

ХЕПАТОТОКСИЧНИ ПРОДУКТИ ЦИЈАНОБАКТЕРИЈА И ЊИХОВО ТОКСИКОЛОШКО ДЕЈСТВО

Весна Карацић, Јелена Јовановић, Снежана Живковић-Перишић, Драгана Јовановић, Милан Миленковић

Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут”

HEPATOTOXIC PRODUCTS OF CYANOBACTERIA AND THEIR TOXICOLOGICAL EFFECTS

Vesna Karadžić, Jelena Jovanović, Snežana Živković, Dragana Jovanović, Milan Milenković

Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut”

Сажетак

Хронична изложеност људи води која је контаминирана цијанобактеријским хепатотоксичним једињењима (цијанотоксинама) може довести до повећане учесталости појаве карцинома или других облика обољења јетре. Људи могу бити изложени цијанотоксинама путем ингестије, инхалације и дермалног контакта, односно преко пијаће воде, воде за рекреацију, воде за хемодијализу или преко хране. Код цијанотоксина са хепатотоксичним дејством, превасходно се издвајају циклични пептиди микроцистини и нодуларин, потом трициклични алкалоид цилиндроспермопсин, а последњих година испитује се и токсично дејство новооткривеног хепатотоксичног цијанобактеријског секундарног метаболита – лимнотриксина. Због различитих хемијских структура ових цијанотоксина, постоје и различити механизми њиховог токсичног дејства. На глобалном нивоу, хепатотоксини су најчешће заступљени цијанобактеријски токсини и, међу њима, микроцистини се истичу као најчешће детектовани приликом цијанобактеријског цветања и као најопсежније изучени. Ово последње је случај и у Републици Србији, где су случајеви цветања цијанобактерија у водама које се користе као изворишта за водоснабдевање претежно везани за врсте које су потенцијални продуценти управо микроцистина (нпр. представници родова *Microcystis* и *Planktothrix*). Такође, микроцистини су и једина група хепатотоксичних цијанотоксина за коју је успостављено редовно праћење у нашој земљи, и то пре свега код вода које се користе за водоснабдевање. Због повећане учесталости појаве цијанобактеријског цветања како у свету тако и код нас, веома је важно знати и разумети токсичност и потенцијалну канцерогеност хепатотоксичних продуката цијанобактерија, што је и главни циљ овог рада.

Кључне речи: цијанобактерије, цијанотоксини, хепатотоксини, хепатоцелуларни карцином (HCC), микроцистини, цилиндроспермопсин

Abstract

Chronic human exposure to water contaminated with hepatotoxic cyanobacterial compounds (cyanotoxins) can lead to an increased incidence of hepatocellular carcinoma or other forms of liver disease. Humans can be exposed to cyanotoxins through ingestion, inhalation and dermal contact, i.e. by using contaminated drinking water, recreational water, water used for hemodialysis or via food. Among hepatotoxic cyanotoxins, cyclic peptides microcystins and nodularin should be emphasized, as well as the tricyclic alkaloid cylindrospermopsin. In addition, the existence of a new hepatotoxic cyanobacterial secondary metabolite, called limnотrixin, has been investigated in recent years. Due to the different chemical structures of these cyanotoxins, mechanisms of their toxic effects also differ. Globally, hepatotoxins are the most common cyanobacterial toxins and, among them, microcystins are the most frequently detected during cyanobacterial blooms and also the most extensively studied. The latter is also the case in the Republic of Serbia, where cases of cyanobacterial blooms in water bodies used for water supply are mostly related to species that are potential microcystin producers (e.g. representatives of the genera *Microcystis* and *Planktothrix*). Additionally, microcystins are the only group of hepatotoxic cyanotoxins for which regular monitoring has been established in our country, which primarily refers to the water bodies used as water supply sources. However, since there is an increased frequency of cyanobacterial blooming, both worldwide and in our country, it is very important to monitor potential risks and understand the toxicity and potential carcinogenicity of hepatotoxic products of cyanobacteria, which was the main aim of this study.

Key words: cyanobacteria, cyanotoxins, hepatotoxins, hepatocellular carcinoma (HCC), microcystins, cylindrospermopsin

Болести јетре представљају велики здравствени проблем широм света и велико су глобално оптерећење за друштво. Важан су узрок морбидитета и mortalитета у свету. Главни фактори ризика су вируси хепатитиса Ц и Б, тешка конзумација алкохола и безалкохолна болест јетре [1]. Безалкохолна болест јетре односи се на скуп болести јетре код људи који пију мало или нимало алкохола. Безалкохолна болест јетре развија се у велики светски здравствени проблем [1] и у вези је са годинама старости популације, полом и гојазношћу као потенцијалним факторима ризика [2]. Многа истраживања указују на то да безалкохолна болест јетре брзо постаје још један важан узрок хепатоцелуларног карцинома [3]. Према неким студијама [3, 4] хронична изложеност људи води за пиће која је загађена цијанобактеријским токсичним једињењима може се у неким случајевима, у комбинацији са другим факторима, довести у везу са повећаном учесталости карцинома јетре, или хроничним оштећењем и болестима јетре.

Цијанобактерије, познате и као модрозелене алге, су фотосинтетски прокариоти праисторијског порекла (прекамбријум) [5]. Као древни облик живота, оне заузимају готово сваку постојећу еколошку нишу, а њихова бројност ограничена је доступношћу хранљивих материја, одговарајућом температуром и количином светлости. У воденим екосистемима цијанобактерије су увек присутне, и њихова бројност може да варира од врло малог броја, па до више од милион ћелија/ml. Висока бројност или цветање цијанобактерија у површинским водама испољава се одређеном временском (сезонском) динамиком. Неке реке и језера имају сезонско цветање које започиње у лето и траје до касне јесени, у неким цветање обухвата сва годишња доба, а негде се јављају екстремни пикови или падови у трајању од само неколико дана, или недеља. Са променом глобалне климе и повећањем антропогенних активности, еутрофикација воде (повећан прилив нутријената, једињења азота и фосфора) довела је до учесталијих цветања цијанобактерија [3, 6, 7], тако да ова цветања постају озбиљан проблем у многим водним телима широм света. Штетно алгално цветање се означава као *HAB* (енгл. *Harmful Algal Blooms*) и дефинише се као цветање које има негативан еколошки и социоекономски утицај и представља претњу по јавно здравље [8].

Хепатотоксични продукти цијанобактерија

Цијанобактерије имају способност да синтетишу велики број секундарних метаболита, где спадају и цијанотоксини који су хетерогени по структури, активно-

Liver disease represents a grave health problem worldwide and imposes a great global burden of disease on society. This is an important cause of morbidity and mortality worldwide. Hepatitis C and B viruses, severe alcohol consumption and non-alcoholic liver disease represent the main risk factors [1]. Non-alcoholic liver disease refers to a cluster of liver diseases in people that consume little or no alcohol. Non-alcoholic liver disease is a growing global health problem [1] which correlates with population age, sex, excess weight and various potential risk factors [2]. Numerous studies indicate that non-alcoholic liver disease is quickly becoming yet another very important cause of hepatocellular carcinoma [3]. According to some studies [3, 4], chronic exposure to drinking water contaminated with cyanobacterial toxic compounds can, in some cases and in combination with other factors, correlate with an increase in liver cancer incidence or chronic liver damage and liver disease.

Cyanobacteria, also known as blue-green algae, are photosynthetic procaryotes of ancient decent (Precambrian) [5]. As one of the earliest forms of life, they take up nearly every existing ecological niche, while their abundance is limited by the availability of nutrients, adequate temperature and light. In aquatic ecosystems, cyanobacteria are always present and their abundance can vary from a very low number up to more than a million cells/mL. The high number or blooming of cyanobacteria in surface waters is manifested through a specific temporal (seasonal) dynamic. Some rivers and lakes have seasonal blooms that start in the summer and last until the late fall, in some water bodies blooms occur in all seasons, while in others extreme peaks and drops appear in a time range of several days or weeks. With climate change and the increase in anthropogenic activities, water eutrophication (increased inflow of nutrients, especially nitrogen and phosphorus compounds) has increased the frequency of cyanobacterial blooms [3, 6, 7], which became a serious problem in many water bodies worldwide. Harmful algae blooms are marked as *HAB* (Harmful Algal Blooms) and defined as blooms which have negative ecological and socioeconomic effects and pose a threat to public health [8].

Hepatotoxic products of cyanobacteria

Cyanobacteria have the capacity to synthesize a large number of secondary metabolites, which include cyanotoxins that differ in structure, activity and stability. Cyanotoxins represent a wide spectrum of toxic compounds of low molecular weight, with no colour, taste or smell, which means they often go unnoticed by water body users and water

сти и стабилности. Цијанотоксини представљају широк спектар токсичних једињења мале молекулске тежине, који су без боје, укуса и мириса, тако да често бивају непримећени од стране корисника водних тела и потрошача воде [9]. Ови метаболити могу доспети у воду директно, или након ћелијског распадања, што може имати велике последице на акватичне организме, као и на здравље људи и животиња. Први научни извештај о негативним последицама цветања воде је објављен далеке 1878. године за језеро Александрина у Аустралији, и односио се на помор домаћих животиња услед тровања водом у којој су цветале цијанобактерије (врста *Nodularia spumigena*). Аутор George Francis је рад под називом „Отровано Аустралијско језеро” објавио за престижни научни часопис *Nature*.

Људи изложени цијанобактеријским токсинима могу развити различите симптоме и болести. Примарни ефекти цијанотоксина укључују акутну хепатотоксичност, акутну неуротоксичност, гастроинтестиналне симптоме и респираторне, дерматолошке и алергијске реакције [10].

Хепатотоксини су глобално најчешће заступљени цијанобактеријски токсини [11]. У ову групу се убрајају: микроцистини, нодуларини и цилиндроспермопсини [6, 12], а према неким сазнањима ту спада и токсин лимнотриксин [7, 13]. Стабилност и постојаност хепатотоксичних продуката цијанобактерија у животној средини зависи од њихове структуре и чини уклањање ових једињења проблематичним што повећава укупне здравствене ризике које ови токсини представљају у водама за пиће и рекреацију [12].

Микроцистин и нодуларин – хепатотоксични циклични пептиди

Микроцистини (MCs) су стабилни и неиспарљиви молекули, растворљиви у води [14]. По хемијској структури су циклични полипептиди који се састоје од 7 аминокиселина, молекулске тежине која варира између 800 и 1100 Da. Прва хемијска структура токсичних цијанобактеријских цикличних пептида идентификована је почетком осамдестих година прошлог века [12, 15], да би се број потпуно окарактерисаних молекула из ове групе токсина значајно повећао током последње две деценије. Прва таква супстанца нађена у води имала је структуру: цикло-(D-аланин1-X2-D-MeAsp3-Z4-Adda5-D-глутамат-6-Mdha7), где D-MeAsp3 представља D-еритро-β-метиласпартаатну киселину, Mdha је N-метилдехидроаланин, а X и Z су промењиве L аминокиселине (слика 1.1). X је најчешће леуцин (L), аргинин (R) или тирозин (Y), а Z аргинин (R), аланин

consumers [9]. These metabolites can reach the water directly or after cell decay, and can have a negative effect on aquatic organisms, as well as on the health of people and animals. The first scientific report on the negative consequences of water bloom was published in 1878 for the Lake Alexandrina in Australia, and it referred to the death of domestic animals due to poisoning by water in which cyanobacteria had bloomed (species: *Nodularia spumigena*). The author, George Francis, published a paper named “Australian Poisoned Lake” for the prestigious scientific journal “Nature”.

People exposed to cyanobacterial toxins can develop various symptoms and diseases. The primary effects of cyanotoxin exposure include acute hepatotoxicity, acute neurotoxicity, gastrointestinal symptoms and respiratory, dermatological and allergic reactions [10].

Hepatotoxins are globally the most prevalent cyanobacterial toxins [11]. This group includes: microcystins, nodularins and cylindrospermopsins [6, 12]; some researchers also classify the toxin limnethrixin in this group [7, 13]. Stability and persistence of hepatotoxic cyanobacterial products in the environment depend on their structure, which complicates the removal of these compounds and therefore increases the overall health risks due to their presence in drinking and recreational waters [12].

Microcystin and nodularin – hepatotoxic cyclic peptides

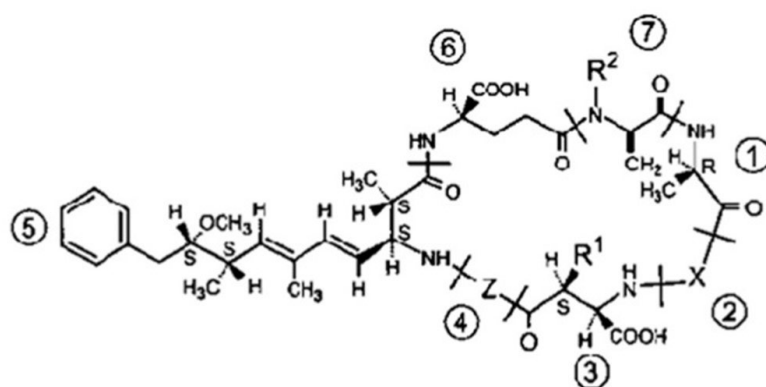
Microcystins (MCs) are stable, non-volatile, water-soluble molecules [14]. In terms of chemical structure, they are cyclic polypeptides consisting of 7 amino acids, with molecular weight that ranges between 800 and 1100 Da. The first chemical structure of toxic cyanobacterial cyclic peptides was identified in the early 80s [12, 15], while the number of fully characterized molecules belonging to this group of toxins significantly increased in the last two decades. The first substance from this group found in water had the structure: cyclo-(D-alanine1-X2-D-MeAsp3-Z4-Adda5-D-glutamate-6-Mdha7), where D-MeAsp3 represents D-erythro-β-methylaspartic acid, Mdha is N-methyldehydroalanine, while X and Z are variable L amino acids (Figure 1.1). X is usually leucine (L), arginine (R) or tyrosine (Y), while Z is arginine (R), alanine (A) or methionine (M). If those are for example, leucine (L) and arginine (R), this structural variant of microcystin is then microcystin-LR (MC-LR). To date, more than 240 structural variants of MCs were reported [16], which differ not only in X and Z amino acid positions, but also in other modifications, such as demethylation of N-methyldehydroalanine, methylaspartic acid or Adda [7]. The amino acid Adda, (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-

(A) или метионин (M). Ако су то, на пример, леуцин (L) и аргинин (R), ова структурна варијанта микроцистина се тада назива микроцистин-LR (MC-LR). До данас је пријављено више од 240 структурних варијанти MC-a [16], које се разликују не само у аминокиселинама на позицијама X и Z, већ и у другим модификацијама, као што су деметилације N-метилдехидроаланина, метиласпарагинске киселине или Adda [7]. Аmino-киселина Adda, (2S,3S,8S,9S)-3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеноилна киселина, најчешћа је структура и јединствена карактеристика у овој групи токсина.

Микроцистини су најчешћи токсини детектовани приликом цветања цијанобактерија, а такође су и најопсежније проучавани цијанотоксини. Синтетишу се преко мултиензимских комплекса нерибосомалних поликетид/пептид синтетазе кодираних генском групом *mcy*. Назив су добили по врсти *Microcystis aeruginosa* (слика 1.2.) из које су први пут изоловани [17], али их продукују и врсте из родова: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Radiocystis*, *Rivularia*, *Synechococcus*, *Synechocystis* и *Tolypothrix* [4, 18]. На слици 1. (2–7) приказане су цијанобактерије, продуценти микроцистина, које су најчешће забележене у површинским водама у Србији.

methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, is the most common structure and a unique characteristic in this group of toxins.

Microcystins are most frequently detected molecules during cyanobacterial blooms and are also the most extensively studied cyanotoxins. They are synthesized by multienzyme complexes of non-ribosomal polyketide/peptide synthetase coded through the *mcy* gene cluster. They were named after *Microcystis aeruginosa* (Figure 1.2.) from which they were first isolated [17], but they are also produced by species belonging to the orders: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Radiocystis*, *Rivularia*, *Synechococcus*, *Synechocystis* and *Tolypothrix* [4, 18]. Figure 1 (2-7), shows the most common microcystin producing cyanobacteria in Serbian surface waters.



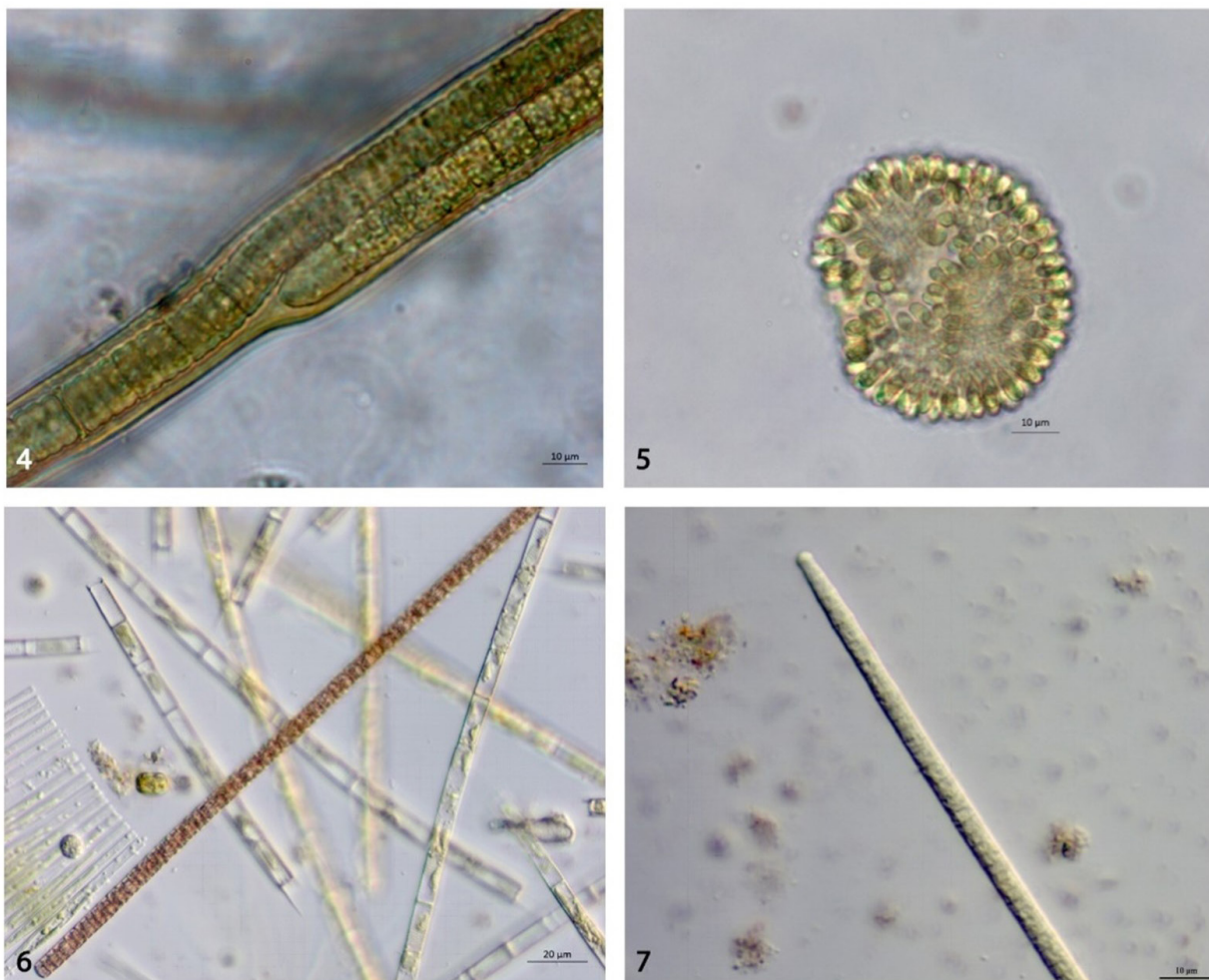
1



2



3



Слика 1. Хемијска структура микроцистина (1) и врсте које га продукују: *Microcystis aeruginosa* (2), *Oscillatoria limosa* (3), *Plectonema* sp. (4), *Woronichinia naegeliana* (5), *Planktothrix rubescens* (6), *Planktothrix agardhii* (7)

Откриће гена биосинтезе микроцистина у *Microcystis*-у је поплочало пут не само за идентификацију и расветљавање путева синтезе микроцистина у филаментозним цијанобактеријским родовима попут *Planktothrix* и *Anabaena*, већ је довело и до открића ензима укључених у биосинтезу нодуларина (*NOD*) у врсти *Nodularia spumigena* [19].

Нодуларини (*NODs*) су по хемијској структури, као и микроцистини, циклични пептиди, али се састоје се од 5 аминокиселина молекулске масе 824 Da [20]. Генеричка аминокиселинска секвенца нодуларина састоји се од (1) MeAsp, (2) L-аргинина (Arg, R), (3) Adda, (4) d-глутаминске киселине (Glu, E) и (5) 2-метиламино-2-бутеноичне киселине (N-метилдехидробутирин). Структурне варијације се могу јавити на свакој аминокиселинској позицији пептида. Структурна аналогија између *NOD* и *MC* узрокована је сродним биосинтетским механизмима [19]. Нодуларин је идентификован у бракичним водама Аустралије, Балтичком мору и на Новом Зеланду. До данас је пријављено 10 структурних

Figure 1. The chemical structure of microcystin (1) and the species which produce it *Microcystis aeruginosa* (2), *Oscillatoria limosa* (3), *Plectonema* sp. (4), *Woronichinia naegeliana* (5), *Planktothrix rubescens* (6), *Planktothrix agardhii* (7).

The discovery of microcystin biosynthetic genes in *Microcystis aeruginosa* paved the way not only for the identification and understanding of the MC synthesis paths among filamented cyanobacterial genera, such as *Plancto*thrix and *Anabaena*, but also to the discovery of enzymes included in the nodularin biosynthesis (*NOD*) by species *Nodularia spumigena* [19].

As microcystins, nodularins (*NODs*) are cyclic peptides in structure, consisting of 5 amino acids, with a molecular weight of 824 Da [20]. The generic amino acid sequence of nodularin consists of (1) MeAsp, (2) L-arginine (Arg, R), (3) Adda, (4) d-glutamic acid (Glu, E) and (5) 2-methylamino-2-butyric acid (N-methyldehydrobutyrin). Structural variations can appear in each amino acidic peptide position. The structural analogy between *NOD* and *MC* is a consequence of their related biosynthetic pathways [19]. Nodularin was identified in brackish waters of Australia and the Baltic Sea, as well as in New Zealand. There are 10 structural variants of nodularin reported to date [16].

варијанти нодуларина [16].

Цилиндроспермопсин

Цилиндроспермопсин (CYN) је састављен од трицикличног алкалоида где је трициклична компонента гванидин за који је са једне стране везан хидроксиметилурацил (слика 2.1.), а са друге сулфатни јон, молекулске тежине 415 Da [12, 15]. Тренутно је познато четири аналога цилиндроспермопсина, на пример, деоксицилиндроспермопсин (deoxy-CYN), мање токсична варијанта цилиндроспермопсина и, као што му име говори, недостаје кисеоник везан за урацилов прстен; епимер цилиндроспермопсина 7-епи-цилиндроспермопсин (7epi-CYN) који се разликује по оријентацији хидроксилне групе урацилног прстена, као и две недавно окарактерисане варијанте 7-деоксидесулфо-CYN и 7-деоксидесулфо-12-ацетил-CYN [21].

Цилиндроспермопсин продукује велики број слатководних цијанобактерија: *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Lyngbya wollei*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena laponica*, *Dolichospermum mendotae*, *Chrysosporum bergii* и *Chrysosporum ovalisporum* [18, 22]. Врсте *Aphanizomenon flos-aquae* и *Aphanizomenon gracile* су најзначајнији продуценти CYN-а у Европи [21]. На слици 2. приказане су врсте, продуценти цилиндроспермопсина, које се најчешће срећу у површинским водама у Србији.

Лимнотриксин

Тек недавно су неке студије започеле испитивање токсичности *Limnothrix*-а [13, 23]. Ови радови нису открили присуство претходно описаних цијанобактеријских токсина (микроцистини, сакситоксини и цилиндроспермопсини). Такође, BLAST претраге генома *Limnothrix*-а нису дале резултате ни за токсине анатоксин и лингбиатоксин. Стога, предложен је нови назив за овај токсин – „лимнотриксин“, који је повезан са оштећењима јетре, плућа и гастроинтестиналног тракта мишева [13], као и токсичном активношћу на ларвама жабе *Bufo marinus* [23]. Међутим, будући да још увек није позната структура овог токсина, идентификација гена одговорних за његову биосинтезу је тешка.

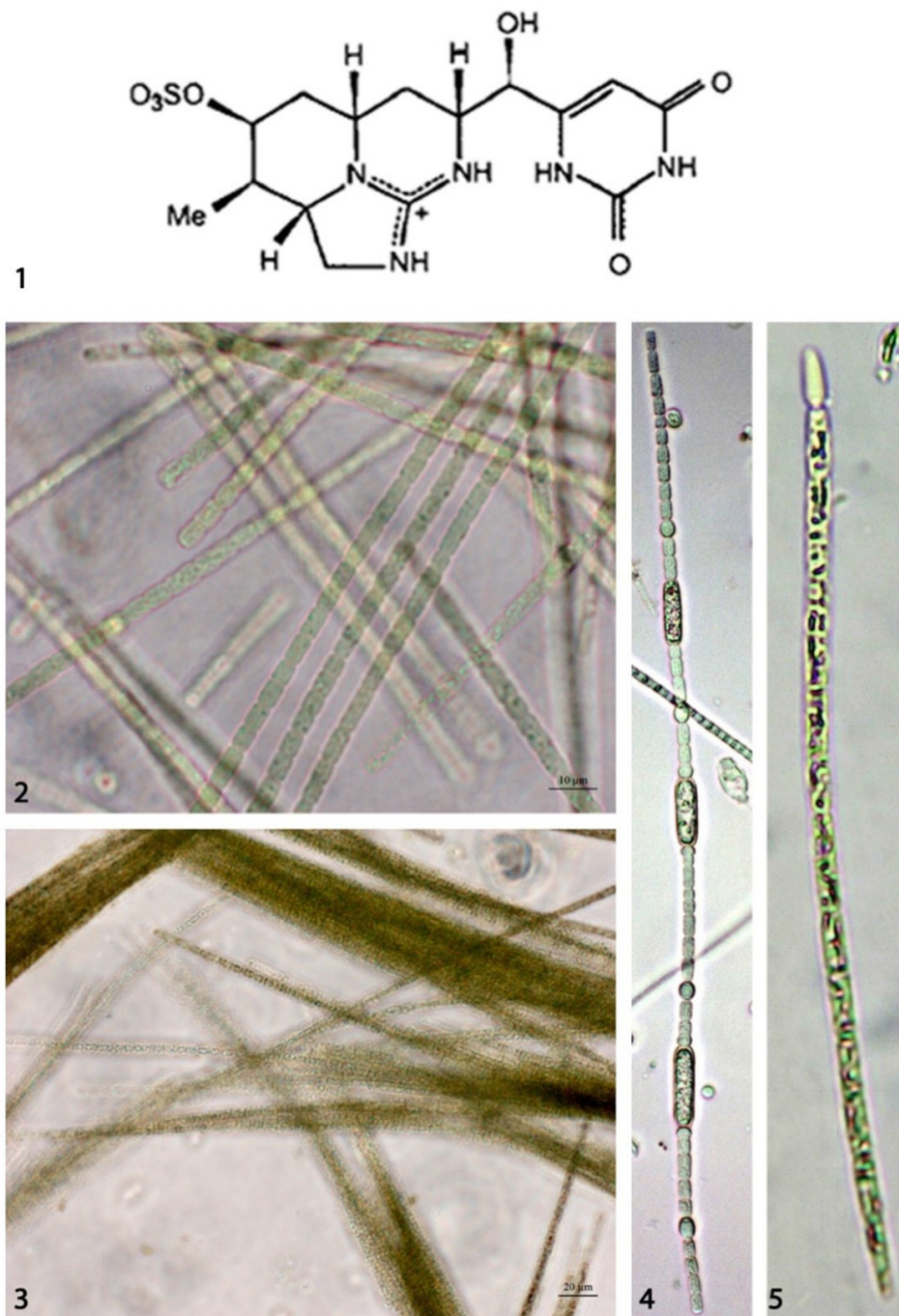
Cylindrospermopsin

Cylindrospermopsin (CYN) consists of a tricyclic alkaloid with molecular weight of 415 Da, wherein the tricyclic component is guanidine with hydroxymethyluracil attached on one side (Figure 2.1) and sulphate ion on the other [12, 15]. There are only four cylindrospermopsin analogs known, e. g. deoxy-cylindrospermopsin (deoxy-CYN), a less toxic variant of cylindrospermopsin, and as the name suggests, lacking the oxygen bound to the uracil ring; epimer of cylindrospermopsin, 7-epicylindrospermopsin (7epi-CYN), which differs in orientation of the hydroxyl group in the uracil ring, as well as two recently characterized variants 7-deoxy-desulpho-cylindrospermopsin-CYN and 7-deoxy-desulpho-12-acetyl-CYN [21].

Cylindrospermopsin is produced by a large number of freshwater cyanobacteria: *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Lyngbya wollei*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena laponica*, *Dolichospermum mendotae*, *Chrysosporum bergii* and *Chrysosporum ovalisporum* [18, 22]. Species *Aphanizomenon flos-aquae* and *Aphanizomenon gracile* are the most significant producers of CYN in Europe [21]. Figure 2. shows the most frequent cylindrospermopsin-producing species in Serbian surface waters.

Limnothrixin

Recently, some studies started investigating the toxicity of *Limnothrix* [13, 23]. This research did not reveal the presence of previously described cyanobacterial toxins (microcystins, saxitoxins, and cylindrospermopsins). In addition, a BLAST-search of *Limnothrix* genomes did not yield any results for the toxins anatoxin and lyngbyatoxin. Thus, a new name was suggested for this cyanotoxin – “limnothrixin”, which is associated with liver, lung, and gastrointestinal tract damage in mice [13], as well as the toxic activity against *Bufo marinus* larvae [23]. However, given that the structure of this toxin hasn't been resolved yet, identification of the genes responsible for its biosynthesis is difficult.



Слика 2. Хемијска структура цилиндроспермопси-на (1) и врсте које га производе: *Aphanizomenon flos-aquae* (2–3), *Aphanizomenon gracile* (4), *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* (5)

Figure 2. The chemical structure of cylindrospermopsin (1) and species that produce it: *Aphanizomenon flos-aquae* (2–3), *Aphanizomenon gracile* (4), *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*

Токсиколошки механизми

Токсичност микроцистина зависи од удела коњугованих диена у Adda аминокиселини и нивоа метилације [12]. Adda регион је у интеракцији са активним местом протеин фосфатазе 1 и 2A. Ковалентна веза између метилхидроаланина и остатака цистеина на фосфатазама доводи до иреверзибилне инхибиције протеин фосфатазе 1 и 2A. Због своје величине и хидрофилности микроцистини не могу проћи кроз ћелијску мембра-

Toxicological mechanisms

Microcystin toxicity depends on the ratio of conjugated dienes in the Adda amino acid and the methylation levels [12]. Adda region interacts with the active site of protein phosphatases 1 and 2A. Covalent binding between the methyldehydroalanine of microcystins and cysteine residues on the phosphatases leads to an irreversible inhibition of protein phosphatase 1 and 2A. Due to their size and hydrophilicity, microcystins cannot pass through the cell

ну простом дифузијом. Стога, акумулација микроцистина у ћелијама зависи од изражености специфичног Na^+ -независног органско анјонског транспорта полипептида (OATP). Органско анјонски транспорт полипептида олакшава једносмерни активни унос биохемијских једињења и нутријента за каснију дистрибуцију, метаболизам и екскрецију у различитим ткивима [12]. Ова група транспортера је изражена у различитим типовима ћелија, укључујући бубрежне епителне ћелије, ентероците (цревне адсорптивне ћелије), хепатоците, као и ћелије срца, плућа, слезине. После оралне, интраперитонеалне или интравенске интоксикације, јетра је главни циљни орган акумулације микроцистина и нодуларина. Након уласка у хепатоците, ови токсини инхибирају серин протеин фосфатазу 1 и 2A успостављајући ковалентну везу са ензимом у случају микроцистина и не-ковалентну везу за нодуларин [24]. Дисбаланс протеин фосфорилације изазива раскидање цитоскелета у јетри, што даље води тешкој хепатичној хеморагији која може изазвати и смрт [25]. Поред инхибиције протеин фосфатазе 1 и 2A, микроцистини делују и на *ATP* синтазу и могу да доведу до апоптозе ћелија.

Поред акутне токсичности, проблем хроничне интоксикације је такође присутан. Различита истраживања на животињама након континуираног уноса микроцистина показала су да долази до хроничног оштећења јетре (дегенерација хепатоцита, хистопатолошке промене, хронична упала и повећање нивоа ензима јетре) и настанка карцинома [5, 26]. Токсичност сваког појединачног облика микроцистина варира у великој мери. Тако је LD50 за микроцистин-LR 50 $\mu\text{g/kg}$ телесне тежине, док је за микроцистин-RR 600 $\mu\text{g/kg}$ телесне тежине. Међународна агенција за истраживање рака класификовала је микроцистин-LR као карциноген групе 2Б [27]. Сматра се да микроцистини делују претежно као туморски промотери кроз инхибицију протеинских фосфатаза 1 и 2A, чиме утичу на регулацију равнотеже између фосфорилације ћелијских протеина и дефосфорилације, за коју се показало да је директно повезана са њиховом цитотоксичношћу и активношћу која доводи до појаве тумора. Друго, многе студије [24, 26] су показале да MC-LR утиче на повећану продукцију реактивних врста кисеоника, што доводи до поремећаја цитоскелета, дисфункције митохондрија, стреса ендоплазмичког ретикулума и дерегулације ћелијског циклуса. Треће, MC-LR може индуковати ДНК оштећења било директном интеракцијом са ДНК или индиректним механизмом, стварањем реактивних врста кисеоника и инхибицијом путева репарације ДНК који доприносе генетској нестабилности [3].

membrane by passive diffusion. Thus, the accumulation of microcystins in cells depends on the level of expression of the specific Na^+ -independent organic anion transporting polypeptides (OATPs) [12]. The OATP-mediated transport facilitates the unidirectional active intake of biochemical compounds and nutrients for later distribution, metabolism and excretion in different tissues [12]. This group of transporters is expressed in various types of cells, including kidney epithelial cells, enterocytes (red adsorptive cells), hepatocytes, as well as heart, lung and spleen cells. After oral, intraperitoneal or intravenous intoxication, the liver is the principal target organ of microcystin and nodularin accumulation. Once they enter hepatocytes, these toxins inhibit serine protein phosphatase 1 and 2A via covalent bonding with the enzyme, in the case of microcystin, and non-covalent binding in the case of nodularin [24]. Protein phosphorylation imbalance leads to cytoskeleton breaking in the liver, which causes a serious hepatic haemorrhage that can even be lethal [25]. In addition to inhibiting protein phosphatases 1 and 2A, microcystins also affect ATP synthetase and can lead to cell apoptosis.

In addition to acute toxicity, there is also a problem of chronic intoxication. Various studies on animals have shown that continuous microcystin intake causes chronic liver damage (hepatocyte degeneration, histopathological changes, chronic inflammation and increased liver enzyme levels) and cancer development [5, 26]. The toxicities of individual structural forms of microcystin vary greatly. Thus, LD50 for microcystin-LR is 50 $\mu\text{g/kg}$ of body weight, while for microcystin-RR it is 600 $\mu\text{g/kg}$ of body weight. The International Agency for Research on Cancer has classified microcystin-LR as a Group 2B carcinogen [27]. Microcystins are considered to act predominantly as tumor promoters through inhibition of protein phosphatases 1 and 2A, affecting the balance between cellular protein phosphorylation and dephosphorylation, which has been shown to be directly related to their cytotoxicity and tumorigenic activity. Furthermore, many studies [24, 26] have shown that MC-LR affects the increased reactive oxygen species production, leading to cytoskeletal disorders, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and cell cycle deregulation. Also, MC-LR can induce DNA damage by direct interaction with DNA or, indirectly, through the generation of reactive oxygen species and inhibition of DNA repair pathways that contribute to genetic instability [3].

In the case of cylindrospermopsin, the hydroxyl group on the methyl group between guanidine and uracil is responsible for its toxicity [12]. The mechanism of cylindrospermopsin toxicity still hasn't been fully explained, but it was pointed out that the primary metabolic effect is an irreversible protein synthesis suppression and a decreased glutathi-

Код цилиндроспермопсина хидроксилна група на метил групи између гванидина и урацила је одговорна за његову токсичност [12]. Механизам токсичности цилиндроспермопсина још увек није у потпуности разјашњен, али указано је да је главни метаболички ефекат у неповратној блокади синтезе протеина и смањеној синтези трипептида глутатиона. Механизам за који се сматра да је од примарне важности за токсичност цилиндроспермопсина је активирање цитохрома Р-450 (CYP450) [24]. Експерименти са лабораторијским животињама су показали да цилиндроспермопсин доводи до оштећења јетре, бубрега, плућа, срца, желуца, крвотока и лимфног система. Иако је цилиндроспермопсин генерално класификован као хепатотоксин, он има много шири спектар ефеката [12].

Путеви изложености и тровања људи узроковани цијанотоксинима у води

Главни путеви излагања људи хепатотоксинима и другим цијанобактеријским токсинима су преко пијаће воде, воде за рекреацију, воде за хемодијализу и преко хране (и суплементима у исхрани) [14]. Такође, инхалација аеросола који садржи токсине, током рекреативних активности у водама где је развијен цвет цијанобактерија, или приликом туширања контаминираном водом, показала се као још један начин контаминације. Дакле, људи могу бити изложени цијанотоксинима путем ингестије, инхалације и дермалног контакта. Такође, веома је важна и индиректна изложеност цијанотоксинима која настаје конзумацијом животињских или биљних производа који су били изложени цијанотоксинима. Истраживања су, такође, показала да се цијанотоксини могу биоакумулирати, тако да се њихови токсични ефекти могу повећати кроз ланце исхране [28]. Приликом излагања цијанотоксинима, код људи се могу јавити акутни, субакутни и хронични здравствени проблеми. Свеобухватни прегледни рад о акутним тровањима животиња и људи услед изложености цијанотоксинима урадио је Wood [29], који је идентификовао 115 људских случајева тровања цијанотоксинима пријављених до 2010. године, од којих је 27 преко воде за пиће, а 65 након рекреативних активности, углавном виђених у САД, Канади, Аустралији и Европи. У табели 1. приказани су одабрани примери тровања људи преко воде за пиће, које су врсте цијанобактерија биле одговорне и који су били симптоми тровања.

Најранији забележени случај тровања људи цијанотоксинима догодио се 1931. године у градовима (Чарлстон, Западна Вирџинија), дуж реке Охајо (САД), када је 5000–8000 људи оболело од гастроентеритиса након употребе воде из реке Охајо где је цветала цијанобак-

one tripeptide synthesis. The mechanism considered to be of primary importance for the cylindrospermopsin toxicity is the activation of cytochrome P-450 (CYP40) [24].

Experiments with laboratory animals have shown that cylindrospermopsin leads to liver, kidney, heart, stomach, circulation and lymphatic system damage. Despite cylindrospermopsin being generally classified as a hepatotoxin, it has a much broader range of impact [12].

Exposure routes and human poisoning caused by cyanotoxins in the water

The main routes of human exposure to hepatotoxins and other cyanobacterial toxins are through drinking water, recreational water, water for haemodialysis and food (including food supplements) [14]. Furthermore, the inhalation of aerosols that contain these toxins, during recreational activities in the water bodies where cyanobacteria bloom, or during showers with contaminated water, have proved to be another contamination pathway. This means that people can be exposed to cyanotoxins through ingestion, inhalation and skin contact. Additionally, indirect exposure to cyanotoxins is very important, mainly through the consumption of animal or plant products containing cyanotoxins. Studies have also shown that cyanotoxins can bioaccumulate, meaning that their toxic effects increase along food chains [28]. People can develop acute, subacute and chronic health problems due to cyanotoxin exposure. A comprehensive review of animal and human poisoning related to cyanotoxin exposure was elaborated by Wood [29], who summarized 115 cases of human cyanotoxin poisonings reported until the year 2010, 27 of which occurred through drinking water and 65 after recreation, mainly recorded in the US, Canada, Australia and Europe. Selected examples of human poisoning through drinking water are shown in Table 1, as well as the types of cyanobacteria responsible, and the symptoms of poisoning.

The earliest case of human cyanotoxin poisoning occurred in 1931 in cities alongside the Ohio River (Charleston, West Virginia, USA) when 5000-8000 people suffered from gastroenteritis after using the Ohio River water where the cyanobacteria *Microcystis* bloomed [29, 30]. Since the cause of the disease couldn't be attributed to other infectious agents, it was considered that the toxins produced by the cyanobacteria could be responsible for the outbreak [29]. A similar case also took place in the 1960s, when a *Microcystis* bloom in a water reservoir lead to an occurrence of gastroenteritis in children in Salisbury, now Harare in Zimbabwe [31].

Furthermore, one of the first reported incidents related to recreational activities in water with cyanobacteria blooms

терија *Microcystis* [29, 30]. Како се узрок болести није могао приписати другим инфективним узročницима, сматрано је да су токсини које производе цијанобактерије можда били одговорни за епидемију [29]. Такође, сличан случај се десио и шездесетих година прошлог века када је цветање *Microcystis*-а, у акумулацији за водоснабдевање, довело до појаве гастроентеритиса код деце у Салисбурију, (сада Хараре), у Зимбабвеу [31].

Један од првих пријављених инцидената који су повезани са рекреативним активностима у води где су цветале цијанобактерије догодио се у САД, што је документовао Heise 1949. године [29]. Пацијент је након пливања у истом језеру сваког лета пријављивао понављајуће епизоде астме, коњунктивитиса и иритације носа.

Документовани фатални случајеви акутних тровања људи токсинима цијанобактерија су ограничени на одређене начине излагања, као што је, на пример, хемодијализни третман водом загађеном цијанотоксинима. Овакав случај се десио у граду Каруару, у држави Пернамбуко, у Бразилу, где је фебруара 1996. године дошло до избијања болести на клиници за хемодијализу и представља један од најпознатијих случајева тровања цијанотоксинима. Наиме, на овој клиници 116 (89%) од 131 пацијента имало је проблеме са видом, мучнину, повраћање и слабост мишића, након рутинског третмана хемодијализом. Након тога, 100 пацијената развило је акутну инсуфицијенцију јетре, док је за 52 пацијента овај инцидент имао леталне ефекте који су се могли приписати синдрому који се сада назива „Каруару синдром“ [32]. Испитивањем фитопланктона и његове бројности, показало се да су цијанобактерије биле доминантне у резервоару за снабдевање водом овог града у Бразилу од 1990. године. Међутим, клиника је имала сопствени систем за пречишћавање воде и процес је укључивао филтрацију на активном угљу, песку и на јоноизмењивачким смолама, а затим микрофилтрацију пре употребе за хемодијализу. Још тада се посумњало да су интоксикације људи могле бити повезане са цијанобактеријским хепатотоксинима и, да би се потврдила та хипотеза, урађена је анализа цијанотоксина у систему за пречишћавање воде саме клинике, као и из серума и ткива јетре пацијената.

Анализа јоноизмењивачких смола, песка и активног угља из клиничког система за третман воде, као и серума и ткива јетре пацијената, указала је на присуство две групе хепатотоксичних цијанотоксина: микроцистина (у свим овим узорцима) и цилиндроспермопсина (у угљенику и смолама). Поређењем симптома и патологије жртава у Каруару са студијама на животињама

occurred in the United States, as documented by Heise in 1949 [29]. After swimming in the same lake every summer, a patient had reported repetitive asthma episodes, conjunctivitis and nose irritations.

Documented fatalities of acute human poisonings caused by cyanobacteria are limited to certain exposure pathways, i. e. haemodialysis treatment using cyanotoxin-contaminated water. Such a case occurred in the city of Caruaru, state of Pernambuco, Brazil, where in February 1996 an outbreak happened in the Haemodialysis clinic; this is one of the best known cases of cyanotoxin poisoning. In this clinic, 116 (89%) out of 131 patients had problems with their sight, nausea, vomiting, and muscle weakness after a routine haemodialysis treatment. Subsequently, 100 patients developed acute liver insufficiency, with 52 patients having suffered lethal effects that could be attributed to the syndrome that is now known by the name of Caruaru Syndrome [32]. Analysis of the phytoplankton and its population numbers showed the dominance of cyanobacteria in the water reservoir used to supply this Brazilian city since 1990. However, the Haemodialysis clinic had its own water purification system, with processes that included filtration through activated carbon, sand, and ion exchange resins, followed by microfiltration, before the water would be used for haemodialysis. Even then, it was suspected that human intoxication could be related to cyanobacterial hepatotoxins and, in order to confirm this hypothesis, cyanotoxins were measured in the clinic's water purification system itself, as well as in the serum and liver tissue of the affected patients.

In this regard, the analysis of activated carbon, sand, and cation/anion exchange resins from the clinic's water treatment system, as well as of liver tissue and serum of patients, demonstrated the presence of two types of hepatotoxic cyanotoxins: microcystin (in all samples) and cylindrospermopsins (in the carbon and resins). By comparing symptoms and victim pathology in Caruaru with experimental animal studies related to these two cyanotoxins, it was concluded that the intravenous exposure to microcystin, especially microcystin – YR, -LR, and -RR, was the main factor which led to the death of dialysis patients [32].

Acute poisonings were also recorded after the consumption of insufficiently treated surface waters, containing large numbers of cyanobacteria, which had been used as a water supply source following treatment with an algicide [33, 34]. Introducing algicides into cyanobacteria-containing surface water causes the breakage of cyanobacterial cells, leading to the release of intracellular toxic metabolites into water; if this water is used as drinking water following inadequate treatment, the metabolites reach the

на ова два цијанотоксина дошло се до закључка да је интравенозна изложеност микроцистинима, посебно микроцистинима -YR, -LR i -RR, главни фактор који је довео до смрти пацијената на дијализи [32].

Акутна тровања људи су, такође, била пријављена након конзумирања недовољно пречишћене површинске воде, где је забележена висока бројност цијанобактерија, која се користи као извориште за водоснабдевање, након алгицидног третмана [33, 34]. Убацивање алгицида у површинску воду оптерећену цијанобактеријама доводи до разарања ћелија цијанобактерија при чему се интрацелуларни токсични метаболити ослобађају у воду, а након неадекватног третмана воде за пиће доспевају до људске популације. Најпознатији случај оваквог тровања људи се одиграо у Палм Исланду у Аустралији новембра 1979. године и на почетку је епидемија имала назив мистериозне болести (*Palm Island Mystery Disease*). Наиме, 149 људи (углавном деце између 2 и 16 година) је хоспитализовано са симптомима хепатоентеритиса, повраћања, оштећења бубрега и дијареје [14, 26, 33, 34, 35]. Првобитно се мислило да је узрок ове епидемије конзумирање незрелих плодова манга, међутим касније је утврђена повезаност са квалитетом пијаће воде. Медицински стручњаци су приметили да је епидемија настала три дана после третирања површинске воде за водоснабдевање, где је доминирала врста *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii*, бакар-сулфатом. Бакар сулфат је изазвао лизирање ћелија *R. raciborskii*, што је довело до ослобађања токсина у воду. Овај догађај је довео до откривања токсина цилиндроспермопсина.

Епидемиолошка студија локалног становништва у Армидалеу у Аустралији након екстензивног токсичног цветања врсте *Microcystis aeruginosa* у изворишту за водоснабдевање (Брана Малпас) у 1981. години, показала је субклиничко оштећење јетре код људи, које се јавља истовремено са третманом бакар-сулфатом [35].

Према Wood-у [29] током тешке епидемије гастроентеритиса у региону Пауло Алфонсо (држава Баија у Бразилу) 1988. године која је погодила више од 2000 становника пријављено је 88 смртних случаја за 42 дана [35]. Нису идентификовани узрочници инфекције, нити су у водоводу пронађени тешки метали или загађивачи из пољопривреде. Међутим, примећено је да се време инцидента поклопило са цветањем цијанобактерија (родова *Microcystis* и *Anabaena*) у акумулацији која снабдева водом погођено становништво. Аутори су закључили да би токсини које производе цијанобактерије могли бити могуће објашњење епидемије.

The best-known case of this type of poisoning occurred in Palm Island, Australia in November 1979. A total of 149 people, mostly children between the ages of 2 and 16, were hospitalized with symptoms of hepato-enteritis, vomiting, kidney damage and diarrhoea [14, 26, 33, 34, 35]. It was originally thought that the cause of this outbreak was the consumption of insufficiently ripe mango fruit; however, the connection to the drinking water quality was established later. Medical experts noticed that the outbreak began three days after the treatment of surface water used for water supply, where the species *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii* was treated with copper-sulphate. The copper-sulphate caused the lysis of *R. raciborskii* cells, which led to toxin release into the water. This event led to the discovery of the toxin cylindrospermopsin.

An epidemiological study of the local population in Armidale, Australia, after an extensive toxic bloom of *Microcystis aeruginosa* in the water supply source (Malpas Dam) in 1981, showed subclinical liver damage in people that occurred at the same time as the copper-sulphate treatment [35].

According to Wood (2016), during a large gastroenteritis outbreak in Paulo Alfonso, State of Bahia, Brazil in 1988, which affected over 2000 inhabitants, a total of 88 deaths were reported in 42 days [35]. In this regard, no causes of infection were identified and the water from the supply system showed no presence of heavy metals or agricultural pollutants. However, it was observed that the time of the incident coincided with cyanobacterial bloom (*Microcystis* and *Anabaena*) in a reservoir which supplied the affected population with water. The authors concluded that the toxins produced by cyanobacteria could be the cause of this outbreak.

In 1994, a total of 121 people suffered from stomach pains, vomiting, nausea, diarrhoea, fever and headache due to the consumption of untreated water from the River Kävlinge in Sweden, containing a high number of the toxic cyanobacteria *Planktotrix agaradhii* and *Microcystis* spp. (microcystin producers) [30].

Конзумирањем непречишћене воде где се развија цвет токсичних цијанобактерија *Planktothrix agardhii* и *Microcystis* spp. (продуценти микроцистина) из реке Кавлингеан у Шведској (1994. године), 121 особа је имала болове у трбуху, мучнину, повраћање, пролив, грозницу и главобољу [30].

Табела 1. Одабрани примери тровања цијанобактеријама преко воде за пиће [35]

Година Year	Држава Country	Присутне цијанобактерије Cyanobacteria present	Здравствени проблеми Health problems
1931	САД, Охајо USA, Ohio	<i>Microcystis</i>	Гастроентеритис, повраћање Gastroenteritis, vomiting
1960–65.	Зимбабве, Хараре Zimbabwe, Harare	<i>Microcystis</i>	Гастроентеритис Gastroenteritis
1975.	САД, Пенсилванија USA, Pennsylvania	<i>Schizothrix calcola</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Lyngbya</i>	Гастроентеритис Gastroenteritis
1979	Аустралија, Палм Исланд Australia, Palm Island	<i>Raphidiopsis (Cylindrospermopsis)</i> <i>raciborskii</i>	Хепатоентеритис, повраћање, оштећење бубрега, дијареја Hepato-enteritis, vomiting, kidney damage, diarrhoea
1981.	Аустралија, Армидале Australia, Armidale	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Хепатоентеритис, оштећење јетре Hepato-enteritis, liver damage
1988.	Бразил, Баија, Пауло Алфонсо Brazil, Bahia, Paulo Alfonso	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>	Гастроентеритис (2000 случајева) и 88 смртних случаја, углавном деце Gastroenteritis (2000 cases) and 88 deaths, mostly in children
1994.	Шведска, Малме Sweden, Malmö	<i>Planktothrix agardhii</i>	Мучнина, повраћање, дијареја, грчење мишића Nausea, vomiting, diarrhoea, muscle spasms

Током рекреативних водених спортова људи могу бити изложени контаминираној води дермалним контактом, удисањем, али и гутањем. Употреба загађених површинских слатководних тела у рекреативне сврхе представља значајан извор изложености цијанобактеријским токсинима, јер људи могу бити изложени високим концентрацијама токсина [10]. У најекстремнијим случајевима, рекреативно излагање цијанобактеријама довело је до опасности по живот и стања која захтевају хоспитализацију, на пример, због упале плућа праћене диспнејом и оштећењем јетре [36], или акутног оштећења јетре које захтева трансплантацију јетре [37].

Инхалациони пут излагања цијанотоксинима у теорији може бити опасан, и поједини експериментални подаци подржавају ову могућност [36]. Једна од студија документовала је инхалациони пут излагања (током рекреативних активности у/на води контаминираној цијанобактеријама) са таложењем аеросолизованих микроцистина у носној шупљини [10], а друга је указала на повећану учесталост гастроинтестиналних боле-

Table 1. Chosen examples of cyanobacterial poisoning though drinking water [35]

During recreational water sports, people may be exposed to contaminated water through skin contact, inhalation, as well as swallowing. The use of contaminated water bodies for recreational purposes represents a significant source of exposure to cyanobacterial toxins, bearing in mind that people can be exposed to large amounts of the toxins [10]. In the most extreme cases, recreational exposure to cyanobacteria has led to life threatening conditions, as well as conditions that required hospitalization, e. g. pneumonia followed by dyspnoea and liver damage [36], or acute liver damage requiring a liver transplant [37].

Cyanotoxin exposure through inhalation can be dangerous in theory and certain experimental data support this possibility [36]. One study has documented the inhalation exposure (during recreational activities in/on cyanobacteria-contaminated water), via deposits of aerosolized microcystins in the nasal cavity [10]; another study revealed a higher frequency of gastrointestinal illnesses in human populations that live in close vicinity to cyanobacteria-contaminated lakes, despite the fact that their recreational

сти у људској популацији која живи у близини језера контаминираних цијанобактеријама, чак и ако је њихов рекреативни контакт са загађеном водом био врло ограничен [38]. За изложеност аеросолизованим цијанобактеријским токсинима неопходне су боље процене штетних здравствених исхода. Такође, важно је истражити потенцијално осетљиве популације које би могле снажније да реагују на ову изложеност, попут особа са основном респираторном болешћу.

Широм света су додаци исхрани на бази алги означени као природни производи чија су својства корисна за побољшање општег здравља људи (нпр. учествују у повећању енергије, бољем расположењу, имају антиоксидативна својства, као и антиканцерогено дејство). Иако се пласирају на тржишту са различитим спектром здравствених добробити, још увек нема довољно научних доказа који би препоручили суплементацију микроалгама за било које људско стање [39]. Ови производи генерално садрже нетоксичне цијанобактерије, али методе узгоја у природним водама без одговарајућих контрола квалитета могу довести до контаминације врстама које су продуценти токсина. У студији Roy-Lachapelle и сарадника [40] истраживало се присуство укупних микроцистина, седам појединачних микроцистина (RR, YR, LR, LA, LY, LW, LF), анатоксина-а, дихидроанатоксина-а, епоксианатоксина-а, цилиндроспермопсина, сакситоксина и метиламино-Л-аланина у 18 различитих комерцијално доступних производа који садрже цијанобактерије *Spirulina* или *Aphanizomenon flos-aquae*. Од 18 анализираних производа, 8 је садржало неке цијанотоксине на нивоима који су прелазили толерантне вредности дневног уноса. Присуство цијанотоксина у овим додацима исхрани на бази цијанобактерија указује на појачану потребу за бољом контролом квалитета, као и на подизање свести потрошача о потенцијалним ризицима повезаним са конзумацијом ових суплемената.

Епидемиолошке студије

Симптоми тровања водом за пиће су слични симптомима гастроинтестиналних сметњи узрокованих бројним патогеним бактеријама, чиме се отежава диференцијација тровања цијанотоксинима. Иако су на располагању бројне епидемиолошке студије о могућој повезаности изложености микроцистинима са учесталошћу појаве хепатоцелуларног карцинома, све су оне користиле углавном ретроспективне процене изложености микроцистинима. Дакле, документоване епидемиолошке студије анализирале су повезаност између цијанобактерија и хепатоцелуларног карцинома (HCC), углавном према проценама дистрибуције воде за пиће

contact with contaminated water was very limited [38]. Regarding the exposure to cyanobacterial toxins in aerosols, better assessments of adverse health outcomes are necessary. It is also important to investigate potentially vulnerable populations that could have a stronger reaction to exposure, such as individuals with a primary respiratory disease.

Throughout the world, algae based dietary supplements are labelled as natural products useful for the improvement of the general health (e.g. they contribute to higher energy levels, improved mood and they have antioxidant and anti-cancerogenic effects). Even though they are marketed with different ranges of health benefits, there is still insufficient scientific evidence that would recommend supplementation based on micro algae for any condition in humans [39]. These products generally contain non-toxic cyanobacteria, but cultivation methods in natural waters without adequate quality control can lead to contamination with toxin-producing species.

The study by Roy-Lachapelle et al. [40] investigated the presence of total microcystins, seven individual microcystins (RR, YR, LR, LA, LY, LW, LF), anatoxin, dihydroanatoxin, epoxyanatoxin, cylindrospermopsin, saxitoxin and methylamino-L-alanine in 18 different commercially available products containing *Spirulina* or *Aphanizomenon flos-aquae* cyanobacteria. Out of 18 analysed products, 8 contained some cyanotoxins in levels above allowed daily intake values. Cyanotoxin presence in cyanobacteria-based food supplements shows a growing need for better quality control, as well as raising consumer awareness on potential risks related to the consumption of these supplements.

Epidemiological studies

The symptoms of poisoning by drinking water are similar to the symptoms of gastrointestinal problems caused by numerous pathogenic bacteria, which makes differential diagnosis difficult. Despite the availability of numerous epidemiological studies of potential association between microcystin exposure and hepatocellular carcinoma incidence increase, they all utilized mostly retrospective estimates of microcystin exposure. In this regard, the documented epidemiological studies were analysing the correlation between cyanobacteria and hepatocellular carcinoma (HCC), usually according to the estimates of drinking water distribution and the presence of cyanobacteria in water supply reservoirs [4, 41, 42, 43, 44] or via cyanobacterial bloom spatial distribution maps and standardized mortality rates of non-alcoholic liver disease [45].

A study that directly examined the correlation between serum MC-LR content and the risk of HCC in a case-controlled population was performed by Zheng et al. [3]. The

и присутних цијанобактерија у резервоарима за водоснабдевање [4, 41, 42, 43, 44], или путем мапе просторне дистрибуције цветања цијанобактерија и стандардизованих стопа морталитета од безалкохолне болести јетре [45]. Студија која је директно испитала однос између серумског садржаја MC-LR и његовог ризика на појаву *HCC* у серуму у контролисаној популацији (*case-control population*) урађена је од стране Zheng-а и сарадника [3]. Резултати ове студије су показали да је MC-LR у серуму био независни фактор ризика за *HCC* у југозападној Кини, и да је показао позитивну интеракцију са вирусом хепатитиса Б и алкохолом, али негативну интеракцију са афлатоксином. И ова студија је имала неколико недостатака: прво начин живота и историја болести пацијената добијени су самопрегледом, што повећава могућност пристрасности информација и, друго, нису се одређивале и друге варијанте микроцистина у серуму, што може потценити ризик за *HCC*.

Истраживања цијанобактерија и цијанотоксина у Србији

Научна испитивања цијанобактерија у акумулацијама за водоснабдевање се у Србији спроводе већ дуги низ година [46–56]. Међутим, након што се 2013/2014. године десио случај цветања врсте *Planktothrix rubescens* у акумулацији Врутци, коришћеној за водоснабдевање града Ужица, а који је за последицу имао контаминацију воде за пиће на подручју читаве општине [званична саопштења ИЈЗС „Др Милан Јовановић Батут“, 57, 58, 59, 60, 61], подигнута је свест о значају ових организама и многа водна тела се знатно систематичније прате [18, 61, 62, 63, 64, 65]. Токсиколошка истраживања су заступљена у много мањој мери, али се у последње време и на овом пољу примећује пораст у броју објављених радова, када је реч о потенцијално токсичним цијанобактеријама и производњи њихових токсина [66, 67, 68, 69], њиховом утицају на живи свет [67, 70], као и могућим последицама по здравље људи у Србији [71, 72]. У ИЈЗС „Др Милан Јовановић Батут“ је успостављено редовно праћење микроцистина LR, RR и YR, али готово искључиво за водна тела која се користе као изворишта за водоснабдевање, док за рекреационе воде (и остале воде за људску употребу) још увек не постоји успостављен системски мониторинг ни цијанобактерија, нити хепатотоксина које би оне потенцијано могле продукovati. Ипак, за поједина таква водна тела постоје научне студије које се баве поменутом проблематиком [73, 74, 75], а међу њима има и оних које се баве истраживањима других група хепатотоксичних цијанотоксина – цилиндроспермопсина [65, 66]. Резултати ових студија указују на то да постоји потреба да се

results of this study showed that MC-LR in the serum was an independent risk factor for *HCC* in southwestern China, and that it showed a positive correlation with HBV and alcohol, as well as a negative correlation with aflatoxin. Nevertheless, this study has certain limitations. Firstly, the lifestyle and patient history were obtained through self-reporting, which increases the possibility of bias in the information and, secondly, other microcystin variants in the serum were not analysed, which may have possibly underestimated the risk of *HCC*.

Research of cyanobacteria and cyanotoxins in Serbia

Scientific studies of cyanobacteria in water supply reservoirs were conducted in Serbia over a long period of time [46–56]. However, after the bloom of *Planktothrix rubescens* in the Vrutci Reservoir in 2013/2014, which resulted in contamination of drinking water in the entire municipality [Official statement by the Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic Batut” 57, 58, 59, 60, 61], the awareness of the importance of these organisms was raised and numerous water bodies are now being more systematically monitored [18, 61, 62, 63, 64, 65].

There has been far less toxicological research on the matter. However, an increase in the number of published papers has recently been observed in this field, when it comes to potentially toxic cyanobacteria and the production of their toxins [66, 67, 68, 69], their impact on the living world [67, 70], as well as possible consequences for human health in Serbia [71, 72]. A regular monitoring of microcystins LR, RR and YR has been established at the Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanovic Batut”, but almost exclusively for the water bodies used as water supply sources, while there is still no systemic monitoring established for recreational waters (and other types of water bodies intended for human consumption) regarding cyanobacteria and the hepatotoxins that they could potentially produce. However, there are scientific studies exploring the aforementioned issues for some of these water bodies [73, 74, 75], among which there are some that investigated other groups of hepatotoxic cyanotoxins – cylindrospermopsins [65, 66]. The results of these studies show a need to expand the scope of regular monitoring to a wider range of water bodies for human use (recreation, irrigation, fishponds) and to monitor a larger number of cyanotoxins (primarily cylindrospermopsin), all in order to better monitor the factors that could potentially threaten public health and increase liver cancer incidence.

Conclusion

Drinking water sources where toxic cyanobacteria bloom can be an important risk factor for hepatocellular carcinoma.

опсег редовног мониторинга прошири на већи спектар водних тела за људску употребу (рекреација, иригација, рибњаци) и да се прати већи број цијанотоксина (пре свега цилиндроспермопсина), а у циљу бољег праћења фактора који би потенцијано могли угрозити здравље становништва и повећати инциденцу канцера јетре.

Закључак

Изворишта воде за пиће у којима цветају токсичне цијанобактерије могу бити важан фактор ризика за стопу инциденције хепатоцелуларног карцинома за подручје на коме се врши водоснабдевање контаминираном водом. Такође, неопходан је континуиран мониторинг површинских вода намењених за људску употребу (водоснабдевање, рекреација, наводњавање, рибњаци) на присуство цијанобактерија и цијанотоксина са циљем да се установи степен изложености људи цијанотоксинима (хепатотоксинима). Даље, важно је да се правилно дијагностикују тровања, чак и блага, и да се утврде критеријуми за управљање ризицима.

ma in any area where water supply systems rely on contaminated water. There is also a need for permanent monitoring of surface waters intended for human use (water supply, recreation, irrigation, fishponds) for the presence of cyanobacteria and their cyanotoxins, with the aim of establishing the level of cyanotoxin exposure (hepatotoxins). Furthermore, it is important to adequately diagnose poisoning, even the mild cases, and to establish criteria for risk management.

Литература / References

1. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology*. 2006; 44(3), 521–526.
2. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci*. 2008; 115 (5–6):141–50. DOI: 10.1042/CS20070402
3. Zheng C, Zeng H, Lin H, et al. Serum microcystin levels positively linked with risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in southwest China. *Hepatology*. 2017; 66:1519–1528. <https://doi.org/10.1002/hep.29310>, 18–20.
4. Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, et al. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch Toxicol*. 2017a; 91:621–650. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1921-6>
5. Chorus I, Bartran J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon: London. 1999.
6. O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful algae*. 2012; 14: 313–334. doi:10.1016/j.hal.2011.10.027
7. Kubickova B, Babica P, Hilscherová K, Šindlerová L. Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environmental Sciences Europe*. 2019; 31(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>
8. Watson SB, Whitton BA, Higgins SN, Paerl HW, Brooks BW, Wehr JD. Harmful Algal Blooms. In: Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, J.P. (Eds). *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (Second Edition), 2015; 873–920.
9. Metcalf JS, Codd GA. Cyanobacterial toxins in the water environment. A Review Current Knowledge FR/R0009. Allen House: Foundation for Water Research. 2014; 47 pp.
10. Backer L, McNeel SW, Barber T, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, et al. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon*. 2010; 55, 909–921. DOI:10.1016/j.toxicon.2009.07.006

11. World Health Organization – WHO. Guidelines for drinking-water quality: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, recommendations, 3rd ed. World Health Organization, 2008;668 pp.
12. Labine AM, Minuk YG. Cyanobacterial toxins and liver disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2009; 87: 773–788. DOI: 10.1139/Y09-081
13. Humpage AR, Falconer IR, Bernard C, et al. Toxicity of the cyanobacterium *Limnithrix* AC0243 to male Balb/c mice. *Water Res.* 2012; 46:1576–1583. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.019>
14. He X, Liu YL, Conklin A, Westrick J, Weavers LK, Dionysiou DD, Lenhart JJ, Mouser PJ, Szlage D, Walker HW. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. *Harmful Algae.* 2016; 54: 174–193. DOI: 10.1016/j.hal.2016.01.001
15. Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management.* I. Chorus and J. Bertram (Edn) The World Health Organization. ISBN 0–419–23930–8. E and FN Spon, London, UK, 1999; pp 41–111.
16. Spoof L, Catherine A. Appendix 3: tables of microcystins and nodularins. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2017; pp 526–537.
17. Harada KI, Matsuura K, Suzuki M, Watanabe MF, Oishi S, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins-LR and -RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon.* 1990; 28: 55–64.
18. Jovanović J. Rasprostranjenje cijanobakterija u površinskim vodama namenjenim za vodosnabdevanje i rekreaciju u Srbiji [The distribution of cyanobacteria in surface waters in relation to water supply and recreation in Serbia]. Dissertation, University of Belgrade. 2020.
19. Dittmann E, Wiegand C. Cyanobacterial toxins—occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular nutrition & food research.* 2006; 50(1): 7–17. DOI: 10.1002/mnfr.200500162
20. Pearson LA, Dittmann E, Mazmouz R, Ongley SE, D'Agostino PM, Neilan BA. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* 2016; 54: 98–111. DOI: 10.1016/j.hal.2015.11.002
21. Pichardo S, Cameán AM, Jos A. In vitro toxicological assessment of cylindrospermopsin: a review. *Toxins (Basel).* 2017; 9:402. <https://doi.org/10.3390/toxins9120402>
22. Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon.* 2006; 47:156–162. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.10.013
23. Daniels O, Fabbro L, Makiela S. The effects of the toxic cyanobacterium *Limnithrix* (strain AC0243) on *Bufo marinus* larvae. *Toxins* 2014; 6(3): 1021–1035. <https://doi.org/10.3390/toxins6031021>
24. Zaccaroni A, Scaravelli D. Toxicity of Fresh Water Algal Toxins to humans and Animals in *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection* (ed. By V. Evangelista, L. Barsanti, A-M. Frassanito, V. Passarelli, P. Gualtier) CNR Institute of Biophysics, Pisa, Italy. Springer. 2007; 45–91.
25. De Figueiredo RD, Azeiteiro MU, Esteves MS, Fernando JM, Gonçalves JMF, Pereira JM. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2004; 59:151–163. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.04.006
26. Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international* 2013; 59:303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>
27. International Agency for Research on Cancer (IARC). Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol.* 2006; 7:628–629. doi:10.1016/S1470-2045(06)70789-6
28. Ettoumi A, El Khalloufi F, El Ghazali I, Oudra B, Amrani A, Nasri H, Bouaïcha N. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Kattel, G. (Ed.), *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology.* Nova Science Publishers Inc., New York. 2011; pp. 1–33.
29. Wood R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure—A review of the literature. *Environment international.* 2016; 91: 276–282. DOI: 10.1016/j.envint.2016.02.026

30. Annadotter H, Cronberg G, Lawton L, Hansson H-B, Göthe U, Skulberg O. An extensive outbreak of gastroenteritis associated with the toxic cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) in Scania, South Sweden. In *Cyanotoxins*; Springer: Berlin, Germany. 2001; pp. 200–208.
31. Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental health perspectives*. 2000; 108 (suppl 1): 113–122. doi: 10.1289/ehp.00108s1113
32. Azevedo SMF, Carmichael WW, Jochimsen EM, et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*. 2002; 181:441–446. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2).
33. Bourke ATC, Hawes RB, Neilson A, Stallman ND. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon*. 1983; 21:45–48. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90151-4)
34. Falconer IR, Beresford AM, Runnegar MT. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med J Aust*. 1983; 1:511–514.
35. Chorus I, Welker M. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, Taylor & Francis. 2021; pp. 858.
36. Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R, Andrinolo D. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs*. 2011; 9:2164–2175. doi:10.3390/md9112164
37. Vidal F, Sedan D, D'Agostino D, et al. Recreational exposure during algal bloom in Carrasco Beach, Uruguay: a liver failure case report. *Toxins (Basel)*. 2017; 9:E267. <https://doi.org/10.3390/toxin9090267>
38. Lévesque B, Gervais M-C, Chevalier P, Gauvin D, Anassour-Laouan-Sidi E, Gingras S, Fortin N, Brisson G, Greer C, Bird D. Prospective study of acute health effects in relation to exposure to cyanobacteria. *Science of the total environment*. 2014; 466, 397–403. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.045.
39. Persson PB, Zakrisson A. Dietary supplements: health from the ocean? *Acta Physiologica* 2015; 215(3): 119–122. DOI: 10.1111/apha.12594
40. Roy-Lachapelle A, Solliet M, Bouchard MF, Sauvé S. Detection of cyanotoxins in algae dietary supplements. *Toxins*. 2017; 9(3):76–93. DOI: 10.3390/toxins9030076
41. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*. 1996; 17:1317–1321. DOI: 10.1093/carcin/17.6.1317
42. Fleming LE, Rivero C, Burns J, Williams C, Bean JA, Shea KA, Stinn J. Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae*. 2002; 1(2): 157–168. doi: 10.1016/S1568-9883(02)00026-4.
43. Svircev Z, Drobac D, Tokodi N, Vidovic M, Simeunovic J, Miladinov-Mikov M, et al. Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2013; 31:181–20. DOI: 10.1080/10590501.2013.824187
44. Gorham T, Root ED, Jia Y, Shum CK, Lee J. Relationship between cyanobacterial bloom impacted drinking water sources and hepatocellular carcinoma incidence rates. *Harmful algae*. 2020; 95: 101801. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101801>
45. Zhang F, Lee J, Liang S, Shum CK. Cyanobacteria blooms and non-alcoholic liver disease: evidence from a county level ecological study in the United States. *Environ Health*. 2015; 14:41. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0026-7>
46. Branković D, Čomić Lj, Simić S.. Fitoplankton akumulacionog jezera Čelije. *Zbornik o aktuelnim problemima zaštite voda „Zaštita voda '92”*. Subotica, 1992; 91–95.
47. Cvijan M, Laušević R. Floristički sastav algi Vlasinskog jezera u periodu 1949- 1993.godine. U: Blaženčić, J. (ed): *Vlasinsko jezero - hidrobiološka studija*. Biološki fakultet, Beograd. 1997; 61–90.

48. Karadžić V, Vasiljević M. Fitoplankton i fizičko-hemijske karakteristike akumulacije „Gračanka” i „Batlava” kod Prištine. Glasnik Instituta za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”. 1998; 72(1-6): 30–36.
49. Čađo S, Đurković A, Maljević E, Miletić A. Analiza fitoplanktona i trofički status akumulacije Sjenica. U: Eko-konferencija „Zaštita životne sredine gradova i prigradskih naselja”. Novi Sad. 2003; 117–122.
50. Čađo S, Đurković A, Miletić A. Fitoplankton i trofički status akumulacije Potpeć. U: Zaštita životne sredine i prigradskih naselja (monografija). VI Međunarodna eko-konferencija 2005. Novi Sad. 2005; 177–182.
51. Grašić S, Vasiljević B, Marković B, Nikolić G, Tadić S, Jovanović B. Cijanobakterijsko cvetanje jezera Čelije. U: Zbornik 33. godišnje konferencije o aktuelnim problemima zaštite voda „Voda 2004”. Borsko jezero, 8–11. jun 2004; 207–212.
52. Karadžić V, Natić D, Knežević T, Perišić M. Problematika kvaliteta voda akumulacija i vodosnabdevanja Aranđelovca. U: Zbornik 35. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda „Voda 2006”, Zlatibor, 6–9. jun 2006; 373–378.
53. Karadžić V, Subakov Simić G, Natić D. Phytoplankton analysis of the reservoirs Garaši and Bukulja near Aranđelovac City. U: II International Symposium of Ecologists of Montenegro – Proceedings of the Symposium, Kotor. 2006b; 117–123.
54. Karadžić V, Natić D, Subakov Simić G, Krizmanić J. Kvalitet vode akumulacije Kruščica. U: Zbornik 37. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda „Voda 2008”. Mataruška Banja. 2008; 141–146.
55. Karadžić V, Subakov Simić G, Krizmanić J, Natić D. Phytoplankton and eutrophication development in the water supply reservoirs Garaši and Bukulja (Serbia). Desalination. 2010; 255(1-3): 91–96.
56. Karadžić V, Subakov Simić G, Natić D, Ržanićanin A, Ćirić M, Gačić Z. Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). Hydrobiologia. 2013; 711(1): 43–60.
57. Kostić D, Blagojević A, Subakov Simić G, Ivetić M, Naunović Z. Jesenje cvetanje potencijalno toksične cijanobakterije *Planktoniella rubescens* u višenamenskoj akumulaciji Vrutci. Voda i sanitarna tehnika. 2014; 44(1): 5–12.
58. Kostić D, Blagojević A, Subakov Simić G, Predojević D, Naunović Z, Jacimović N, Grašić S. “Blooming” Reservoir Response to a High Inflow Event - Case Study: the Vrutci Reservoir (Western Serbia). U: 7th Eastern European Young Water Professionals Conference, Belgrade. 2015; 97–104.
59. Kostić D, Marjanović P, Marjanović M, Blagojević A, Trbojević I, Predojević D, Subakov Simić G, Vulić D, Obradović V, Naunović Z. Drivers of phytoplankton blooms in the Vrutci Reservoir during 2014–2015 and implications for water supply and management. Water Research and Management. 2016; 6(3): 3–12.
60. Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Đenić D, Simeunović J, Hiskia A, Kaloudis T, et al. Lessons from the Užice Case: How to Complement Analytical Data. U: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G. A. (Eds). Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & sons, Ltd. 2017b; 298–308.
61. Blagojević Ponjavić A, Kostić D, Marjanović P, Trbojević I, Popović S, Predojević D, Subakov Simić G. Bloom of the potentially toxic cyanobacterium *P. rubescens*: seasonal distribution and possible drivers of its proliferation in the Vrutci reservoir (Serbia). Oceanological and Hydrobiological Studies. 2019; 48(4): 316–327.
62. Simić SB, Đorđević NB, Milošević D. The relationship between the dominance of cyanobacteria species and environmental variables in different seasons and after extreme precipitation Fundamental and Applied Limnology/ Archiv für Hydrobiologie. 2017; 190(1): 1–11.
63. Čađo S, Đurković A, Novaković B, Denić L, Dopuđa Glišić T, Veljković N, Stojanović Z. Sezonska dinamika fitoplanktona akumulacionog jezera Čelije. U: Zborniku 46. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštiti voda „Voda 2017”. Vršac. 2017; 49–56.
64. Jovanović J, Trbojević I, Simić GS, Popović S, Predojević D, Blagojević A, Karadžić V. The effect of meteorological and chemical parameters on summer phytoplankton assemblages in an urban recreational lake. Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems. 2017; 418: 48. DOI: 10.1051/kmae/2017038

65. Blagojević Ponjavić A. Dinamika fitoplanktona i fenomen cvetanja cijanobakterije *Planktothrix rubescens* u akumulaciji Vrutci. [Phytoplankton dynamics and the phenomenon of bloom of cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in the Vrutci reservoir]. Dissertation, University of Belgrade. 2021.
66. Đorđević NB, Simić SB, Ćirić AR. First Identification of the Cylindrospermopsin (Cyn)-Producing Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju in Serbia. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2015; 24(11 A): 3736–3742.
67. Đorđević NB, Matić SL, Simić SB, Stanić SM, Mihailović VB, Stanković NM, Stanković VD, Ćirić AR. Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats in vivo. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017; 24(16): 14259–14272.
68. Tokodi N. Toksične cijanobakterije sa teritorije Republike Srbije. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Doktorska disertacija. 2016; 253 pp.
69. Svirčev Z, Tokodi N, Drobac D. Review of 130 years of research on cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia presented in a Serbian Cyanobacterial Database. *Advances in Oceanography and Limnology*. 2017c; 8(1): 153–160. DOI: 10.4081/aiol.2017.6360
70. Drobac D, Tokodi N, Lujić J, Marinović Z, Subakov-Simić G, Dulić T, Važić T, Nybom S, Meriluoto J, Codd GA, Svirčev Z. Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae*. 2016; 55: 66–76.
71. Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Lužanin Z, Munjas AM, Nikolin B, Vuleta D, Meriluoto J. Epidemiology of cancers in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2014a; 32(4): 319–337. DOI: 10.1080/10590501.2014.967053
72. Svirčev ZB, Tokodi N, Drobac D, Codd GA. Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. *Systematics and biodiversity*. 2014; 12(3), 261–270. <https://doi.org/10.1080/14772000.2014.921254>
73. Simeunović J, Svirčev Z, Krstić S, Lazić L. Occurrence of cyanobacterial blooms in Vojvodina water ecosystems. *Geographica Pannonica*. 2005; 9: 13–19.
74. Svirčev Z, Simeunović J, Subakov-Simić G, Krstić S, Pantelić D, Dulić T. Cyanobacterial blooms and their toxicity in Vojvodina lakes, Serbia. *International Journal of Environmental Research*. 2013; 7(3): 745–758. DOI:10.22059/IJER.2013.654
75. Đorđević NB, Simić SB. Cyanobacterial Blooms in Oligosaline and Alkaline Microaccumulation Before and After Rehabilitation. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2014; 23(6): 1975–1982.



Кореспонденција / Correspondence

Весна Караџић - Vesna Karadžić
vesna_karadzic@batut.org.rs