ (фотографисала Марина Вукашиновић)

Дубине су променљиве и зависе од висине водостаја на дан узорковања. У поменутој акумулацији постоје три црпне цевае на различитим дубинама са којих су узимани узорци у склопу оперативног биолошког мониторинга. Узимање узорака воде из акумулације која се користи за водоснабдевање и њихова даља обрада и тумачење резултата је од јавног значаја. На основу тих узорака може се утврдити и предвидети укупна оптерећеност цијанобактеријама у постројењу за прераду воде.

4.2. Физичко-хемијски параметри

Како су лимитирајући фактори за развој цијанобактерија рН и температура, а параметар који се користи за одређивање присуства цијанобактерија хлорофил А (WHO) мултипараметарском сондом EXO1 су праћене њихове вредности (Табела 3).

Табела 3. Индикативни параметри измерени мултипараметарском сондом, 08.09.2017. године

Дубина (m)	Температура (°C)	pH	Chl (µg/l)
0,3	21,236	8,92	2,03
3	20,911	8,92	3,97
7	17,473	8,79	14,04
30	6,899	7,51	0,82

Ово је важна информација за одређивање одговарајуће стратегије уклањања ћелија цијанобактерија и цијанотоксина у постројењу за третман воде.

Концентрација хлорофила А на дубини од 7m указала је на повећану бројност фитопланктона (микроорганизама који имају способност фотосинтезе). Несразмерно висока вредност параметра хлорофила А указује на цветање алги/цијанобактерија, што је и потврђено каснијом идентификацијом цијанобактерија у узорцима (Chorus and Bertram, 1999).

Вредности pH које су близу 9 су још један показатељ постојања оптималних услова за цветање цијанобактерија. Увидом у извештаје РХМЗ Србије (2014), уочена је да су метеоролошки услови током 2013. године, и посебно високе температуре воде за новембарски период, довели до продужетка вегетационе сезоне. Претпоставља се да је интензивна фотосинтетска активност зелених алги, али и других алги довела до повећања pH вредности преко 9,0. У извештајима РХМЗ Србије 2012. године забележена је вредност pH преко 9,0 и на дубинама до 5m. Цветање цијанобактерија је много интензивније у акватичним екосистемима чија је pH вредност преко 9,0 (Ђековић, 2017).

4.3. Идентификација цијанобактерија на основу микроскопских препарата

Након концентровања урађена је идентификација цијанобактерија на нивоу врсте коришћењем светлосног микроскопа. Визуелна таксономска идентификација на нивоу врсте први је корак ка диференцијацији између токсичних и нетоксичних врста истог рода, која је веома важна из перспективе управљања квалитетом воде, није могућа само визуелном идентификацијом (Такоди, 2016).

На основу микроскопских препарата (светлосни и инвертни микроскоп) утврђено је да је у акумулације Врутци присутна цијанобактерија *P. rubescens* са највећим уделом у узорку (Слика 19).



Слика 19. Видно поље на увеличању 100x са доминацијом *P. rubescens*

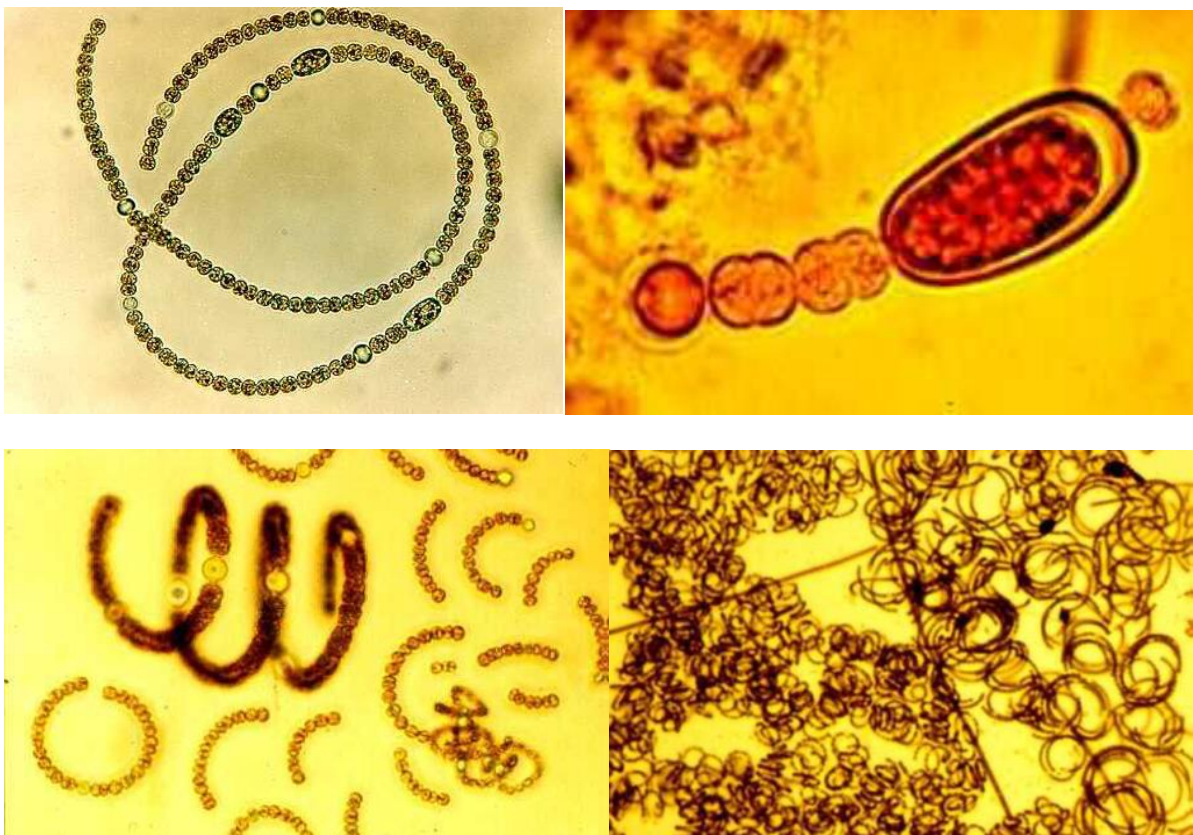
Одређивање концентрације цијанобактеријских ћелија може се користити за процену потенцијалне концентрације цијанотоксина, или у имплементацији планова управљања акумулацијом Врутци услед акцидента насталог цветањем цијанобактерија.

Као додатни ниво квантификације, процедури је додато и коришћење дигиталне камере постављене на светлосни и/или инвертни микроскоп. Сlike прикупљене помоћу камере могу се обрађивати помоћу комерцијално доступног софтвера за анализу слике.

Коришћење слика и софтвера је имало две додатне предности - додатни ниво документације и олакшавање квантификације цијанобактеријске биомасе када је доминантна врста филаментозна. Примарна предност директног пребројавања јесте да се квантификација и идентификација раде истовремено због постојаности нативних препарата. Примарни недостатак поступка је то што је временски ограничен. Као компромис, директно пребројавање ћелија цијанобактерија се може извршити у комбинацији са фотодокументацијом што би значило прецизнију идентификацију.

На слици бр. 20 приказан је низ токсичних и нетоксичних сојева *A. circinalis* који илуструју потешкоће у прецизном идентификовању цијанобактерија. Стручна визуелна микроскопска идентификација може бити допуњена методама молекуларне биологије како би се са сигурношћу утврдила присутност и бројност токсичних цијанобактерија. Ови поступци укључују изолацију укупне или фрагмената DNA, гена за 16S RNA или протеине, секвенцирање генетског материјала и примену биоинформатичких порграма (упоређивање са генетичким базама података како би се утврдио идентитет цијанобактерија), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Уколико се утврди присутност токсичних цијанобактерија, на основу податка које токсине продукују може се одредити степен ризика на уласку воде из акумулације у постројење и може се благовремено припремити третман сирове воде.



Слика 20. Различити сојеви исте цијанобактерије *Anabaena circinalis*, од којих су само неки токсични (Извор: Приручник International Guidance Manual for the management of toxic cyanobacteria)

Генетске технике се такође могу користити за одређивање присуства токсичних цијанобактерија. Са брзим напретком техника као што је PCR у реалном времену, на ефикасан начин се може утврдити степен токсичности цијанобактерија у односу на њихову бројност за време цветања. Пошто је само око 50% потенцијално токсичних цијанобактерија у време цветања заиста токсично, ова техника би била од изузетне важности за управљање третманом и припрему мера предострожности приликом акцидента изазваног цветањем цијанобактерија (International Guidance Manual for the management of toxic cyanobacteria, Australia).

4.3.1. Прецизност бројања трихома (Subakov Simić, 2011)

Прецизност бројања показује варијабилност око средње вредности када се врше поновљена бројања. Прецизност је функција броја пребројаних организама, њихова просторна расподела у узорку и варијабилност ћелија унутар колонија или трихома популације.

Многи типови цијанобактерија (укључујући врсту *P. rubescens* као доминантну врсту у узорцима прикупљеним на језеру Врутци) формирају трихоме, и број ћелија унутар трихома варира између две и две хиљаде. У случају цијанобактеријских колонија, прецизност или поузданост броја се одређује укупним бројем јединки које се директно пребројавају, а не укупним бројем ћелија.

Проблеми се јављају приликом пребројавања филаментозних цијанобактерија као што су *Aphanisomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Arthrospira*, *Planktolyngbia*, *Limnotrix* i *Planktothrix* где су ћелије трихома слабо дефинисане (Слика 21).



Слика 21. Распршена дистрибуција цијанобактеријских ћелија у колонијама и филаментима (Извор: www.waterra.com.au)

На акумулацији Врутци је утврђена апсолутна доминација врсте *P. rubescens* (Слика 22) и умногоме је олакшано бројање јединки у узорку. Било је

могуће утврдити бројност јединки директним пребројавањем на светлосном или инвертном микроскопу. У четири наврата је вршен мониторинг и бројање цијанобактерија у узорку, такође је урађена и адекватна фотодокументација.



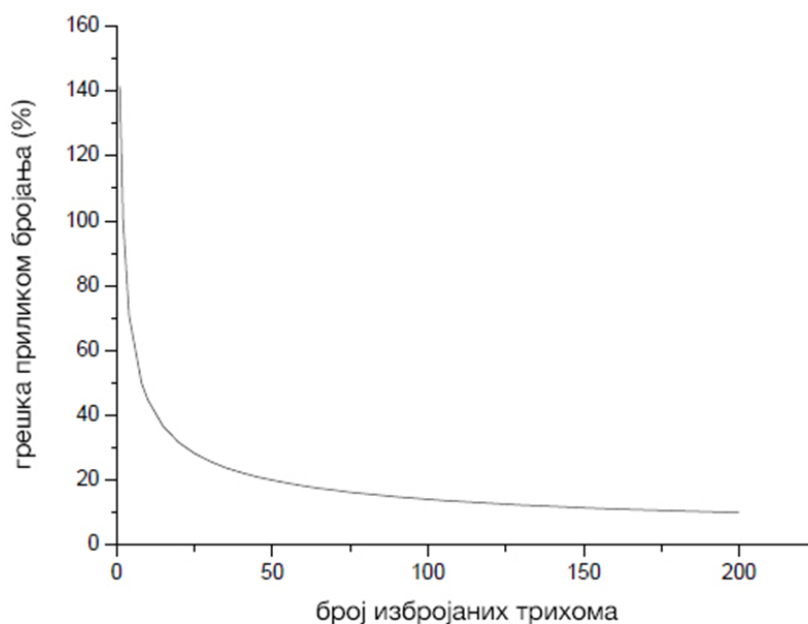
Слика 22. *P. rubescens*, (фотографисао Горан Кнежевић, 09.09.2017.)

Прецизност (грешка бројања) израчунава се у односу на укупан број пребројаних јединки (n) користећи једноставну формулу (Laslett *et al*, 2007):

$$\text{Грешка бројања } (\pm \%) = 100 \sqrt{2/n}$$

Ласлетова једначина објашњава варијабилност ћелија у трихому и претпоставља да се број ћелија у колонији и трихому увек рачуна. Иако је у пракси скоро немогуће утврдити бројност јединки у трихомима, јер доста варира, ова метода се и даље препоручује као референтна метода за пописивање филаментозних цијанобактерија. Због тога је од велике важности утврдити проценат грешке приликом бројања.

Већа прецизност захтева већи аналитички напор и генерално већи трошак. Веза између грешке бројања и бројачког напора је приказана графички (Слика 23). Постоји неписано правило да је потребно пребројати више од 50 колонија или трихома у узорку како би подаци били валидни.



Слика 23. Статистичка грешка приликом бројања трихома (Извор: Приручник International Guidance Manual for the management of toxic *Cyanobacteria*)

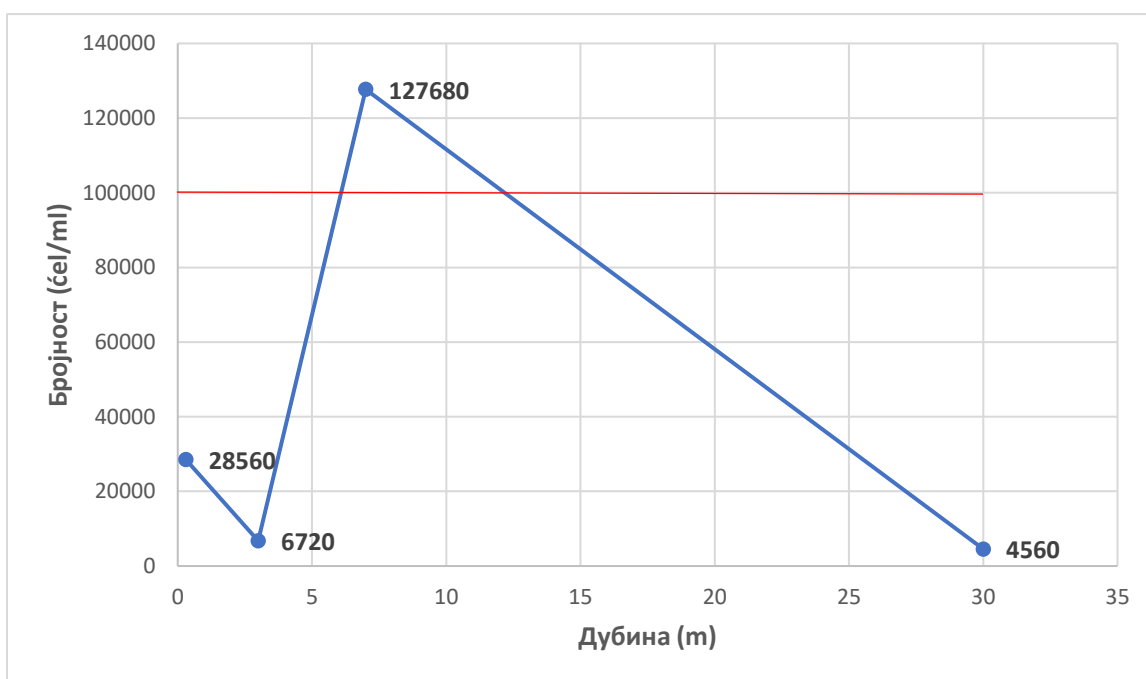
4.4. Динамика дистрибуције *P. rubescens* дуж воденог стуба

Бројност цијанобактерија је одређена директно путем микроскопирања и пописивања присутних врста у узорцима. Резултати се приказују као број ћелија у ml након претходног центрифуговања/концентровања узорка. На основу добијених резулата добијени су резултати биолошког оперативног мониторинга који су приказани у Табели 4. и урађена је анализа динамике дистрибуције *P. rubescens* дуж воденог стуба.

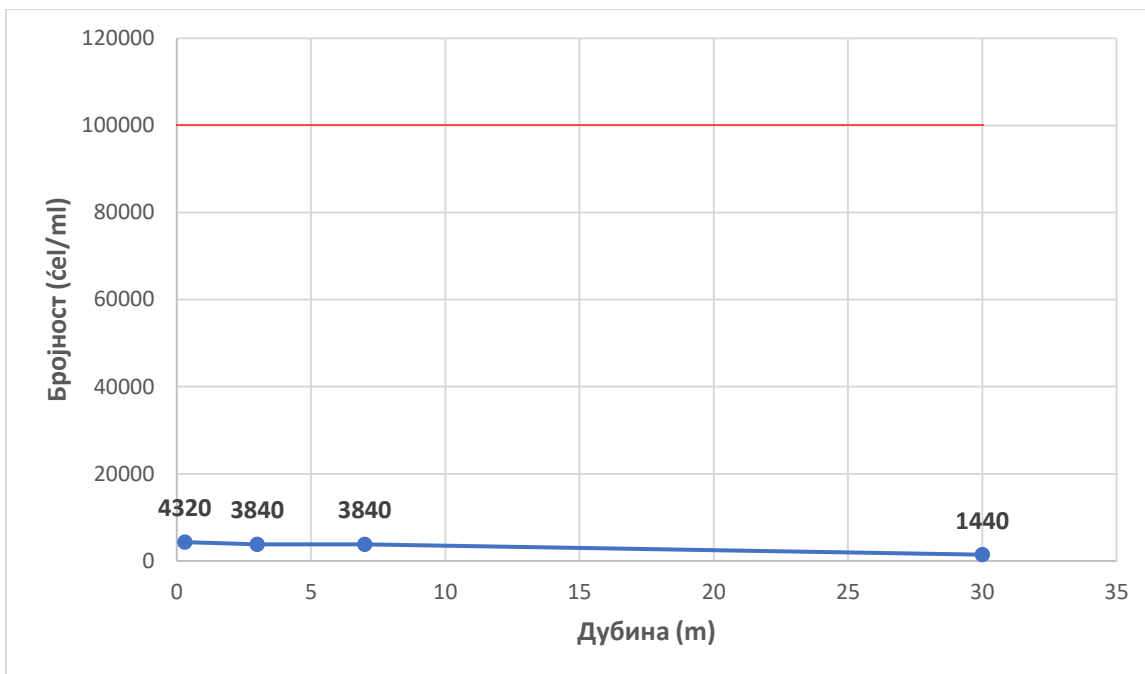
Табела 4. Бројност цијанобактерија *P. rubescens* у узорку (ћел/ ml)

	08.09.2017.	09.12.2017.	12.03.2018.	07.06.2018.
0,3 метра	28560	4320	20160	67920
3 метра	6720	3840	73440	5760
7 метара	127680	3840	132960	38160
30 метара	4560	1440	3600	3360

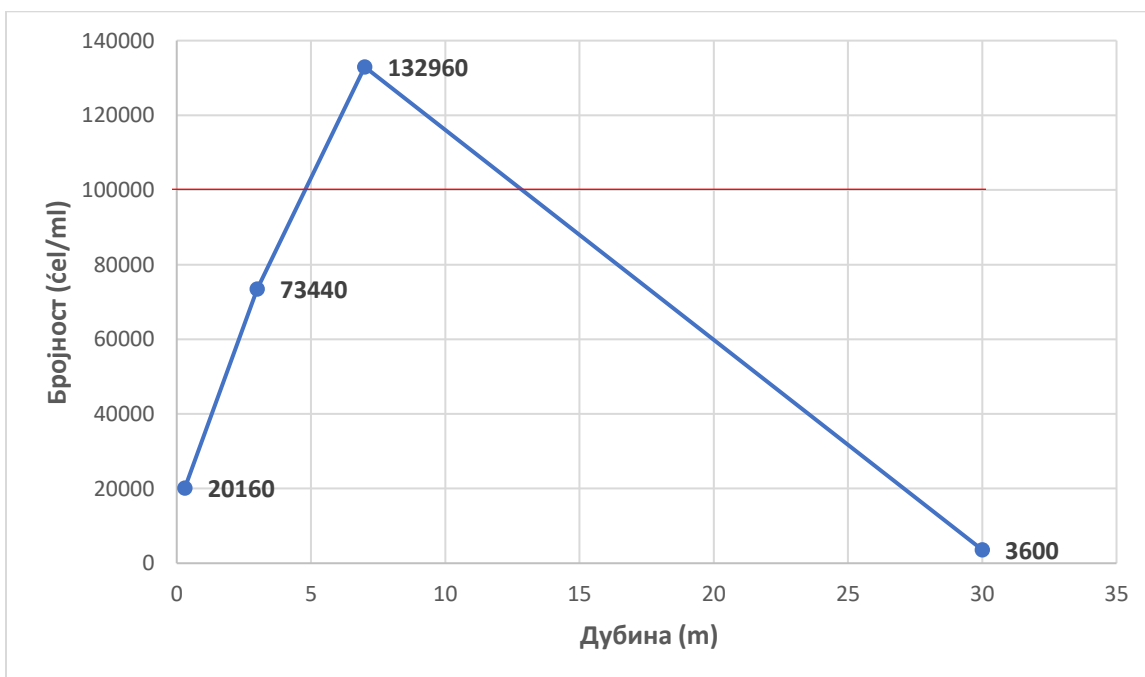
Бројност цијанобактеријских ћелија у узорцима приказана је и у виду графикана где се може уочити вертикална дистрибуција *P. rubescens* дуж воденог стуба као и максимум заступљености.



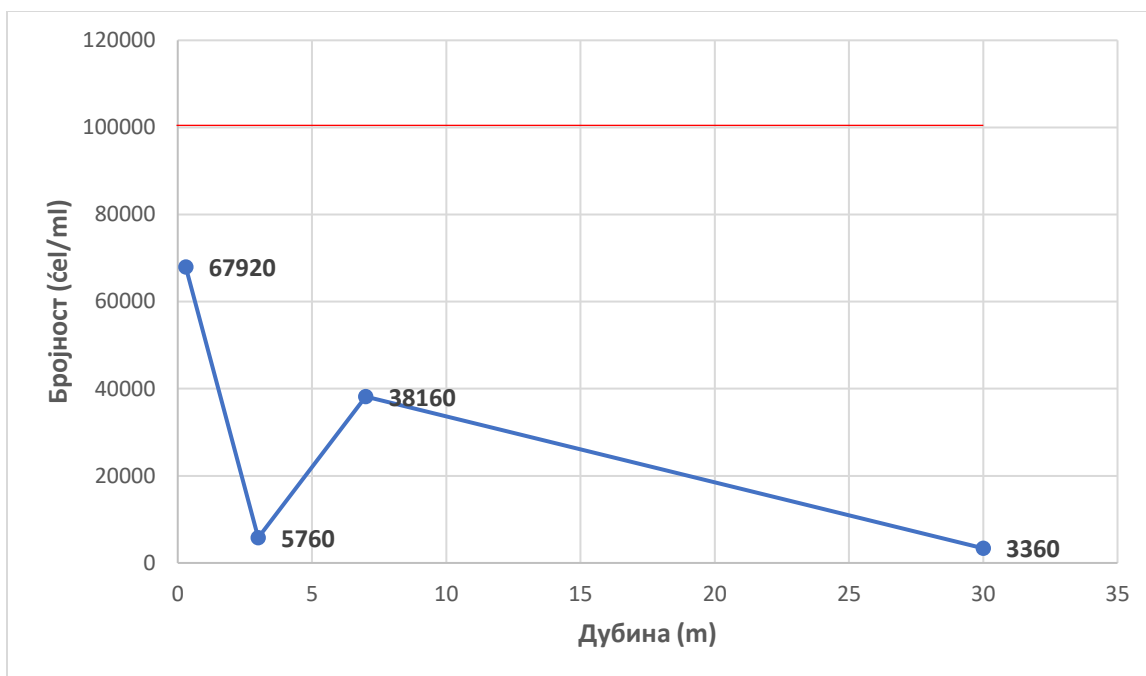
Графикон 1. Бројност *P. rubescens* након првог термина узорковања 08.09.2017. године



Графикон 2. Бројност *P. rubescens* након другог термина узорковања 09.12.2017. године



Графикон 3. Бројност *P. rubescens* након трећег термина узорковања 12.03.2018. године

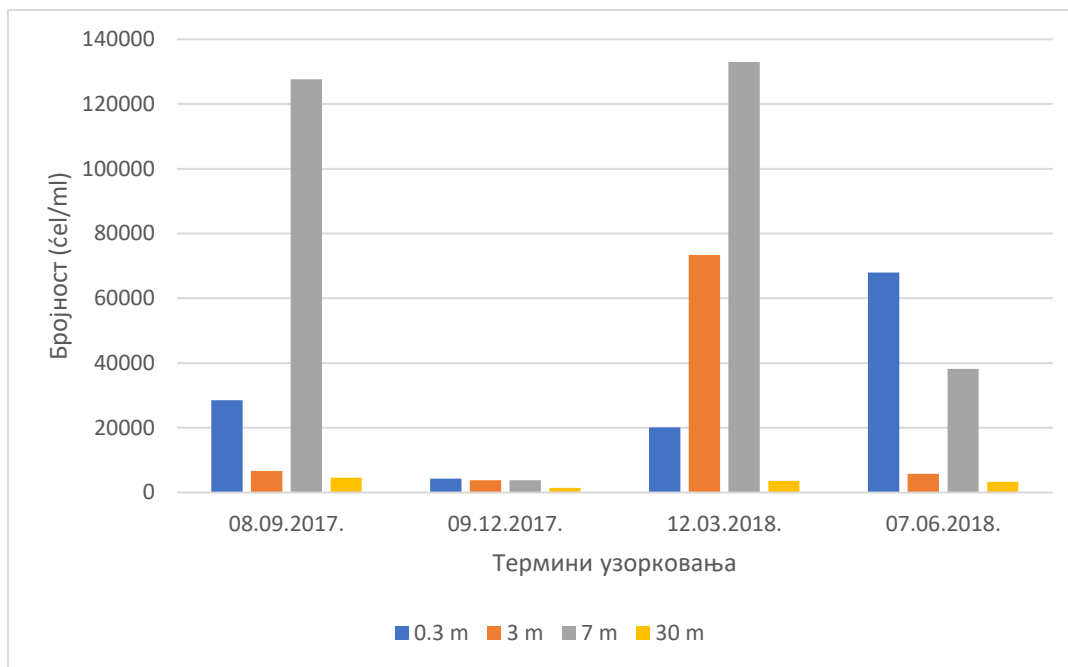


Графикон 4. Бројност *P. rubescens* након четвртог термина узорковања 07.06.2018. године

P. rubescens детектован је у свим узетим узорцима, на свим дубинама у сва четири термина узорковања. Највеће забележене бројности измерене су на дубини од 7m у септембру и марту и износиле су 127.680 ћел/ml (08.09.2017.) и 132.960 ћел/ml (12.03.2018. године) и констатовано је масовно цветање цијанобактерија, али без видљивих манифестација на површини језера у виду пурпурно-црвене скраме која се појавила две до три недеље након узорковања. Као што је претходно у раду наведено, према Директиви СЗО за управљање водама намењеним за водоснабдевање које могу да садрже цијанобактеријске ћелије, бројност ћелија преко 100.000 ћел/ml представља опасност високог степена.

Опасност средњег степена (2.000 ћел/ml и више) забележена је у свим осталим узорцима узетим у сва четири термина са напоменом да је пурпурно-црвена скрама констатована на површини језера приликом узорковања 09.12.2017 годи иако је забележена бројност цијанобактеријских ћелија на свим дубинама била најмања (у односу на узорке узете у другим терминима).

Како је *P. rubescens* металимнионска цијанобактерија, највећа бројност ћелија се очекивала на тој дубини језера. С тога су узорковања вршена квартално (септембар, децембар, март и јун) и бројност је приказана на хистограму. Може се уочити зависност између бројности цијанобактеријских ћелија и температурне стратификације језера у различитим годишњим добима (Хистограм 1).



Хистограм 1. Приказ бројности ћелија *P. rubescens* (ћел/ml) у сва четири термина узорковања

4.5. Предлог протокола за мониторинг цијанобактерија

Увидом у резултате претходних истраживања спроведених у протеклих пет година, тим Факултета Футура је у склопу пројекта „Биолошки аспект оперативног мониторинга акумулације Врутци“ израдио детерминатор присутних врста алги и цијанобактерија акумулације Врутци. Сврха детерминатора је да олакша идентификацију присутних микроорганизама у узорку, да убрза процес детерминације и бројања биоиндикаторских врста и да се проценат грешке приликом бројања сведе на минимум.

Израђен је и предлог Протокола везан за процедуре биолошке контроле воде у лабораторији сектора за производњу воде ЈКП „Водовод“ Ужице.

Чланови тима Факултета Футура израдили су интерактивну табелу за квантитативну и квалитативну анализу и базу података пописаних врста присутних у узорку чиме је омогућена бржа обрада добијених резултата као и њихово архивирање за дужи временски период.

Увидом у све мере неопходне за примену оперативног биолошког мониторинга израђен је формлар који ће се користити у будућности у оквиру редовног мониторинга акумулације (Слика 24) и је шема пројектовања програма мониторинга (Слика 25).

Место узорковања.....

Датум..... Време.....

Додатне информације о локацији (на полеђини скицирати места на мапи где је уочено
цветање цијанобактерија):

.....

Боја воде: бистра ☐ мутна ☐ зелена ☐
Друга

Површинска скрама: Не ☐ Да ☐ боја
степен заступљености

Хидрофите: Не ☐ Да ☐ флотантне ☐
 емерзне ☐
 субмерзне ☐
 степен заступљености

Уочене алге: Не ☐ Да ☐ на стенама ☐
 у муљу ☐
 на биљкама ☐
 степен заступљености

Мирис воде: Не ☐ Да ☐ земљани ☐
 устајалост ☐
 други

Узорак прикупљених макрофита/алги: Да ☐ Не ☐

Коментар

.....

.....

Назив узорковача:

Прима: Датум

Слика 24. Формулар за визуелну инспекцију терена



Слика 25. Шематски приказ пројектовања програма мониторинга

5. Закључак

На основу изложених и дискутованих резултата у овом мастер раду могу се формулисати следећи закључци:

1. У акумулацији Врутци у периоду од септембра 2017. године до јуна 2018. године у сва четири термина узорковања и на свим дубинама је детектовано присуство цијанобактерија;
2. Утврђена је позитивна корелација између бројности цијанобактерија и концентрације хлорофила А на различитим дубинама;
3. На основу микроскопске идентификације утврђено је доминантно присуство *P. rubescens* у свим узорцима;
4. Главни недостатак директног пребројавања јесте да се квантификација и идентификација не могу радити истовремено због постојаности нативних препарата. Из тог разлога неопходно је да се бројност трихома ради на светлосном микроскопу, док се бројност ћелија утврђује коришћењем инвертног микроскопа;
5. Динамика дистрибуције *P. rubescens* показује да њена бројност периодично варира од површине до 30m дубине у зависности од термичке стратификације језера. У два термина узорковања, на дубини од 7m забележена је бројност преко 100.000 *cel/ml* и то у узорцима прикупљеним 08.09.2017. и 12.03.2018. године од 127.680 и 132.960 *cel/ml*, респективно.
6. По директиви WHO утврђена бројност представља опасност високог ризика где се препоручује прекид водоснабдевања са акумулације, замена изворишта, увођење дневног тестирања токсина, недељни мониторинг бројности цијанобактерија, упозорава се на висок ризик од негативних здравствених ефеката и шире медијско извештавање јавности;
7. Добијени резултата указују да је неопходно имплементирати препоруке WHO је осмислити програм мониторинга који ће се редовно спроводити у акумулацији Врутци у циљу адекватног управљања овим водних ресурсом.

Литература

Bright and Walsby (1999), The relationship between critical pressure and width of gas vesicles in isolates of *Planktothrix rubescens* from Lake Zürich, England

Christiansen, Fastner J, Erhard M, Börner T, Dittmann E (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacteriol* 185:564–572 doi:10.1128/JB.185.2.564-572.2003

Cvijan Mirko (2000), *Ekologija zagađenih sredina, bioindikatori i monitoring*, Beograd

Cvijan Mirko i Blaženčić Jelena (1996), *Cyanophyta*, Beograd

Đeković et al (2017), Analiza kvaliteta vode u akumulaciji Vrutci, *Šumarstvo* 2017, 3-4, 175-188

Đuraković et al (2014), Sastav fitoplanktona i fizičko-hemijske karakteristike akumulacije Vrutci

<http://www.cecra.dh.pmf.uns.ac.rs/pdfww2009/Cijanotoksini%20u%20vodi%20za%20vodsnabdevanje-WW09%20I%20deo.pdf>, 24.05.2018.

<http://www.preslia.cz/P144Komarek.pdf>, 31.05.2018.

<http://www.rdvode.gov.rs/doc/dokumenta/direktive-eu/1.%20Direktiva%20o%20vodama%202000-%20tekst%20i%20anex%20I-X-prec.tekst.pdf>, 23-24.05.2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 03.07.2018.

<https://www.waterra.com.au/>, 15-19.06.2018.

Institut za vodoprivredu Jaroslav Černi AD (2015), Prikupljanje podataka i izrada analiza i dokumentacije za sanaciju akumulacije Vrutci

International Guidance Manual for the management of toxic cyanobacteria, Australia

Jacquet et al (2005), The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget), France

Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J. R. (2014): Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. – *Preslia* 86: 295–335.

Legnani et al, 2005, *Planktothrix rubescens*' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy), Italy

Srpsko društvo za zaštitu voda i Institut za vodoprivredu „J. Černi“ (2014), „VODA 2014“, Tara, str. 33-40

Svirčev Zorica (2005), *Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji*, Novi sad

Subakov Simić Gordana (2012), *Monitoring površinskih voda na osnovu algi*, Beograd

Takodi Nada (2016), *Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije*, Novi Sad

Walsby A. E. (1994), *Gas vesicles*, England