

**VPLIV OKOLJA NA STRUPENOST CIANOBAKTERIJ  
RAZISKOVALNA NALOGA, EKOLOGIJA**



Cianobakterija rodu *Dolichospermum*

(Vir: arhiv NIB)

Aleksandra Krajnc, 3. letnik

Gimnazija Vič

Mentorka: Sonja Artač, prof. biol. – Gimnazija Vič

Somentorici: doc. dr. Tina Eleršek – Nacionalni inštitut za biologijo;

Maša Zupančič – Nacionalni inštitut za biologijo

Ljubljana, 2023

## Kazalo vsebine:

1.	UVOD.....	5
1.1	Opredelitev problema .....	5
1.2	Namen naloge .....	5
1.3	Hipoteze.....	5
2.	TEORETIČNE OSNOVE .....	5
2.1	Cianobakterije.....	5
2.2	Prekomerna razrast cianobakterij .....	6
2.3	Cianotoksini.....	6
2.3.1	<i>Mikrocistini</i> .....	7
2.3.1.1	Način delovanja mikrocistinov .....	7
2.4	Vpliv okoljskih dejavnikov na količino mikrocistinov .....	7
2.5	Podnebne spremembe in cianobakterije .....	8
3.	MATERIAL IN METODE DELA .....	8
3.1	Material.....	8
3.2	Metode dela .....	9
3.2.1	Vzorčenje fitoplanktona in fitobentosa na terenu.....	9
3.2.2	Izolacija DNA.....	12
3.2.3	Podatki in izračuni.....	13
4.	REZULTATI .....	15
5.	RAZPRAVA.....	19
6.	ZAKLJUČEK .....	20
7.	VIRI.....	21

## Kazalo slik:

Slika 1: Cianobakterija rodu <i>Dolichospermum</i> , ki lahko proizvaja cianotoksine .....	6
Slika 2: Struktura mikrocistina-LR .....	7
Slika 3: Sonde za merjenje prevodnosti, kisika, temperature in pH.....	9
Slika 4: Merjenje Secchijeve globine z diskom .....	9
Slika 5: Pripomočki za filtriranje vode na terenu .....	10
Slika 6: Filter, ki je ostal po filtriranju vzorca na terenu .....	10
Slika 7: Filtri vzorcev za analizo v laboratoriju .....	11
Slika 8: Vzorec vode in biofilma.....	11
Slika 9: Vzorec fitobentosa pod mikroskopom .....	11
Slika 10: Mesto vzorčenja, Koseški bajer .....	13
Slika 11: Vpliv temperature na koncentracijo mikrocistinov na celico, posamezna vodna telesa .....	15
Slika 12: Vpliv pH na koncentracijo mikrocistinov na celico .....	16
Slika 13: Vpliv pH na koncentracijo mikrocistinov na celico, posamezna vodna telesa ....	16
Slika 14: Vpliv Secchi globine na koncentracijo mikrocistinov na celico .....	17
Slika 15: Vpliv Secchi globine na koncentracijo mikrocistinov na celico, posamezna vodna telesa .....	17
Slika 16: Vpliv koncentracije kisika v vodi na koncentracijo mikrocistinov na celico .....	18
Slika 17: Vpliv prevodnosti na koncentracijo mikrocistinov na celico .....	18

## Kazalo tabel:

Tabela 1: Izhodiščni podatki, ki smo jih uporabili za izračune .....	14
Tabela 2: Prisotnost potencialno strupenih vrst cianobakterij v Blejskem jezeru v letu 2019 .....	14
Tabela 3: Prisotnost potencialno strupenih vrst cianobakterij v Perniškem jezeru v letu 2019 .....	14
Tabela 4: Korelacijski koeficienti .....	15

## Povzetek

Cianobakterije so preprosti, prokariontski, zelo prilagodljivi organizmi. Nekatere vrste cianobakterij izločajo cianotoksin. Če se prekomerno namnožijo, lahko povečana koncentracija cianotoksinov ogroža ostale organizme v ekosistemu. Cianotoksini lahko ogrožajo zdravje ljudi, zato je raziskovanje dejavnikov, ki vplivajo na povečano sintezo cianotoksinov, zelo aktualno.

Naša raziskava je usmerjena v preučevanje vpliva različnih okoljskih dejavnikov na prisotnost cianobakterij, ki izločajo cianotoksin iz skupine mikrocistinov. Vzorci so bili odvzeti iz različnih vodnih teles po Sloveniji. Vzorci fitoplanktona so bili filtrirani iz vode, odvzete direktno iz vodnega telesa, vzorci fitobentosa pa so bili odvzeti kot biofilm z lesnih ostankov ali kamnov neposredno iz vodnega telesa oziroma iz njegove neposredne bližine. Z izolacijo DNA in z uporabo metode PCR smo določili vrstno sestavo cianobakterij v preučevanih vodnih telesih, kar nam je omogočilo identifikacijo potencialno strupenih vrst cianobakterij in določanje njihove količine na določenem območju.

Ugotovili smo, da na sintezo mikrocistinov zaznavno vpliva temperatura, za zanesljivo potrditev tega rezultata pa bi potrebovali večje število vzorcev. Pri enaki prevodnosti so v različnih vodnih telesih koncentracije mikrocistinov zelo različne, kar nakazuje, da ima ta dejavnik na cianobakterije zelo majhen vpliv. Koncentracija kisika v vodi je dejavnik, na katerega vplivajo tudi cianobakterije s svojo metabolno aktivnostjo. Pri Secchi globini smo najprej zaznali negativen trend. Iz rezultatov po vodnih telesih pa je razvidno, da Secchi globina na cianobakterije v preučevanih vodnih telesih vpliva različno.

Na področju preučevanja cianotoksinov so za konkretnе zaključke potrebne nadaljnje raziskave po posameznih vodnih telesih, tako glede vrstne sestave cianobakterij kot tudi glede preučevanja vpliva različnih okoljskih dejavnikov.

**Ključne besede:** cianobakterije, cianotoksin, mikrocistini, okoljski dejavniki

## 1. UVOD

### 1.1 Opredelitev problema

Cianobakterije so izredno preprosti, prokariontski organizmi, ki imajo izredno sposobnost prilagajanja na okolje. V Sloveniji imamo veliko različnih vodnih teles, kot so mokrišča, zadrževalniki in jezera. Zelo pomembno je, da s svojim ravnanjem ohranjamo vodna telesa primerna za njihovo uporabo. Ker so tudi strupene cianobakterije del ekosistemov, je smiselno ugotavljati, kateri faktorji spodbujajo sintezo mikrocistinov ali drugih cianotoksinov, da lahko z njimi ljudje in tudi vsi drugi organizmi, ki so del ekosistema, varno sobivamo.

### 1.2 Namens naloge

Z analizo vzorcev iz 17 različnih vodnih teles po Sloveniji in preučevanjem vrstne sestave ter strupenosti cianobakterij, ki se tam pojavljajo, poskušamo ugotoviti, kateri okoljski dejavniki vplivajo na njihovo prisotnost, predvsem pa sproščanje cianotoksinov, ki so lahko nevarni za druge organizme v istem vodnem telesu. S preučevanjem podatkov iz vodnih teles lahko ugotovimo, kateri dejavniki vplivajo na vrste cianobakterij, ki se v vodnih telesih pojavljajo.

### 1.3 Hipoteze

- Pri višji vrednosti pH je koncentracija mikrocistinov v vodnem telesu višja.
- Temperatura je najpomembnejši dejavnik pri zvišanju koncentracije mikrocistinov.
- Temperatura ne vpliva na vse vrste cianobakterij enako.

## 2. TEORETIČNE OSNOVE

V različnih okoljih je dinamika razmnoževanja cianobakterij različna, kar je v Sloveniji aktualen problem. Z raziskavami se trudimo razumeti pogoje, v katerih pride do prekomernega razmnoževanja v obliki cianobakterijskih gošč. Te so lahko v primeru, da so v njih prisotne vrste cianobakterij, ki proizvajajo mikrocistine, nevarne za ljudi in ostale organizme.

### 2.1 Cianobakterije

Cianobakterije so eno od kraljestev v domeni bakterij. Kljub svoji preprosti enocelični zgradbi so zelo kompleksni organizmi. V naravi se lahko pojavljajo kot posamezne celice ali kot skupki oz. filamenti, pri čemer je posamezna celica lahko velika od 2 do 40  $\mu\text{m}$  (Štern A., 2012). Poseljujejo skoraj vse habitate, lahko tudi tiste najbolj ekstremne.

Pogosto so v simbiozi z drugimi organizmi npr. algami, spužvami ali rastlinami. Pomembno vlogo pa imajo tudi kot planktonski organizmi v površinski ali slani vodi, saj skupaj z drugimi fitoplanktonskimi organizmi v metabolnih procesih sprostijo kar 70 % kisika na Zemlji, kar je veliko več kot tropski deževni gozdovi.

Velik evolucijski pomen so imele cianobakterije pri prehodu življenja iz vode na kopno, saj se je z oksigenacijo atmosfere in nastankom ozonske plasti življenje lahko začelo tudi na kopnem. S kopičenjem kisika v atmosferi se je razvilo aerobno dihanje in s tem kompleksnejši evkariontski organizmi.

Različne študije poročajo tudi o učinkoviti uporabi cianobakterij pri pridobivanju biogoriva, določene snovi, ki jih proizvajajo, pa v farmaciji uporabljajo kot protivnetne, protitumorske, imunosupresivne, protivirusne in antibiotične učinkovine (Mundt S. et. al., 2001).

Glede na to, kje se pojavljajo, jih delimo na dve skupini, planktonske in bentoške. Razlikujejo se po načinu življenja v površinskih vodah. Planktonske lebdijo v vodi, ustrezata jim visoka temperatura in pH (Davis W. T. et. al., 2009). Bentoške pa navadi vidimo kot biofilme na kamnih, vodnih rastlinah in drugem materialu ob in v stoječi vodi. Ustreza jim voda z nekoliko manj hranil (Davis W. T. et. al., 2009), ker lahko tako do dna pride več svetlobe, ki jo potrebujejo za fotosintezo. Obloge so lahko za ljudi in živali nevarne, če se odtrgajo od površine, saj tako mikrocistini lažje prehajajo naprej po prehranjevalni verigi.



Slika 1: Cianobakterija rodu *Dolichospermum*, ki lahko proizvaja cianotoksine (Vir: Arhiv NIB)

## **2.2 Prekomerna razrast cianobakterij**

Cianobakterije imajo v različnih okoljih različne vplive na ostale organizme. Ob evtrofikaciji lahko pride do dinamične razrasti cianobakterij, kar je sicer naravni pojav, človek pa lahko vpliva na pogostost tega pojava z gnojenjem površin, saj se snovi, kot sta dušik in fosfor, pogosto sperejo z obdelovalnih površin v površinske vodne vire.

Prekomerna razrast cianobakterij se prepozna kot gosta, najpogosteje zelena plast snovi na gladini površinske vode. Pri tem so problem lahko cianotoksi, ki jih cianobakterije izločajo, ali pa bakterijska razgradnja velike količine odmrlih celic, s čimer se iz vodnega stolpca lahko izčrpa veliko kisika. Posledično je v taki vodi kisika za ostale organizme premalo in pojavljajo se množični pogini rib in drugih organizmov.

Zaradi velikega števila cianobakterij se začne počasi zmanjševati biotska pestrost, saj te odvzemajo hranila in svetlobo drugim vrstam organizmov. Posledično imajo tudi invazivne tujerodne vrste priložnost za prekomerno razmnoževanje, kar še dodatno prizadene avtohtone vrste nekega območja.

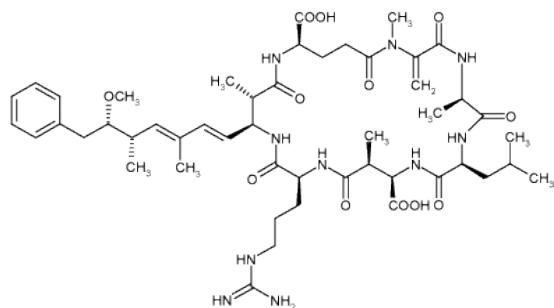
## **2.3 Cianotoksi**

Cianobakterije verjetno izločajo toksine v namen obrambe, sporazumevanja med seboj ali zaznavanja velikosti kolonije bakterij (Eleršek T., 2022). Pri tem se cianotoksi sproščajo v okolje, kar je lahko nevarno za druge organizme. Poznamo različne vrste cianotoksinov, razlikujejo se med vrstami cianobakterij. Poznamo hepatotoksin (škodujejo jetrom), nevrotoksin (napadejo živčni sistem) in dermatotoksin (nevarni za kožo). Hepatotoksin in mikrocistini povzročijo ob vnosu v organizem slabost ali celo bruhanje, lahko vnetje jeter, prebavil, predvsem želodca in pljučnico (Štern A., 2012). Nevrotoksin, kamor spada eden

najmočnejših naravnih strupov, saksitoksin, preprečujejo prenose signalov med žičnimi in miščnimi in povzročajo ohromelost, lahko pride tudi do zadušitve. Zastrupitev ljudi s cianotoksini je po podatkih s celega sveta malo, se pa veliko večkrat poroča o zastrupitvah živali. Razlog je verjetno v tem, da stika pri ljudeh ne povežemo s cianotoksinimi, ker gre v večini primerov za majhne koncentracije in kratkotrajnejšo izpostavljenost kot pri živalih. Za bolj nevarno se je izkazala kronična izpostavljenost – plavanje v vodi, kjer se je pojavilo cvetenje ali zaužitje rib oz. drugih organizmov iz takega okolja. Pri kronični izpostavljenosti lahko pride do poškodb notranjih organov, nastanka tumorjev ali poškodb DNA (Štraser A. et. al., 2013). Obstaja možnost, da sodelujejo pri nastanku rakastih celic, dokazano pa je, da že prisotne rakaste celice spodbujajo k hitrejši delitvi ali razvoju nadalnjih sprememb (Štraser A. et. al., 2013).

### 2.3.1 Mikrocistini

Najpogosteje prisotni toksini v cianobakterijski biomasi so mikrocistini, ki jih uvrščamo med hepatotoksine. Mikrocistini so monociklični heptapeptidi, ki pri ljudeh in živalih po navadi povzročajo poškodbe jetnih celic, izjemoma pa tudi ledvic in reproduktivnega sistema. Poznamo več kot 100 različnih kemijskih oblik, med katerimi je mikrocistin-LR najpogostejša.



Slika 2: Struktura mikrocistina-LR (avtorica: Alja Štraser)

#### 2.3.1.1 Način delovanja mikrocistinov

Mikrocistini v organizmih sesalcev iz krvi vstopajo v jetra s prenašalcji žolčnih kislin. Vplivajo na jetrne celice, te se skrčijo in ločijo med seboj, endotelijalne celice pa se razmaknejo in posledično kri uhaja v jetrno tkivo. Notranja krvavitev lahko privede do hipovolemičnega šoka (Repež A. et. al, 1998).

## 2.4 Vpliv okoljskih dejavnikov na količino mikrocistinov

Raziskave so pokazale, da je proizvodnja mikrocistinov odvisna od dejavnikov okolja, vendar ti ne vplivajo neposredno na sintezo toksinov ampak na hitrost delitve celic. S hitrostjo delitve je potem omejena sinteza mikrocistinov. V raziskavi o odnosu med mikrocistini in hitrostjo delitve celic v okolju z omejenim dušikom so prišli do ugotovitve, da se koncentracija proizvedenih mikrocistinov med delitvijo celic poveča, v stacionarni fazi in fazi smrti pa se koncentracija ni spremenila ali pa se je malo zmanjšala, tudi če so bile cianobakterijske kulture zaradi nitratov močno »izstradane«. Sklep raziskave je bil tudi, da obstaja linearна korelacija med hitrostjo delitve celic in proizvodnjo mikrocistina pri vseh cianobakterijah, ki ga proizvajajo, ne glede na to, kateri je dejavnik, ki delitev celic omejuje (Orr & Jones 1998).

Vrednosti pH, ki ustrezajo cianobakterijam so odvisne od vrste cianobakterij (Qian F. et. al., 2014), kar posledično narekuje tudi, v katerem okolju se pojavljajo najpogosteje in v največji

količini. Vrednost pH vode se spreminja glede na spremembe ostalih okoljskih dejavnikov npr. kamnin, prsti, padavin, sestave rastlinja, odraža pa tudi onesnaževanje okolja. Cianobakterije s svojo prisotnostjo v vodi zvišajo pH, ker pri fotosintezi porabljajo ogljikov dioksid.

Od pH je odvisna tudi topnost določenih hranil v vodi. Višja koncentracija hranil, kot sta dušik in fosfor, je posledica gnojenja kmetijskih površin, izpustov iz kanalizacije ali drugih odpadnih voda. Več kot je hranil v vodi, večja je možnost za nastanek cianobakterijske gošče.

Gošča pogosto nastane ob višji temperaturi, saj večina cianobakterij najhitreje raste ob višji temperaturi kot alge.

Koncentracija kisika v vodi je tudi pomemben dejavnik, odvisen pa je od temperature, slanosti in hitrosti vodnega toka. Veliko vlogo ima tudi razmerje med količino alg in cianobakterij, ki proizvajajo kisik in pogoji za razgradnjo snovi, pri čemer se kisik porablja.

Pomemben dejavnik je tudi prosojnost oz. motnost vode, ki jo merimo s Secchijev globino. Ta nam pove, koliko delcev je prisotnih v vodi, lahko so živi ali ne. Tej delci imajo lahko negativen vpliv na ekosistem zaradi prenosa patogenih organizmov, zaviranja svetlobe ali celo dušenja vodnih organizmov.

## **2.5 Podnebne spremembe in cianobakterije**

Cianobakterije so sicer preprosti organizmi, glede na čedalje večje spremembe okolja pa so se sposobne zelo dobro prilagoditi na nove pogoje na območjih, kjer živijo. Raziskave so pokazale, da bi spremembe v okolju lahko predstavljale grožnje svetovnemu javnemu zdravju, saj bi se hepatotoksične cianobakterije namnožile v večjem obsegu kot do sedaj (El-Shehawy R., et. al., 2012; Bertalanič R. et. al., 2019; Elliott J. A., 2012).

V vodnih okoljih, kjer med drugim živijo tudi cianobakterije, se ob obilnejših padavinah poveča dotok hranil, predvsem dušika in fosforja, v vodna telesa, zaradi suš in visokih temperatur pa se poveča izhlapevanje vode. Rezultat so vodna telesa z višjo koncentracijo hranil, kar lahko vodi v prekomerno razmnoževanje cianobakterij.

## **3. MATERIAL IN METODE DELA**

### **3.1 Material**

#### *Reagenti*

- komplet NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) za izolacijo DNA
- etanol (96–100%) za pripravo pufra SW2

#### *Oprema*

- sterilna delovna površina
- centrifuga s hlajenjem
- pipeti 100 µL–1000 µL in 10 µL–100 µL
- vorteks (stresalnik) z vodoravnim nastavkom
- vodna kopel
- vrečka za odpad in čaša za tekoči odpad
- sonde za merjenje prevodnosti, kisika, temperature in pH
- Secchijev disk



Slika 3: Sonde za merjenje prevodnosti, kisika, temperature in pH (Vir: Arhiv NIB)



Slika 4: Merjenje Secchijeve globine z diskom (Vir: Arhiv NIB)

### **3.2 Metode dela**

#### **3.2.1 Vzorčenje fitoplanktona in fitobentosa na terenu**

Vzorčenje smo opravili na Koseškem bajerju novembra 2022. Pred samim vzorčenjem je potrebno izmeriti določene splošne dejavnike, ki opisujejo okolje, v katerem v nadaljevanju jemljemo vzorce. Tako imenovani fizikalno-kemijski (FI-KE) parametri so pH vode, temperatura vode, količina in delež kisika v vodi ter prevodnost. Izmerimo tudi Secchijevo globino, ki nam daje predstavo o tem, kako motna oz. obremenjena je voda, ki jo vzorčimo. Pri zaznavanju prisotnosti alg oz. cianobakterij nam pomaga tudi meritev količine klorofila in fikocianina v vodi. Ker imajo cianobakterije klorofil in fikocianin, alge pa le klorofil, lahko iz teh podatkov izračunamo delež cianobakterij v združbi vseh avtotrofnih organizmov.

Vzorec fitobentosa dobimo tako, da najprej naberemo lesne ostanke, liste ali kamne, na katerih je prisoten biofilm. Te speremo v destilirani vodi, nato vzamemo vzorec te vode. Vzorec je potrebno hraniti v temni posodi, da se cianotoksi v prisotnosti svetlobe ne začnejo razgrajevati. Prav tako je potrebno dodati etanol, da preprečimo zooplanktonu, da

bi pojedel morebitne alge ali bakterije, ki so prisotne v vzorcu. Na ta način tudi preprečimo nadaljnje razmnoževanje celic.

Pri odvzemu vzorca fitoplanktona vzamemo vodo direktno iz vodnega telesa, ki ga vzorčimo in to vodo damo v posodo za filtriranje. Vzpostavimo vakuum, da voda lažje steče skozi filter. Filter je narejen iz steklenih vlaken in ujame vse delce večje od 1.2  $\mu\text{m}$ , vključno s cianobakterijskimi celicami, ostalo pa prepušča skupaj z vodo, ki jo zavrzemo. V laboratoriju nato uporabimo filter za izolacijo DNA in analizo cianotoksinov.



Slika 5: Pripomočki za filtriranje vode na terenu (Vir: Arhiv NIB)



Slika 6: Filter, ki je ostal po filtrirjanju vzorca na terenu (Vir: Arhiv NIB)



Slika 7: Filtri vzorcev za analizo v laboratoriju (Vir: Arhiv NIB)



Slika 8: Vzorec vode in biofilma (Vir: Arhiv NIB)



Slika 9: Vzorec fitobentosa pod mikroskopom (Vir: Arhiv NIB)

Vse vzorce je potrebno do analize v laboratoriju hraniti na hladnem (0-8 °C), kar po navadi dosežemo z uporabo ledenih vložkov v škatli za shranjevanje.

### **3.2.2 Izolacija DNA**

V splošnem izolacija DNA sledi naslednjim korakom: Vzorec pred začetkom postopka centrifugiramo, da v nadaljevanju delamo samo z usedlino celic brez snovi, ki bile drugače prisotne v vzorcu. Z detergenti ali lizocimom naredimo lizo celic, kar pomeni, da celične membrane in stene razpadajo. Dobimo celični ekstrakt, ki ga ponovno centrifugiramo za odstranitev vseh snovi, ki niso DNA, npr. proteini, celična stena in membrana ali RNA. Iz ekstrakta tako dobimo čisto vodno raztopino DNA. Po potrebi jo lahko še dodatno očistimo s fenolno ekstrakcijo ali posebnim kompletom za čiščenje DNA, na koncu pa v vsakem primeru sledi obarjanje z etanolom ali izopropanolom. Za izolacijo DNA lahko uporabimo tudi komplete za izolacijo.

Izolacijo DNA iz vzorcev fitobentosa smo opravili 7.11.2022 v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo po postopku in s potrebščinami kompleta za izolacijo DNK NucleoSpin Soil.

Pred začetkom izolacije smo delovno površino očistili z etanolom in destilirano vodo, da kasneje ne bi prišlo do kontaminacije vzorca v procesu izolacije. Potem smo ohladili centrifugo na 4 °C in pripravili reagente. Preverili smo, če se je oboril reagent SL1 in ga, če se je oboril, inkubirali na 30-40 °C ter ga medtem stresali vsaki 2 minuti. V reagent SW2 smo do določenega volumna, označenega na plastenki, dodali etanol in na 50 °C inkubirali reagent SE.

#### **Postopek izolacije**

Najprej smo pripravili vzorce za izolacijo. V sterilno 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 2 mL vzorca iz 50 mL izhodiščnega vzorca, ki smo ga prej pretresli z etanolom. Mikrocentrifugirko smo vstavili v centrifugo za 30 min pri 4 °C in 18 000 x g. Po končanem centrifugiranju smo zavrgli tekočino in v usedlino dodali 700 µL reagenta SL1 ter jo raztopili z mešanjem. Z dodatkom reagenta SL1 smo povzročili, da so se razbile celične stene in membrane celic v vzorcu. Mešanico smo nato prenesli v mikrocentrifugirko NucleoSpin Bead Tube Type A, ki je vsebovala majhne keramične kroglice, ki so poskrbele za homogenizacijo vzorca.

Nato smo mešanici vzorca in kroglic dodali 150 µL reagenta Enhancer SX in jo na vorteksu pri sobni temperaturi stresali 5 min. Z dodatkom reagenta in s stresanjem smo povzročili, da se je celotna vsebina celic sprostila v raztopino.

Vzorec smo potem še 1 min centrifugirali pri 11.000 x g, nato pa smo dodali 150 µL reagenta SL3 in vzorec 5 s stresali na vorteksu. 5 min smo ga inkubirali pri 4 °C, da so se oborili proteini in ostale nečistoči, potem pa ga spet centrifugirali 1 min pri 11.000 x g. proteini in nečistoči so se po centrifugiranju posedli na dno.

V zbiralno 2 mL centrifugirko smo nato vstavili filter kolono NucleoSpin Inhibitor Remover Column in nanj naložili največ 650 µL supernatanta, ki je nastal po centrifugiranju oborjenih proteinov in nečistoč. Zbiralno centrifugirko s filtrom smo za 1 min dali v centrifugo pri 11.000 x g, da se je raztopina prefiltrirala. V zbiralni mikrocentrifugirki tako ni bilo več nečistoč, ki jih s centrifugiranjem nismo odstranili. Postopek smo ponovili še enkrat z drugim delom vzorca in na koncu zavrgli filter kolono.

Tekočini v zbirni mikrocentrifugirki smo nato dodali 550 µL reagenta SB in raztopino 5 s stresali na vorteksu ter na kratko centrifugirali. Vstavili smo filter kolono NucleoSpin Soil Column in naložili 550 µL vzorca na filter ter ga za 1 min centrifugirali pri 11.000 x g,

zavrgli tekočino, ki je ostala po filtraciji in postopek ponovili za drug del vzorca. DNK se je s filtracijo vezala na filter.

Sledilo je čiščenje in sušenje filter membrane. Postopek smo ponovili štirikrat in sicer z dodajanjem ustreznega reagenta in centrifugiranjem pri  $11.000 \times g$  za 30 s. Tekočino smo pred izvedbo postopka v+z drugim reagentom zavrgli. Najprej smo dodali  $500 \mu\text{L}$  reagenta SB, nato  $550 \mu\text{L}$  reagenta SW1 in  $650 \mu\text{L}$  reagenta SW2 dvakrat zapovrstjo. S tem smo odstranili nekatere še vedno prisotne organske snovi in huminske kisline.

Za odstranitev preostanka reagentov na filtru smo filter kolono 2 min centrifugirali pri  $11.000 \times g$ .

Nato smo reagent SE predhodno segreli na  $50^\circ\text{C}$  in ga  $50 \mu\text{L}$  dodali na filter, ki smo ga vstavili v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko. Vzorec smo 1 min z odprtим pokrovčkom inkubirali pri sobni temperaturi, nato pa smo pokrovček zaprli in vzorec 30 s centrifugirali pri  $11.000 \times g$ . S tem smo povzročili, da se je čista DNK sprala s filtra zaradi dodatka reagenta SE. Zavrgli smo filter kolono, DNK pa shranili v 1,5 mL mikrocentrifugirki.



Slika 10: Mesto vzorčenja, Koseški baje (Avtorica: Aleksandra Krajnc)

### 3.2.3 Podatki in izračuni

Za analizo smo uporabili predhodno pridobljene podatke iz let 2019 in 2021. Koncentracija mikrocistinov je bila izmerjena z metodo tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Koncentracija potencialno strupenih celic je bila določena z metodo qPCR, v kateri pomnožujemo in kvantificiramo gene *mcyE*, ki so potrebni za proizvodnjo mikrocistinov. Vrstna sestava cianobakterijskih združb je bila določena z morfološkim pregledom pod svetlobnim mikroskopom. Podatki so bili pridobljeni z metodami, ki so opisane v članku (Zupančič M. et. al., 2021).

Iz podatkov o vzorcih smo izračunali koncentracijo mikrocistinov na celico, in sicer tako, da smo delili koncentracijo mikrocistinov s koncentracijo strupenih celic. Nato smo z uporabo Excelove funkcije CORREL izračunali še vrednosti korelacijskih koeficientov.

Tabela 1: Izhodišni podatki, ki smo jih uporabili za izračune

Oznaka vzorca	Vodno telo	Tip vzorca	Datum vzorčenja	Koncentracija strupenih celic [cc/mL]	Koncentracija mikrocistinov [ng/mL]	pH	Temperatura [°C]	Koncentracija O2 [mg/L]	Prevodnost [μs/cm]	Secchi globina [cm]	Koncentracija mikrocistinov na celico [ng/cc]
BL1.2	Blejsko jezero	plankton	14.02.2019	24342,14	0,66045	8,6	4,27	11,6	324,2	400	0,000027132
BL1.5	Blejsko jezero	plankton	23.05.2019	17572,94	0,02735	8,8	9,23	11,3	325	230	0,000001556
BL1.6	Blejsko jezero	plankton	18.06.2019	801,29	0,00955	8,5	12,04	9,7	324,5	850	0,00001918
BL1.7	Blejsko jezero	plankton	15.07.2019	1745,01	0,00535	8,6	14,97	11,2	322,6	720	0,000003066
BL1.8	Blejsko jezero	plankton	8.08.2019	2922,30	0,00705	8,7	15,59	10,6	320,6	750	0,000002412
BL1.9	Blejsko jezero	plankton	12.09.2019	1013,65	0,00815	8,5	15,22	9,3	316,1	900	0,000008040
BL1.10	Blejsko jezero	plankton	7.10.2019	3611,06	0,01577	8,5	13,96	8,7	315	740	0,000004367
BL1.11	Blejsko jezero	plankton	25.11.2019	691,91	0,28865	8,3	11,58	9,5	314,6	550	0,000417182
BL1.12	Blejsko jezero	plankton	17.12.2019	26750,92	0,32751	8,3	8,35	7,9	321,1	400	0,000012243
BO3	Bohinjsko jezero	plankton	17.12.2019	3,30	0,00100	8,3	6,48	10,3	179,1	1050	0,000303030
PE2	Perniško jezero	plankton	27.06.2019	752,89	0,00175	8,3	25,65	9,4	482	20	0,000002324
PE3	Perniško jezero	plankton	22.08.2019	631,20	0,00246	8	28,85	2,7	315,5	30	0,000003904
SL2	Slivniško jezero	plankton	7.08.2019	1816,57	0,00675	8,3	24,01	3,1	297,8	100	0,000003716
SL3	Slivniško jezero	plankton	14.10.2019	311,07	0,00498	8,2	15,35	7,2	320,1	150	0,000016006
P-21-08-PO	Podgrad	plankton	20.08.2021	25,66	3,55000	9,1	28,7	12,7	345	25	0,138367143
P-21-08-SA	Savci	plankton	25.08.2021	103,19	0,17900	7,9	21,6	5,3	286	20	0,001734589
P-21-08-BO	Borovci	plankton	25.08.2021	387,71	5,46533	8,6	21,6	10,3	351	25	0,014096367
P-21-08-HO	Hotinja vas	plankton	25.08.2021	493,19	0,52600	9,5	20,5	8,5	338	15	0,001066522

Tabela 2: Prisotnost potencialno strupenih vrst cianobakterij v Blejskem jezeru v letu 2019

Vrsta \ mesec	jan	feb	mar	apr	maj	jun	jul	avg	sep	okt	nov	dec
<i>Planktothrix rubescens</i>	$5,5 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$
<i>Anabaena lemmermannii</i>	N	N	N	N	N	N	$1,3 \times 10^2$	N	N	N	N	N
<i>Pseudanabaena</i> sp.	N	N	N	N	N	N	$3,3 \times 10^1$	$3,3 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	N	N	N
<i>Microcystis flos-aquae</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	$5,6 \times 10^1$	$6,9 \times 10^1$

Številke prikazujejo število celic na mL vzorca vode. N – vrsta ni prisotna.

Tabela 3: Prisotnost potencialno strupenih vrst cianobakterij v Perniškem jezeru v letu 2019

vrsta / mesec	april	junij	avgust	oktober
<i>Anabaena flos-aquae</i>	$8.4 \times 10^2$	$2.2 \times 10^2$	$3.5 \times 10^3$	N
<i>Anabaena plantonica</i>	N	$5.2 \times 10^2$	$9.2 \times 10^4$	N
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	N	$2.2 \times 10^2$	$1.7 \times 10^3$	N
<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i>	N	3.0	$2.4 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	N	$9.7 \times 10^1$	N	$3.3 \times 10^3$
<i>Microcystis aeruginosa</i>	N	$5.0 \times 10^1$	$1.5 \times 10^2$	N
<i>Microcystis flos-aquae</i>	N	$1.8 \times 10^2$	$3.3 \times 10^3$	N
<i>Planktothrix agardhii</i>	$1.6 \times 10^3$	$9.7 \times 10^3$	$4.6 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$
<i>Planktothrix rubescens</i>	$3.5 \times 10^3$	N	N	$1.8 \times 10^3$
<i>Pseudanabaena catenata</i>	$2.5 \times 10^4$	N	$1.3 \times 10^3$	$6.4 \times 10^4$
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	$5.8 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$	$8.7 \times 10^4$
<i>Phormidium</i> sp.	N	$3.6 \times 10^2$	$3.7 \times 10^2$	N

Številke prikazujejo število celic na mL vzorca vode. N – vrsta ni prisotna

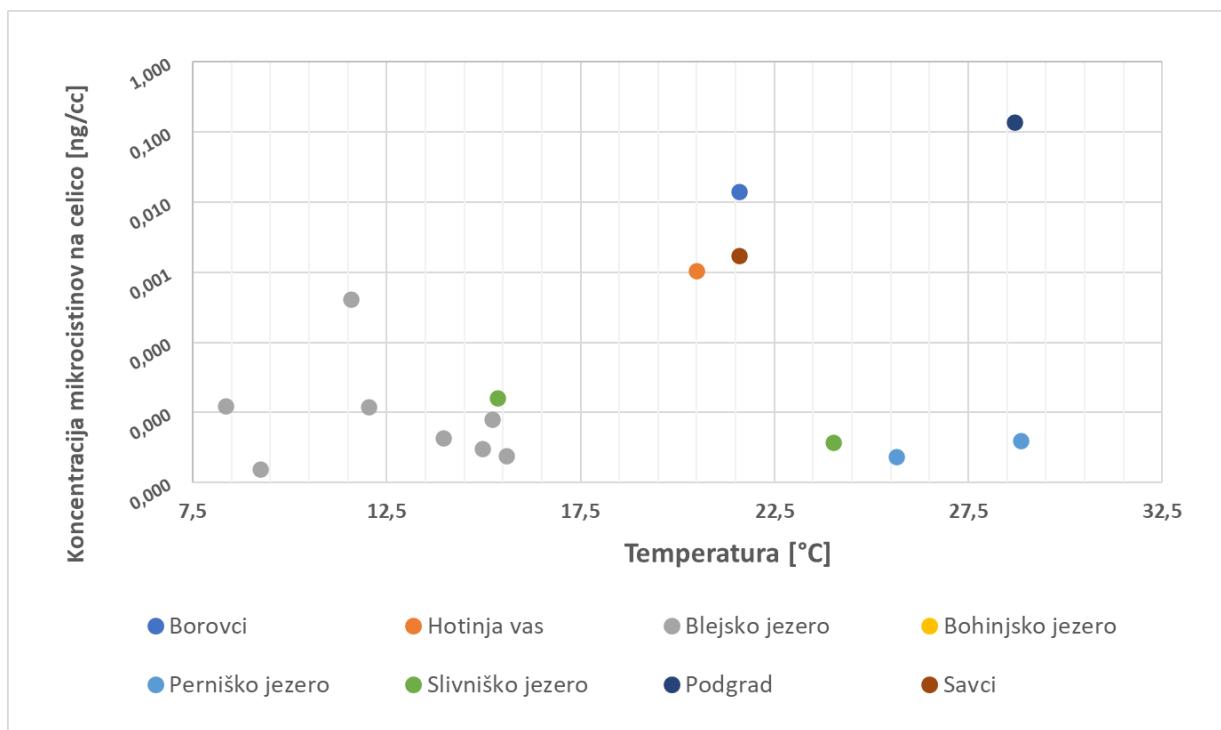
## 4. REZULTATI

Vpliv okolja na strupenost cianobakterij se pokaže pri izračunu korelacijskih koeficientov koncentracije mikrocistinov na celico in podatkov o posameznem okoljskem dejavniku.

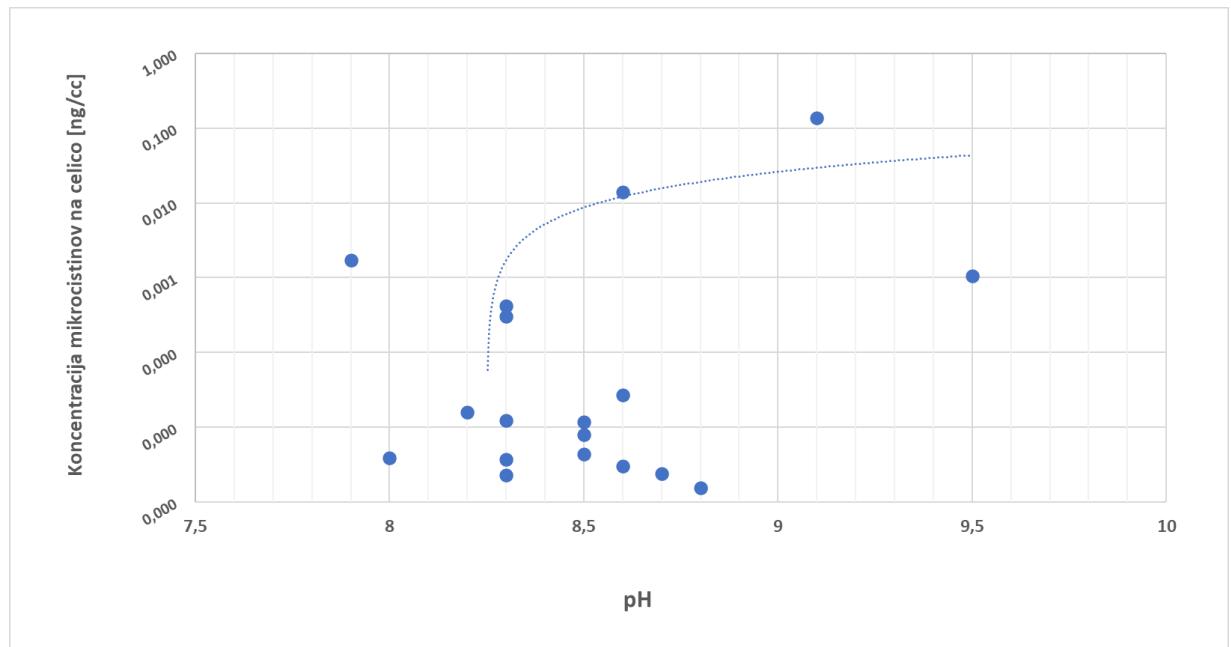
Tabela 4: Korelacijski koeficienti

Okoljski dejavnik	Koeficienti korelacije (r)
pH	0,40
T [°C]	0,43
O <sub>2</sub> [mg/L]	0,36
Prevodnost	0,12
Secchi globina	-0,28

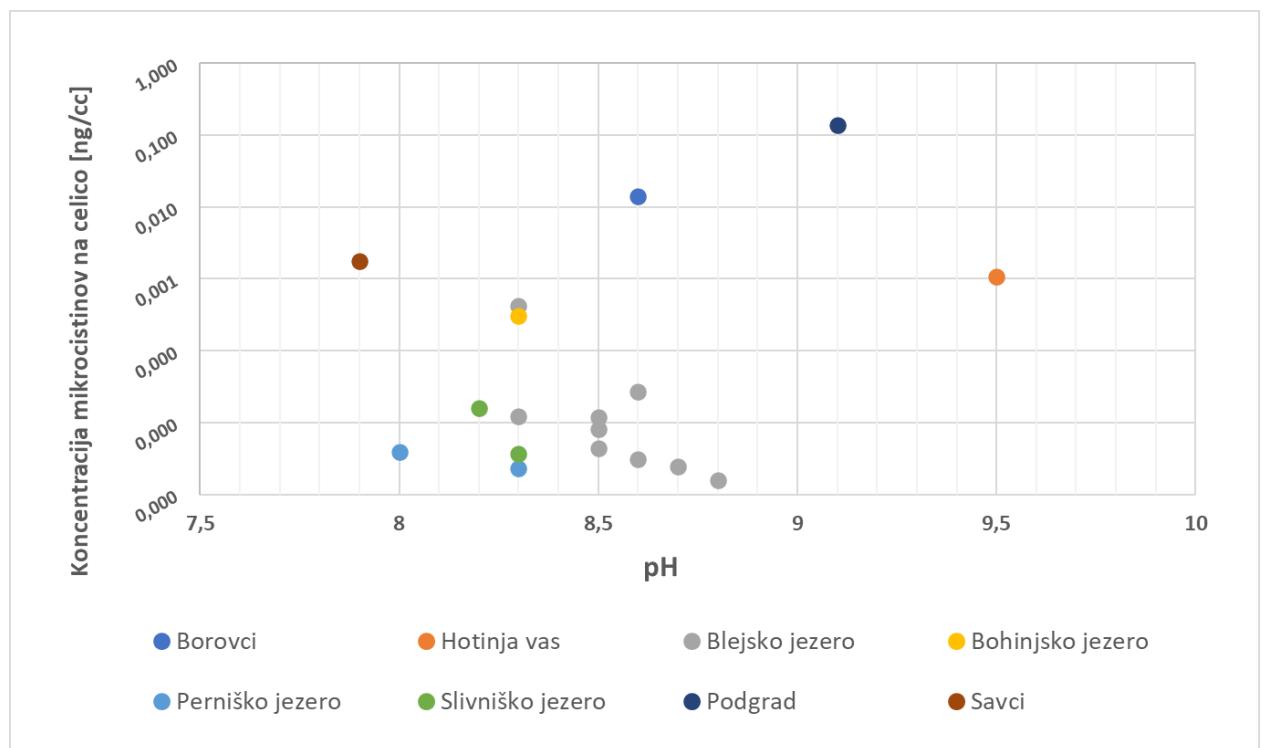
Izračuni so povsod, razen pri Secchijevi globini, pokazali pozitivno korelacijo. V večini primerov je ta srednje močna (vrednost korelacijskega koeficiente od 0,3 do 0,7), razen pri prevodnosti, kjer vrednost nakazuje izredno šibko korelacijo (vrednost korelacijskega koeficiente od 0 do 0,3). Pri Secchijevi globini se je pokazala šibka negativna korelacija.



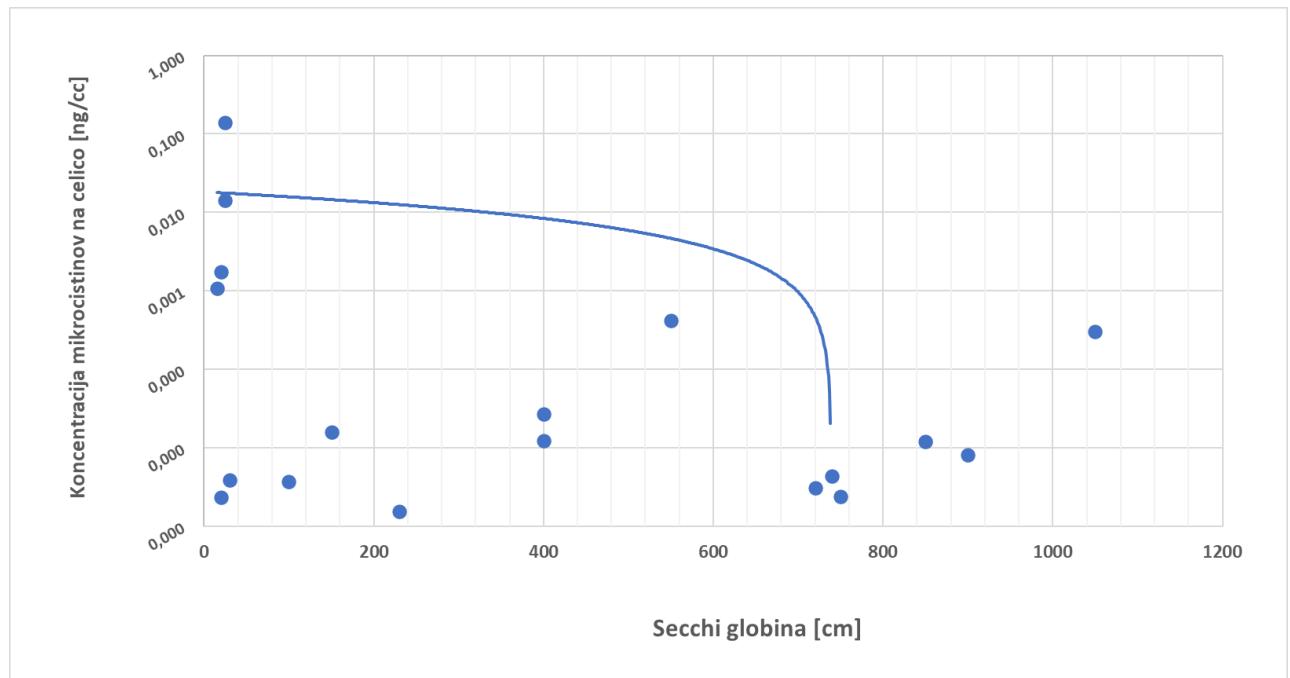
Slika 11: Vpliv temperature na koncentracijo mikrocistinov na celico, posamezna vodna telesa



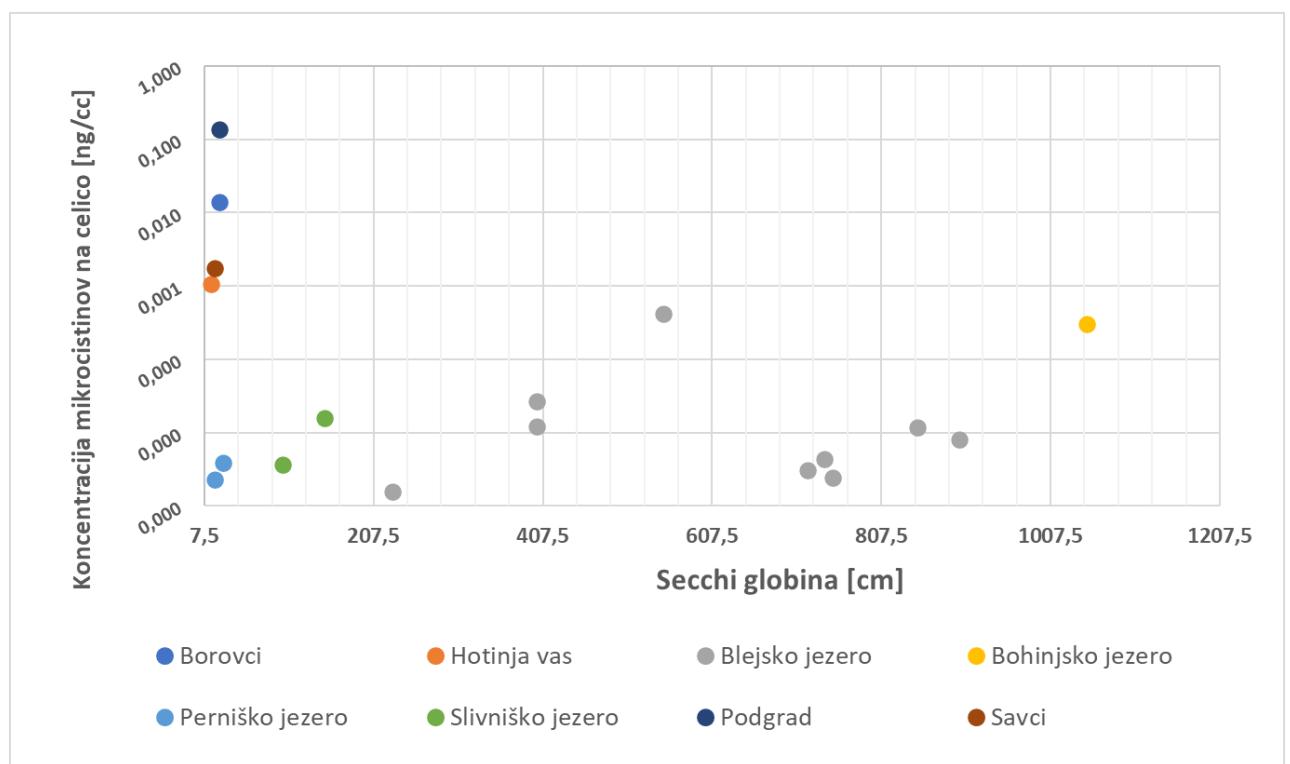
Slika 12: Vpliv pH na koncentracijo mikrocistinov na celico



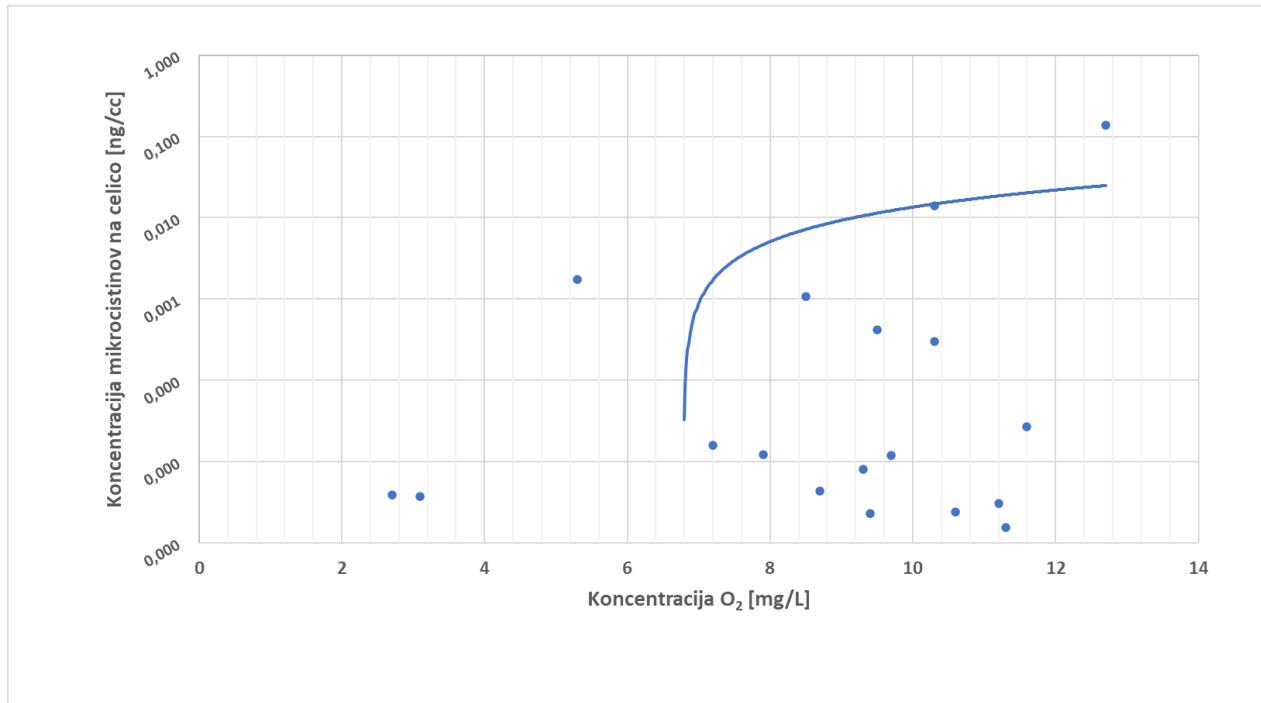
Slika 13: Vpliv pH na koncentracijo mikrocistinov na celico, posamezna vodna telesa



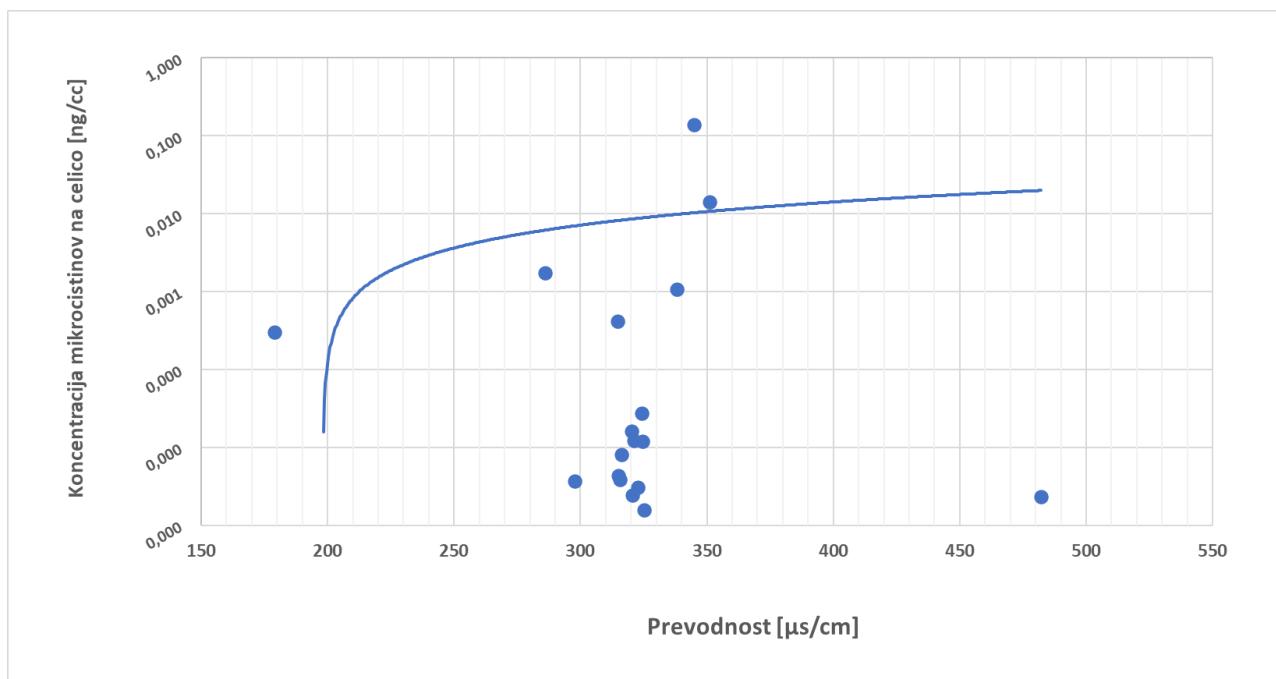
Slika 14: Vpliv Secchi globine na koncentracijo mikrocistinov na celico



Slika 15: Vpliv Secchi globine na koncentracijo mikrocistinov na celico, posamezna vodna telesa



Slika 16: Vpliv koncentracije kisika v vodi na koncentracijo mikrocistinov na celico



Slika 17: Vpliv prevodnosti na koncentracijo mikrocistinov na celico

## 5. RAZPRAVA

Na podlagi rezultatov smo potrdili, da je temperatura pomemben dejavnik pri proizvodnji cianotoksinov, saj je koreacijski koeficient med temperaturo in koncentracijo mikrocistinov pozitiven (Tabela 4). Zaradi premajhnega števila podatkov ne moremo z gotovostjo govoriti o splošnem pravilu, ki narekuje odvisnost koncentracije mikrocistinov od temperature za vse vrste cianobakterij v vseh vodnih telesih. Tudi druge raziskave navajajo podobna opažanja pri odvisnosti sinteze cianotoksinov od temperature, večina pa kaže splošen zaključek, da se cianobakterije bolj namnožijo pri višji temperaturi, kar predstavlja tveganje za povečano koncentracijo cianotoksinov (Davis W. T. et. al., 2009).

Po pregledu podatkov za posamezno vodno telo so se pokazale različne odvisnosti oz. povezave med temperaturo in koncentracijo mikrocistinov (Slika 11). Lokacije Slivniško jezero, Blejsko jezero in Perniško jezero so imele pri vzorčenjih pri različnih temperaturah podobno koncentracijo mikrocistinov, zato lahko sklepamo, da na sintezi mikrocistinov bolj kot temperatura vplivajo ostali dejavniki. Razlike v številu strupenih cianobakterij lahko poleg temperturnih razlik pojasnimo tudi z vrstno sestavo v opazovanih vodnih telesih. S tem potrdimo tretjo hipotezo.

V Blejskem jezeru je prevladujoča vrsta cianobakterij *Planktothrix rubescens* dober primer odstopanja siceršnjih opažanj, saj se namnoži pri nižji temperaturi, zlasti v zimskih mesecih (Tabela 2). Na podlagi rezultatov lahko delno potrdimo drugo hipotezo, ker je temperatura sicer najpomembnejši dejavnik, vendar ne moremo potrditi splošnega pravila za vsa vodna telesa in vse vrste cianobakterij. Tudi rezultati drugih raziskav na tem področju (Davis W. T. et. al., 2009; Robarts R. D., Zohary T., 2010) so glede vpliva temperature neenotne, kljub temu, da so bile narejene na večjem vzorcu.

Vrednost pH je povezana s koncentracijo mikrocistinov s podobno močno pozitivno korelacijo kot temperatura (Slika 12), vendar so tudi tu vidna odstopanja posameznih meritev v različnih vodnih telesih, ki bi lahko bila povezana z različnimi vrstami cianobakterij (Slika 13). V vodnih telesih, kjer je meritev več, je vrednost pH podobna za vse meritve v istem vodnem telesu, iz česar lahko sklepamo, da na količino mikrocistinov bolj vplivajo lastnosti vodnega telesa, ne pa le pH. Na podlagi naših meritev ne moremo zanesljivo trditi, da je le pH tisti dejavnik, ki vpliva na koncentracijo mikrocistinov. S tem smo prvo hipotezo ovrgli.

Pri vplivu Secchijeve globine se pri pregledu vseh podatkov pokaže trend, manjša kot je Secchijeva globina in s tem večja motnost, več je prisotnih cianobakterij, ki lahko proizvedejo več mikrocistinov (Slika 15). Ko pogledamo podatke po posameznih vodnih telesih, se izkaže, da je večji vpliv lokacije vzorčenja in vseh ostalih tam prisotnih dejavnikov kot pa same Secchijeve globine (Slika 15). Zaradi tega ne moremo z gotovostjo trditi, da ima Secchijeva globina vpliv na cianobakterije in količino sintetiziranih mikrocistinov.

Na koncentracijo kisika v vodi ne vplivajo samo cianobakterije s svojo fotosintetsko aktivnostjo, zato je težko komentirati povezavo med sintezo mikrocistinov in koncentracijo kisika. V splošnem se je iz rezultatov pokazalo, da več kot je prisotnega kisik, višji je nivo sinteze mikrocistinov (Slika 16). Na koncentracijo kisika vplivajo tudi drugi organizmi, različni abiotski dejavniki ter stanje vremena, zato se velike spremembe v vrednosti koncentracije kisika lahko pokažejo že na dnevni ravni.

Prevodnost se je izkazala kot dejavnik, ki najšibkeje oz. skoraj ne vpliva na količino cianobakterij in njihovo sintezo cianotoksinov. Pokazala se je izredno šibka pozitivna korelacija med koncentracijo mikrocistinov in prevodnostjo in na splošno težko trdimo, da

večja prevodnost posledično pomeni več mikrocistinov (Slika 17). Pri približno enaki prevodnosti so vrednosti mikrocistinov v celici zelo različne.

## 6. ZAKLJUČEK

Temperatura, pH, koncentracija kisika, prevodnost in Secchijeva globina so povezane z dinamiko razmnoževanja cianobakterij in s tem tudi s koncentracijo mikrocistinov. Vrste cianobakterij so med seboj tako različne, da vsaki ustreza drugačni pogoji, zato ne moremo narediti zaključkov, ki bi veljali na splošno za vse cianobakterije in vsa vodna telesa. Poleg tega smo pri več dejavnikih (temperatura, pH, Secchijeva globina) opazili, da je bolj kot preučevani dejavnik s koncentracijo mikrocistinov povezana sama lokacija, torej vsi drugi dejavniki, ki jih v raziskavo nismo zajetih.

V nadalnjih raziskavah bi povečali število vzorcev iz vodnih teles, kjer se pojavljajo iste vrste cianobakterij. Prav tako bi lahko z določanjem koncentracije hranil v izbranih vodnih telesih definirali vpliv posameznega dejavnika na rast cianobakterij.

Za bolj zanesljive rezultate raziskav bi morali imeti za posamezno vodno telo več podatkov, tako bi bili statistični izračuni natančnejši in bi jih potem lažje povezali z vrstno sestavo in oblikovali zaključke v povezavi s teoretičnim znanjem, ki ga o določenih vrstah cianobakterij že imamo.

Preverili smo, kako izbrani okoljski dejavniki vplivajo na koncentracijo mikrocistinov. Na podlagi dobljenih rezultatov bi lahko nadaljnje raziskave usmerjali v preučevanje še drugih dejavnikov, ki vplivajo na koncentracijo sintetiziranih cianotoksinov.

## 7. VIRI

- Bertalanič R. et. al., 2019: Ocena podnebnih sprememb v Sloveniji do konca 21. Stoletja. Ljubljana: Agencija Republike Slovenije za okolje:  
[https://meteo.ars.si/uploads/probase/www/climate/text/sl/publications/OPS21\\_po\\_vzetek\\_posodobljeno.pdf](https://meteo.ars.si/uploads/probase/www/climate/text/sl/publications/OPS21_po_vzetek_posodobljeno.pdf) (2022-12-20)
- Ciano SLO: Ali lahko cianobakterije cvetijo?: <https://www.ciano.si/ali-lahko-cianobakterije-cvetijo/> (2022-11-16)
- Ciano SLO: Podnebne spremembe in cianobakterije: <https://www.ciano.si/podnebne-spremembe-in-cianobakterije/> (2022-10-12)
- Davis T. W. et. al., 2009: The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568988309000390> (2022-11-13)
- Eleršek T., 2021: [http://www.nib.si/images/razno/V\\_VRTINCU\\_SPREMEMB.pdf](http://www.nib.si/images/razno/V_VRTINCU_SPREMEMB.pdf) (2023-2-15)
- Eleršek T., 2022: Cianobakterije se s svojimi strupi morda sporazumevajo, Podobe znanja 2.9.2022: <https://val202.rtvslo.si/podcast/podobe-znanja/526/174896067> (2023-1-18)
- Elliott J. A., 2012: Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria:  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.018> (2023-1-26)
- El-Shehawy R., et. al., 2012: Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: what can we learn from experiments?:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178305/> (2022-12-15)
- Learn about cyanobacteria and cyanotoxins: <https://www.epa.gov/cyanohabs/learn-about-cyanobacteria-and-cyanotoxins> (2022-11-16)
- Mundt S. et. al., 2001: Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438463904700449> (2023-2-20)
- Orr & Jones, 1998: Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures:  
<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lo.1998.43.7.1604> (2022-12-20)
- Qian F. et. al., 2014: The effect of pH on the release of metabolites by cyanobacteria in conventional water treatment processes:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568988314001589> (2023-2-15)
- Repež A. et. al, 1998: Vloga mikrocistinov pri razvoju bolezni parenhimskih organov:<https://medrazgl.si/vloga-mikrocistinov-pri-razvoju-bolezni-parenhimskih-organov/> (2022-12-20)

Robarts R. D., Zohary T., 2010: Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288330.1987.9516235> (2022-11-10)

Struktura mikrocistina: <https://www.enzolifesciences.com/ALX-350-012/microcystin-lr/> (2022-12-20)

Štern A., 2012: Cianobakterije in njihovi toksini: Modrozeleni cvet s 'trni'. *Življenje in tehnika*, vol. 63, 66-72. (2022-12-15)

Štraser A. et. al, 2013: The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653513004530> (2023-1-15)

Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2984099/> (2022-10-12)

Zupančič M. et. al., 2021: Potentially Toxic Planktic and Benthic Cyanobacteria in Slovenian Freshwater Bodies: Detection by Quantitative PCR:  
<https://www.mdpi.com/2072-6651/13/2/133> (2022-10-12)