

Raziskovalna naloga

PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI IZOLACIJE DNA MED RAZLIČNIMI KULTURAMI CIANOBAKTERIJ

EKOLOGIJA Z VARSTVOM OKOLJA



[19]

Avtor: Eva Skeledžija

Mentor: Sonja Artač, prof. biol., Gimnazija Vič

Somentor: doc. dr. Tina Eleršek – Nacionalni inštitut za biologijo

Maša Jablonska – Nacionalni inštitut za biologijo

Ljubljana, januar 2024

1. ZAHVALA

Pri nastajanju te raziskovalne naloge bi se najprej rada zahvalila doc. dr. Tini Eleršek in Maši Jablonski, saj sta mi omogočili delo raziskovalne naloge na Nacionalnem inštitutu za biologijo med januarjem in februarjem leta 2022. Vedno sta bili na voljo za posvet, poleg tega pa sta s svojo strokovnostjo pripomogli k nastanku raziskovalne naloge.

Prav tako bi se rada zahvalila Nikolaju Mavreku, študentu mikrobiologije, saj je s svojim kritičnim pogledom na delo in rezultate pripomogel k nastanku raziskovalne naloge.

Rada bi se zahvalila tudi študentki Maruši Kerenčič za pomoč pri dodatni izvedbi laboratorijskega dela.

Nazadnje bi se rada zahvalila še Sonji Artač, prof. biol. za vso mentorsko spodbudo in strokovno pomoč, ki jo je nudila med nastajanjem naloge.

Kazalo vsebine

1. ZAHVALA.....	2
<i>Kazalo slik.....</i>	<i>4</i>
<i>Kazalo grafov.....</i>	<i>4</i>
<i>Kazalo tabel.....</i>	<i>4</i>
3. POVZETEK	5
ABSTRACT.....	6
4. UVOD.....	7
4.1 Namen raziskovalne naloge.....	7
4.2 Raziskovalno vprašanje	9
4.3 Hipoteza	9
4.4 Teoretično ozadje	9
4.4.1 Cianobakterije	9
4.4.2 Molekula DNA.....	10
4.4.3 Morfološke značilnosti kultur cianobakterij in učinkovitost izolacije.....	11
5. MATERIALI IN METODE DELA	13
5.1 Izračuni pričakovane koncentracije DNA.....	13
5.2 Filtracija in liza cianobakterijskih kultur	14
5.2.1 Filtracija	14
5.2.2 Liza	14
5.3 Merjenje koncentracije DNA pred izolacijo.....	14
5.3.1 Spektrofotometrija.....	14
5.3.2 Fluorometrija	15
5.4 Izolacija DNA.....	15
5.5 Merjenje koncentracije DNA po izolaciji	16
6. REZULTATI.....	17
6.1 Rezultati pred izolacijo DNA	17
6.2 Rezultati po izolaciji DNA	18
6.3 Vpeljava prilagojenih vzorcev kultur cianobakterij	21
7. DISKUSIJA	24
8. ZAKLJUČEK	26

Kazalo slik

Slika 1: Kultura <i>Synechococcus</i> sp. pod mikroskopom.....	7
Slika 2: Kultura <i>Microcystis</i> sp. pod mikroskopom.....	8
Slika 3: Kultura <i>Anabaena cylindrica</i> pod mikroskopom	8
Slika 4: Sistematska uvrstitev cianobakterij	9
Slika 5: Zgradba molekule DNA	10
Slika 6: Zgradba nukleotida	11
Slika 7: Laboratorijska naprava DeNovix za merjenje koncentracije DNA z metodama spektrofotometrije in fluorometrije	16

Kazalo grafov

Graf 1: Merjenje koncentracije DNA kulture <i>Microcystis</i> in <i>Synechococcus</i> s spektrofotometrijo DNA pred izolacijo.....	17
Graf 2: Merjenje koncentracije DNA kulture <i>Microcystis</i> in <i>Synechococcus</i> s spektrofotometrijo po izolaciji DNA	19

Kazalo tabel

Tabela 1: Prikaz koncntracije celic kulture <i>Synechococcus</i> in <i>Microcystis</i> na 1 mL	13
Tabela 2: Prikaz mas genoma cianobakterijskih kultur <i>Synechococcus</i> in <i>Microcystis</i> na 1 mL	13
Tabela 3: Prikaz koncentracije DNA kulture <i>Microcystis</i> in <i>Synechococcus</i> po izolaciji z merilno metodo spektrofotometrije, M – <i>Microcystis</i> sp. PCC 7806, S – <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002. Prva števka predstavlja tehnično ponovitev izolacije (tri ponovitve), druga pa ponovitev merjenja koncentracije (tri ponovitve).....	18
Tabela 4: Prikaz koncentracije DNA kulture <i>Microcystis</i> in <i>Synechococcus</i> po izolaciji z merilno metodo fluorometrije, M – <i>Microcystis</i> sp. PCC 7806, S – <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002. Prva števka predstavlja tehnično ponovitev izolacije (tri ponovitve), druga pa ponovitev merjenja koncentracije (tri ponovitve).....	20
Tabela 5: Prikaz koncntracije celic kulture <i>Synechococcus</i> in <i>Anabaena cylindrica</i> na 1 mL .	21
Tabela 6: Prikaz mas genoma kulture <i>Synechococcus</i> in <i>Anabaena cylindrica</i>	21
Tabela 7: Prikaz koncentracije DNA prilagojene kulture <i>Synechococcus</i> in <i>Anabaena cylindrica</i> po izolaciji z metodo fluorometrije. A – <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122, S – <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002. Prva števka predstavlja tehnično ponovitev izolacije (tri ponovitve), druga pa ponovitev merjenja koncentracije (tri ponovitve).....	22
Tabela 8: Izračunana učinkovitost izolacije DNA iz kulture <i>Microcystis</i> in <i>Synechococcus</i> ob predpostavljenem različnem številu kopij genoma. Z zeleno so označene vrednosti med 10 in 100 %.....	24

3. POVZETEK

Cianobakterije se med seboj razlikujejo po mnogih značilnostih, mi pa smo se v tej raziskovalni nalogi osredotočili na razlike v obliki celic, tvorbi kolonij in debelini celičnega ovoja. Te razlike lahko vplivajo na učinkovitost izolacije DNA. Če na primer celičnega ovoja ne moremo v celoti uničiti pred izolacijo, ne moremo izolirati vse DNA, saj ostane ujeta v celicah. Samo izolacijo lahko zavirajo tudi različni sekundarni metaboliti iz cianobakterij ali druge snovi v vodi oziroma okolju.

Podatek o učinkovitosti izolacije je ključen pri kvantitativnem raziskovanju biodiverzitete cianobakterij. Poleg tega učinkovita izolacija DNA omogoča tudi uporabo cianobakterij v biotehnoloških panogah, kot so na primer pridelava biogoriv in farmacevtskih izdelkov. Učinkovita izolacija DNA je ključna tudi za genski inžiniring, kjer spremnjanje genskega zapisa cianobakterij odpira možnosti za proizvodnjo različnih industrijsko pomembnih snovi, npr. biorazgradljive plastike ali vodika kot vira energije.

Izvedli smo raziskavo, kjer smo primerjali učinkovitost izolacije DNA med dvema različima cianobakterijskima kulturama z različnimi morfološkimi značilnostmi. Uporabili smo kokoidni enocelični vrsti cianobakterij, in sicer *Microcystis sp. PCC 7806* in *Synechococcus sp. PCC 7002*. Pričakovano koncentracijo DNA v začetni kulturi smo že vnaprej izračunali na podlagi znanih podatkov o velikosti genoma posameznih kultur in koncentraciji celic v kulturi. Naposled smo DNA izolirali in z metodama spektrofotometrije in fluorometrije izmerili koncentracijo DNA po izolaciji ter jo primerjali z izračunano koncentracijo pred izolacijo.

KLJUČNE BESEDE: DNA, izolacija DNA, spektrofotometrija, fluorometrija, cianobakterije

ABSTRACT

Many living organisms differ in morphological characteristics. These include cyanobacteria. Cyanobacteria differ from each other in many characteristics. In this research assignment we put a special focus on a cell shape, colony formation and cell envelope thickness. These differences can affect the efficiency of DNA isolation. If the cell membranes cannot be completely broken down before isolation, not all DNA can be isolated, as it remains trapped in the cells. Moreover, the isolation itself can be inhibited by various secondary metabolites from cyanobacteria.

The data on the efficiency of isolation represents a base for researching the quantitative biodiversity of cyanobacteria. Efficient DNA isolation enables the use of cyanobacteria in biotechnological industries, such as biofuel production and pharmaceuticals. Besides that, efficient DNA isolation is key, especially for genetic engineering, where it also opens up possibilities for production of various industrially essential substances such as biodegradable plastic and hydrogen as an energy source.

We conducted a study comparing the isolation efficiency of DNA between two different cyanobacterial cultures with different morphological characteristics. We used a cocoid single-celled species of cyanobacteria, named *Microcystis sp. PCC 7806* and *Synechococcus sp. PCC 7002*. The expected concentration of DNA in the initial culture was calculated in advance on the basis of known data on the genome size of individual cultures. Finally, DNA was isolated and the presence of DNA concentrations was measured by spectrophotometry and fluorometry. At the end, we have compared the results of estimated and measured DNA isolation.

KEY WORDS: DNA, DNA isolation, spectrophotometry, fluorometry, cyanobacteria

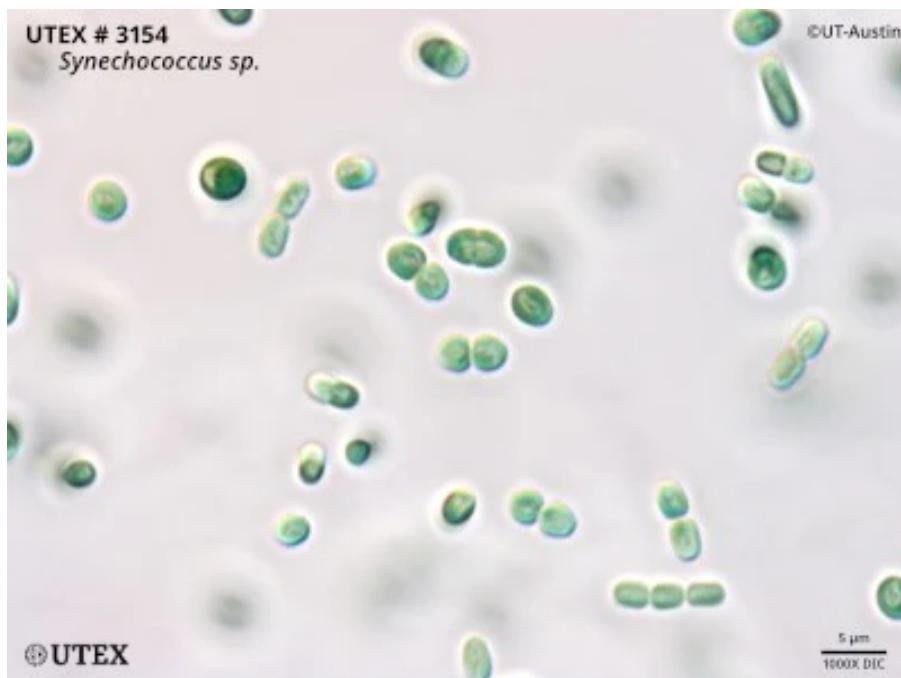
4. UVOD

4.1 Namen raziskovalne naloge

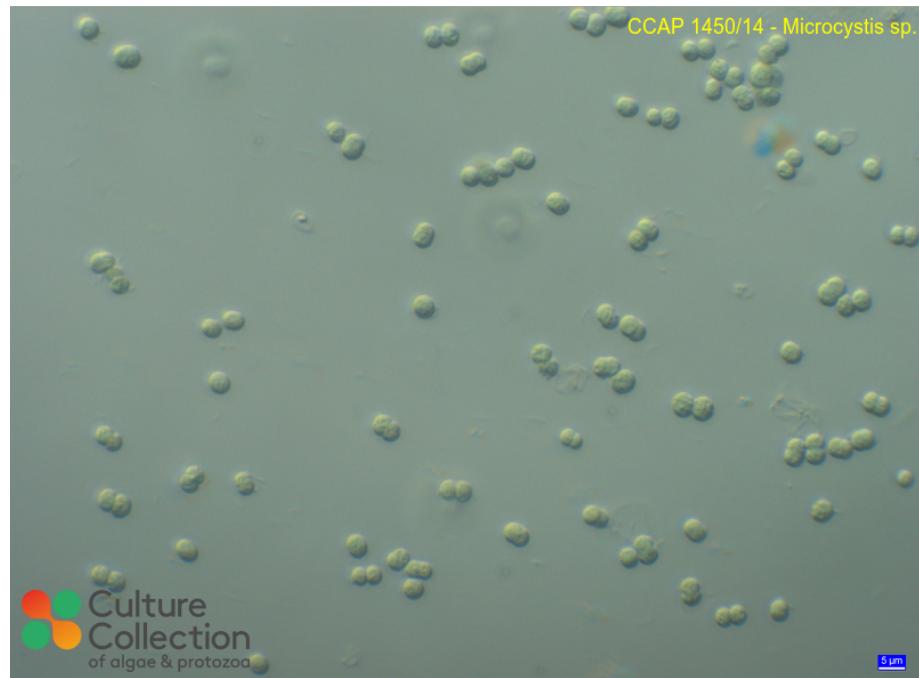
V raziskavi bomo uporabili tri kulture cianobakterij iz rodov *Microcystis* (Slika 1), *Synechococcus* (Slika 2) in *Anabaena cylindrica* (Slika 3). Sprva smo primerjali učinkovitost izolacije DNA med kulturama *Synechococcus sp. 7002* in *Microcystis sp. PCC 7806*, nato pa smo zaradi neneavadno visokih rezultatov v raziskavo vpeljali še dve novi, po število kopij genoma prilagojeni kulturi *Anabaena cylindrica PCC 7122* in *Synechococcus sp. PCC 7002*. Vpeljava novih kultur cianobakterij, nam omogoča boljšo zanesljivost rezultatov.

Prvotni kulturi, *Synechococcus sp. PCC 7002* in *Microcystis sp. PCC 7806* sta po velikosti celic med seboj različni, kar bi lahko vplivalo na učinkovitost izolacije DNA. Pričakujemo, da se bo nekaj DNA med postopkom izolacije izgubilo, ker se bo ujela med nerazpadle dele celične membrane. Naš glavni namen je ugotoviti, ali se učinkovitost izolacije razlikuje med različnimi kulturami. Večje kot je razmerje med izmerjeno in pričakovano koncentracijo, bolj učinkovita je izolacija.

Podatek o učinkovitosti izolacije DNA v kulturah cianobakterij je temelj pri preučevanju genetske pestrosti samih cianobakterij, predvsem pri analizah, ki zahtevajo številčne rezultate. Cianobakterije imajo prav tako svoj potencial na področju biotehnologije. Omenjene bakterije lahko uporabljamo v pridelavi biogoriv in farmacevtskih izdelkov. Učinkovita izolacija DNA obenem predstavlja ključno izhodišče v genskem inženiringu, npr. pri proizvodnji bioaktivnih molekul. Znanje o učinkovitosti izolacije DNA pripomore tudi k razvoju molekularnih testov, ki bi bili sposobni na osnovi cianobakterij zaznavati spremembe v okolju, kot so kvaliteta vode in prisotnost cianotoksinov.



Slika 1: Kultura *Synechococcus* sp. pod mikroskopom



Slika 2: Kultura Microcystis sp. pod mikroskopom

[18]



Slika 3: Kultura Anabaena cylindrica pod mikroskopom

[28]

4.2 Raziskovalno vprašanje

Kako se razlikuje učinkovitost izolacije DNA med različnimi kulturami cianobakterij glede na njihove morfološke značilnosti?

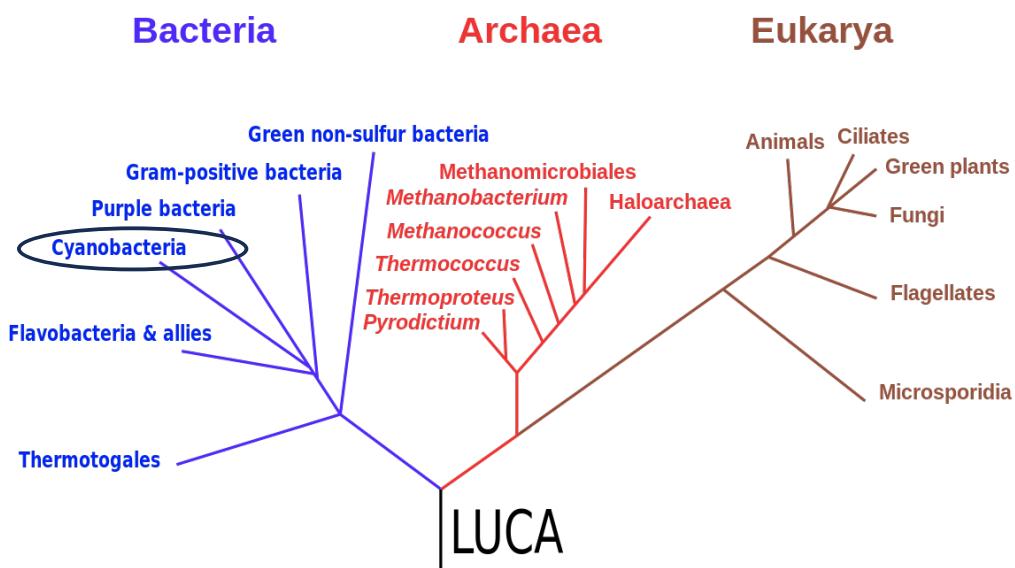
4.3 Hipoteza

Izolacija DNA iz kulture *Synechococcus sp. PCC 7002* bo bolj učinkovita kot izolacija DNA iz kulture *Microcystis sp. PCC 7806 in Anabaena cylindrica PCC 7122*.

4.4 Teoretično ozadje

4.4.1 Cianobakterije

Cianobakterije poznamo tudi pod imenom modrozeleni cepljivki, ki pa je že zastarel in se v strokovni literaturi vse bolj redko uporablja. Veljajo za morfološko in fiziološko izredno raznoliko skupino bakterij. Gre za bakterije, ki svojo energijo pridobijo s procesom fotosinteze. Spadajo med najstarejše fotoavtotrofne organizme, saj so v naravi prisotne že pribljižno 3 milijarde let. Zaradi sposobnosti avtotrofne pridelave energije lahko cianobakterije tudi bivajo v endosimbiozi z evkariontskimi organizmi. Cianobakterije so bile eden od ključnih dejavnikov za zvišano koncentracijo kisika v atmosferi in posledično tudi za razvoj aerobnih organizmov. Skupaj s fitoplanktonom lahko proizvedejo do 70 % prostega kisika na Zemlji. V celicah imajo pigment klorofil in druga fotosintetna barvila, kot so betakaroten, ksantofili in fikobilini. Zaradi teh barvil lahko kolonije cianobakterij vidimo v zeleni, modrozeleni, rdeči, vijoličasti ali pa celo črni barvi. Sposobne so spremenjati razmerje med fotosintezni barvili v odvisnosti od jakosti svetlobe, ki jim jo ponuja okolje. Temu pojavu rečemo kromatična adaptacija, s katero si cianobakterije zagotovijo največji izkoristek svetlobe. [1] [5] [12] [13] [15]

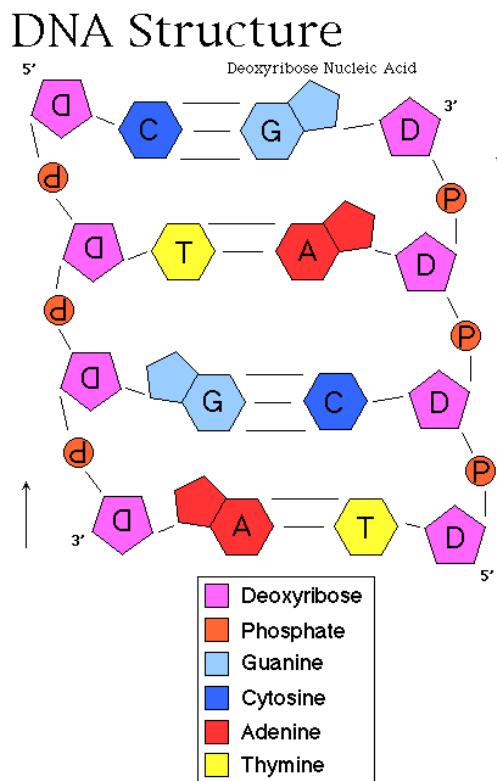


Slika 4: Sistematska uvrstitev cianobakterij

Cianobakterije naseljujejo različne ekosisteme. Največ predstavnikov živi v celinskih vodah in prsti, živijo pa tudi v topih vrelcih, morju, na kamnih in na skorjah dreves. Cianobakterije so zmožne sintetizirati številne biološko aktivne snovi, ki jih izkoriščamo v različne namene. Obstajajo tudi take, ki so lahko škodljive za ljudi in živali; imenujemo jih cianotoksi. O zastrupitvah s cianotoksi pri ljudeh ne poročajo veliko, saj smo toksinom običajno izpostavljeni le v manjših količinah, ki pa ne privedejo do akutnih simptomov. Za ljudi je lahko nevarna dolgoročna izpostavljenost, ki lahko vodi v spodbujanje nastanka tumorjev, rakavih obolenj, respiratornih težav, abdominalnih obolenj ali nevrodegenerativnih bolezni. [5] [11]

4.4.2 Molekula DNA

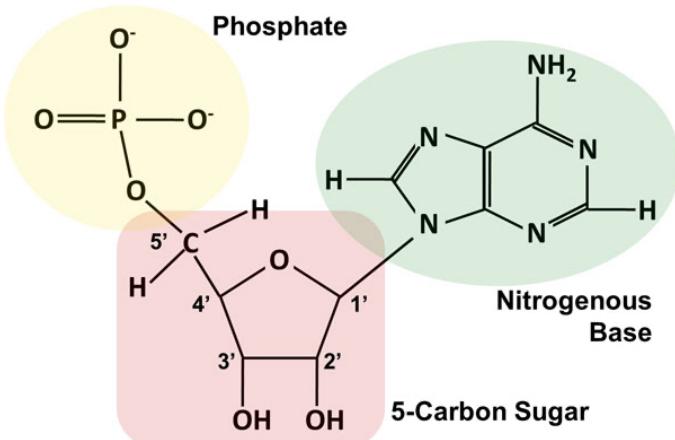
Molekula DNA je glavna nosilka genskih informacij v vseh živih organizmih. Vsak organizem, ki je nastal s spolnim razmnoževanjem, ima drugačen zapis DNA. Glede na genski zapis lahko določimo vrsto organizma in njegove lastnosti. V prokarionskih organizmih, med katere spadajo tudi cianobakterije, DNA v obliki kromosoma prosto plava v tekočem delu citoplazme, imenovanem citosol. Citosol sestoji iz vode in v njej raztopljenih ionov ter ostalih vodotopnih molekul. Poleg DNA v citosolu plavajo tudi ostale celične komponente. Pri evkariontih se DNA nahaja v celičnem jedru – organelu znotraj celice, ki je obdana z membrano. Celično jedro je obdano z dvema membranama. Znotraj jedra se DNA nahaja v obliki kompleksa beljakovin, ki ga ovija DNA, imenovanega kromatin. V času celične delitve se formira v obliko kromosoma. [25]



Slika 5: Zgradba molekule DNA

[16]

Molekula DNA spada med nerazvezane polimere, njen osnovni gradbeni enot je nukleotid (slika 6). Nukleotid sestavlja pentozni sladkor (deoksiribosa), fosfatna skupina in ena izmed štirih dušikovih baz - adenina, gvanina, timina ali citozina (slika 5). Zaporedje nukleotidov v molekuli DNA določa pomen genske informacije. Dušikove baze znotraj vijačnice se med seboj vežejo v parih; citozin z gvaninom in adenin s timinom. Terciarno obliko DNA poznamo kot obliko dvojne vijačnice. Ko se dve vijačnici med seboj povežeta, med dušikovimi bazami nastanejo šibke vodikove vezi, a ker je teh vezi veliko, je povezava med vijačnicama zelo močna. [24]



Slika 6: Zgradba nukleotida

[7]

4.4.3 Morfološke značilnosti kultur cianobakterij in učinkovitost izolacije

Preden lahko opravimo izolacijo DNA, je celice potrebno lizirati (razbiti). Pri lizi ni zagotovljeno, da bomo lahko celični ovoj popolnoma uničili. To pomeni, da bi nekaj DNA ostalo še ujete v celicah, in tako izolacija ne bi bila 100% učinkovita.

Kultura *Microcystis* sp. ima kompleksno sestavo celične stene, ki vključuje lipopolisaharide (LPS), peptidoglikane in določene sladkorje. Sestava celične stene kulture *Synechococcus* sp. je v primerjavi s kulturo *Microcystis* sp. drugačna. *Microcystis* sp. in *Synechococcus* sp. sta podobne sestave, obe sta gram-negativni, vendar pa se lahko ločita v debelini peptidoglikanskega sloja. Razlika v debelini peptidoglikanskega sloja bi lahko imela vpliv na učinkovitost izolacije DNA med omenjenima kulturama.

Raziskavo smo dopolnili z vpeljavo novih kultur, za katere predpostavljamo, da smo njihove celice pripeljali do stanja ene kopije genoma. Tu smo se zgledovali po že podobno opravljeni raziskavi v tujini. Ker je število kopij genoma odvisno od hitrosti rasti, bi doseganje tega stanja omogočilo uporabo kulture za izračune in izolacijo DNA, saj število kopij genoma ne bi bilo več ovira. [26] [29]

Pri kulturi *Anabaena cylindrica* PCC 7122 gre za nitasto obliko bakterij, medtem ko so bakterije kultur *Synechococcus* sp. PCC 7002 in *Microcystis* sp. PCC 7806 enocelične. Pri nitastih bakterijah je težje zagotoviti homogenost vzorca kulture, kar lahko potencialno vpliva na številčne rezultate. [29]

Sklepamo da kokoidna oblika celic kulture *Synechococcus* sp. 7002 omogoča lažjo lizo celic, kar bi naknadno vodilo v bolj učinkovito izolacijo DNA.

5. MATERIALI IN METODE DELA

5.1 Izračuni pričakovane koncentracije DNA

Pod mikroskopom smo prešeli število celic vsake kulture. Po štetju smo ugotovili, da se v 1 mL kulture *Microcystis sp. PCC 7806* nahaja 1 955 000 celic, v 1 mL kulture *Synechococcus sp. PCC 7002* pa 13 718 750 celic. Količino celic obeh kultur na en mL smo pomnožili z maso njunih genomov. Tako smo dobili podatek, da se v 1 mL kulture *Microcystis sp. PCC 7806* nahaja 10,845 ng DNA, v *Synechococcus sp. PCC 7002* pa 50,493 ng DNA. Za izolacijo DNA smo uporabili 15 mL vzorca vsake kulture. To pomeni, da se v 15 mL vzorca kulture *Microcystis sp. PCC 7806* nahaja 162,675 ng DNA, v kulturi *Synechococcus sp. PCC 7002* pa 757,395 ng DNA. DNA smo raztopili v 100 µL raztopini, zato smo obe vrednosti mase DNA v 15 mL vzorcu kulture delili s 100. Tako smo prišli do podatka, da bi po pričakovanih koncentracija DNA v 1 µL kulture *Microcystis sp. PCC 7806* znašala $1,627 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Z isto metodo smo ugotovili, da bi koncentracija DNA v kulturi *Synechococcus sp. PCC 7002* znašala $7,574 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Te vrednosti smo vzeli kot pričakovane koncentracije DNA pred izolacijo.

Tabela 1: Prikaz koncntracije celic kulture *Synechococcus* in *Microcystis* na 1 mL

Vrsta	Sev	Koncentracija celic [celice/mL]*
Microcystis sp.	PCC 7806	$1,96 \times 10^6$
Synechococcus sp.	PCC 7002	$1,37 \times 10^7$

Tabela 2: Prikaz mas genoma cianobakterijskih kultur *Synechococcus* in *Microcystis* na 1 mL

Vrsta	Sev	Masa genoma [ng]*
Microcystis sp.	PCC 7806	$5,55 \times 10^{-6}$
Synechococcus sp.	PCC 7002	$3,68 \times 10^{-6}$

*Podatki o masi genomov in koncentraciji celic cianobakterijskih kultur so bili pridobljeni iz baze podatkov Nacionalnega inštituta za biologijo.

5.2 Filtracija in liza cianobakterijskih kultur

Material:

- Erlenmajerice 250 mL – 1 na kulturo, avtoklavirane
- Filtri VWR® Cell Strainers (100 µm) – 1 na kulturo
- Epice 2 mL – 7 na kulturo
- Pipeti 1 mL in 5 mL
- Nastavki za pipeto 5 mL – 1 na kulturo
- Nastavki za pipeto 1000 uL – 3 na kulturo
- GF/C filtri (glass microfibre filters, premer 50 mm, velikost por 1.2 µm) – 3 na kulturo, avtoklavirani
- Vakumska črpalka in posoda za filtriranje
- PowerWater DNA Bead Tube (iz kita DNeasy PowerWater) – 3 na kulturo
- SDS 10 % (w/v) – 900 uL na kulturo
- DNA remover robčki

5.2.1 Filtracija

Kulti *Microcystis sp. PCC 7806* in *Synechococcus sp. PCC 7002* smo v laminariju prefiltrirali skozi filter VWR Cell Strainer, vsako kulturo zmešali v svoji erlenmajerici in ju z nežnim mešanjem homogenizirali. Del kulture smo prenesli v novo bučko z gojiščem za nadaljnje gojenje. Od vsake kulture smo prenesli 7x 1mL v mikrocentrifugirke – 6 za lizo celic in eno za mikroskopiranje. V mikrocentrifugirki za mikroskopiranje smo dodali 250 uL absolutnega etanola, da smo preprečili razmnoževanje bakterij in jih s tem fiksirali. Preostanek kulture smo namenili filtraciji in izolaciji DNA. Na nastavek vakumske črpalke smo namestili GF/C filter, kulturo nežno premešali in prefiltrirali 15 mL. Filter smo nato zvili v tulec in ga vstavili v 5 mL PowerWater DNA Bead Tube in ga shranili na -20°C. Ta postopek smo ponovili trikrat. Pred vsakim filtriranjem smo pinceto očistili z DNA remover robčki in destilirano vodo.

5.2.2 Liza

Pufer za lizo je puferska raztopina, ki se uporablja za razbijanje celic za uporabo v poskusih molekularne biologije. Večina pufrov za lizo vsebuje puferske in ionske soli za uravnavanje pH in osmolarnosti lizata. Dodali smo 250 uL 10% detergenta SDS (sodium dodecyl sulfate, *slo. natirjev dodecil sulfat*) v epice obeh kultur v končni koncentraciji 2% (w/v). SDS je ionski denaturirajoč detergent. Z njim smo razbili membranske strukture in tako lizirali celice. [3]

5.3 Merjenje koncentracije DNA pred izolacijo

Z laboratorijsko napravo DeNovix (Slika 7) smo s pomočjo spektrofotometrije in fluorometrije (kit Qubit dsDNA HS) izmerili koncentracijo DNA pred izolacijo v liziranih vzorcih. Za obe metodi smo uporabili 1 uL vzorca.

5.3.1 Spektrofotometrija

Koncentracijo prisotne DNA smo izmerili s pomočjo laboratorijske naprave DeNovix z metodo spektrofotometrije. Spektrofotometrija deluje tako, da naprava pošlje belo svetlobo skozi

optično prizmo. Tam se svetloba razdeli na več barvnih spektrov. Vsaka barva ima različno valovno dolžino. V naslednjem koraku naprava skozi vzorec pošlje določen spekter svetlobe in nato izmeri absorbanco. Obstajata dve vrsti spektrofotometra. Poznamo UV vidni spektrofotometer, ki uporabi svetlobni spekter od ultravijoličnega (185–400 nm) in vse do vidnega spektra (400–700 nm). Poleg tega poznamo tudi IR spektrofotometer, ki uporabi svetlobo infra rdečega barvnega spektra (700–15000 nm). V našem eksperimentu smo uporabili UV vidni spektrofotometer. DNA najbolje absorbira ultravijolično svetlobo valovne dolžine 260 nm. Ker pa svetlobo valovne dolžine 260 nm absorbirajo tudi proteini in RNA, je za zanesljivo kvantifikacijo pomembno, da je vzorec DNA čist, kar pomeni, da v njem ni prisotnih ostalih organskih molekul, ki bi lahko motile meritve. [14]

5.3.2 Fluorometrija

Z napravo DeNovix smo uporabili tudi metodo fluorometrije. Fluorometrija je metoda, ki s pomočjo fluoroscentnih barvil izmeri koncentracijo DNA. Za izvedbo te metode smo vzorce cianobakterijskih kultur pipetirali v odpovebne epice, ki prepuščajo vse spekture svetlobe, kajti nekatere plastike določeno svetlobo odbijejo, kar bi nas lahko pripeljalo do netočnih rezultatov meritev. Različna barvila se vežejo na različne molekule in takrat fluorescirajo. Barvilo, ki smo ga dodali vzorcu, se veže na dvostranske molekule DNA in tako izmeri le koncentracijo teh molekul. Uporabili smo reagent, ki je ob stiku z DNA začel svetiti v neon barvi. Med samo pripravo poskusa smo reagent ovili v folijo in ga s tem zaščitili pred svetlobo, saj neon fluoroscentna barvila na dnevni svetlobi začnejo razpadati. DeNovix je izmeril koncentracijo DNA glede na jakost svetlobe, ki sta jo reagent in DNA oddala ob stiku. Bolj kot je svetloba močna, več DNA je prisotne. [4]

5.4 Izolacija DNA

Izolacijo DNA smo izvedli po protokolu in s pripomočki iz kita DNeasy PowerWater Kit (Qiagen). Postopek je opisan v virih (Qiagen, 2020). Vsako kulturo smo izolirali v treh ponovitvah.

5.5 Merjenje koncentracije DNA po izolaciji

Z laboratorijsko napravo DeNovix (Slika 7) smo s pomočjo spektrofotometrije in fluorometrije (kit Qubit dsDNA HS) izmerili koncentracijo DNA po izolaciji. Za obe metodi smo uporabili 1 uL vzorca. Vsak DNA vzorec smo izmerili trikrat za večjo natačnost rezultatov. Rezultati so navedeni v nadaljevanju.



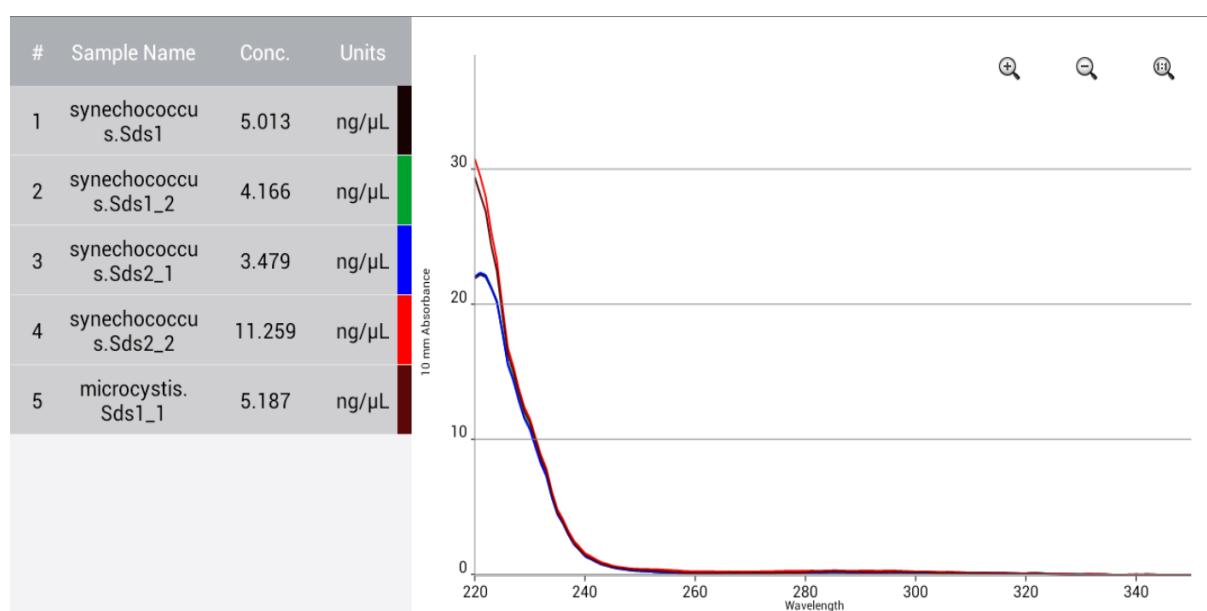
Slika 7: Laboratorijska naprava DeNovix za merjenje koncentracije DNA z metodama spektrofotometrije in fluorometrije

[8]

6. REZULTATI

6.1 Rezultati pred izolacijo DNA

Metoda merjenja koncentracije DNA s spektrofotometrijo pred izolacijo DNA ni bila učinkovita. DNA najbolje absorbira ultravijolično svetlobo dolžine 260 nm, zato smo pričakovali, da bo krivulja najvišja na valovni dolžini 260 nm, vendar ni bila (Graf 1). Najvišja je na 220 nm. S tem ko smo celice lizirali, se je v okolje vzorca sprostilo preveč velikih organskih molekul, kot so proteini, maščobe, klorofil in ostale organske snovi, ki so motile meritve absorbance DNA. Odločili smo se, da bomo za vrednosti pred izolacijo uporabili izračunane pričakovane koncentracije namesto dejansko izmerjenih.



Graf 1: Merjenje koncentracije DNA kulture *Microcystis* in *Synechococcus* s spektrofotometrijo DNA pred izolacijo

6.2 Rezultati po izolaciji DNA

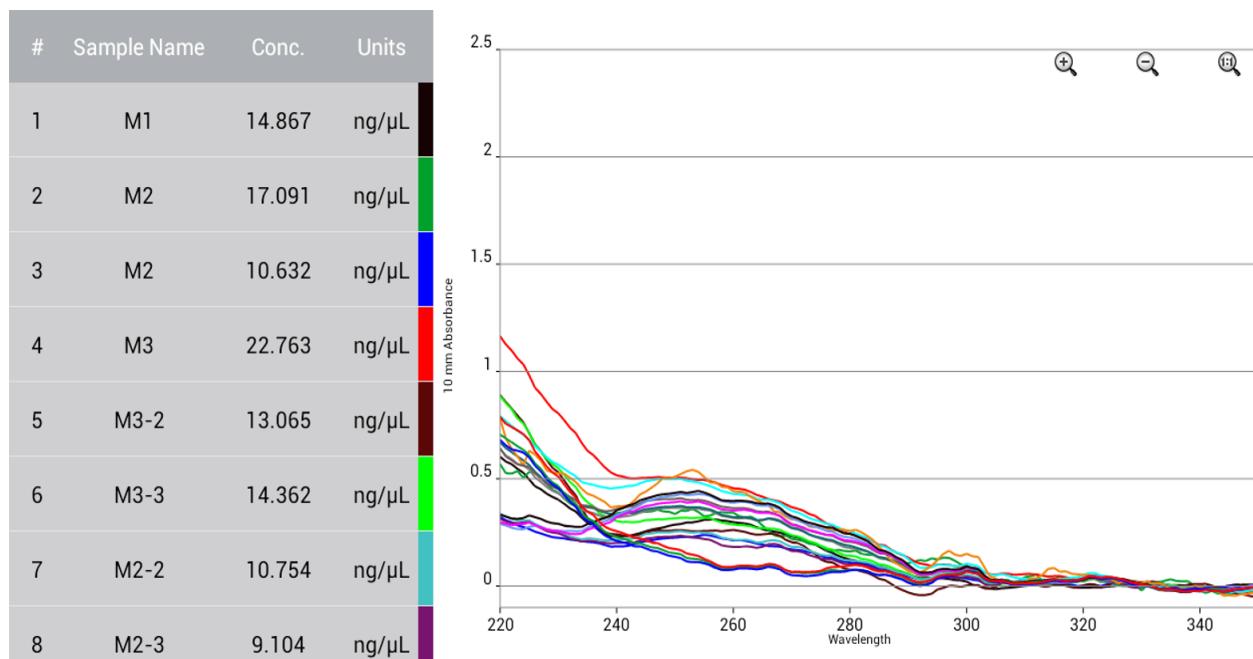
Povprečna izmerjena vrednost koncentracije DNA kulture *Microcystis sp. PCC 7806* znaša 3,26 ng/µL, povprečna koncentracija kulture *Synechococcus sp. PCC 7002* pa 8,46 ng/µL (Tabela 3 in 4). Pri izračuni povprečnih izmerjenih koncentracij smo upoštevali rezultate meritve fluorometrije, ker je v primerjavi s spektrofotometrijo bolj natančna.

Izračunali smo, da je učinkovitost izolacije kulture *Microcystis sp. PCC 7806* bila 223% učinkovita, kulture *Synechococcus sp. PCC 7002* pa 112% učinkovita.

Tabela 3: Prikaz koncentracije DNA kulture *Microcystis* in *Synechococcus* po izolaciji z merilno metodo spektrofotometrije, M – *Microcystis sp. PCC 7806*, S – *Synechococcus sp. PCC 7002*. Prva števka predstavlja tehnično ponovitev izolacije (tri ponovitve), druga pa ponovitev merjenja koncentracije (tri ponovitve).

Št. vzorca	Ime vzorca	Koncentracija
1	M1-1	14,867
2	M1-2	15,845
3	M1-3	16,037
4	M2-1	10,632
5	M2-2	10,754
6	M2-3	9,104
7	M3-1	22,763
8	M3-2	13,065
9	M3-3	14,362
10	S1-1	21,467
11	S1-2	22,077
12	S1-3	18,116
13	S2-1	19,415
14	S2-2	17,56
15	S2-3	19,819
16	S3-1	4,103
17	S3-2	3,806
18	S3-3	4,486

Graf 2 prikazuje izmerjene koncentracije DNA v kulturah *Microcystis sp. PCC 7806* in *Synechococcus sp. PCC 7002* po izolaciji DNA z metodo spektrofotometrije. Opazimo lahko, da so krivulje večine naših vzorcev bolj izrazite v predelu, kjer valovna dolžina svetlobe znaša okoli 260 nm. Na podlagi tega, lahko trdimo, da so tokratni rezultati meritev bolj zanesljivi v primerjavi s prejšnjimi (Graf 1).



Graf 2: Merjenje koncentracije DNA kulture *Microcystis* in *Synechococcus* s spektrofotometrijo po izolaciji DNA

Tabela 4: Prikaz koncentracije DNA kulture *Microcystis* in *Synechococcus* po izolaciji z merilno metodo fluorometrije, M – *Microcystis* sp. PCC 7806, S – *Synechococcus* sp. PCC 7002. Prva števka predstavlja tehnično ponovitev izolacije (tri ponovitve), druga pa ponovitev merjenja koncentracije (tri ponovitve).

Št. vzorca	Ime vzorca	Koncentracija [ng/µL]
1	M1-1	5.331
2	M1-2	pod mejo zaznave
3	M1-3	5.358
4	M2-1	2.258
5	M2-2	2.642
6	M2-3	2.378
7	M3-1	3.530
8	M3-2	3.734
9	M3-3	3.755
10	S1-1	6.765
11	S1-2	7.263
12	S1-3	7.647
13	S2-1	10.554
14	S2-2	9.348
15	S2-3	9.188
16	S3-1	pod mejo zaznave
17	S3-2	pod mejo zaznave
18	S3-3	pod mejo zaznave

6.3 Vpeljava prilagojenih vzorcev kultur cianobakterij

Zaradi nenavadno visokih rezultatov učinkovitosti izolacije DNA iz kultur *Microcystis sp. PCC 7806* in *Synechococcus sp. PCC 7002* v primerjavi s pričakovanimi teoretičnimi izračunanimi rezultati smo sklepali, da je bilo v celicah prisotnih več kopij genoma, zato smo v nadaljnji empirični del raziskave vpeljali dve prilagojeni kulturi cianobakterij. Kulturi pripadata vrstama *Anabaena cylindrica PCC 7122* in *Synechococcus sp. PCC 7002*. Ti dve kulturi sta bili gojeni v posebnih gojiščih, s pomočjo katerih smo dosegli stanje ene kopije genoma. Cianobakterije za svoje delovanje potrebujejo vir fosfata. Znano je tudi, da če bakterijam v gojišču fosfata primanjkuje, bodo pričele razgrajevati svoj DNA z namenom, da bi prišle do svojega vira fosfata. Iz obeh dodatnih kultur cianobakterij smo DNA izolirali potem, ko so rasle na gojišču brez fosfata, zato predpostavljamo, da so razgradile del svoje DNA in imajo celice le eno kopijo genoma. Z novima kulturama smo šli skozi isti protokol dela kot z *Microcystis sp. PCC 7806* in *Synechococcus sp. PCC 7002* v prejšnjem delu zapisa. [26]

Tabela 5: Prikaz koncntracije celic kulture *Synechococcus* in *Anabaena cylindrica* na 1 mL

Vrsta	Sev	Koncentracija celic [celice/mL]*
Synechococcus sp.	PCC 7002	$3,11 \times 10^5$ celic/mL
Anabaena cylindrica	PCC 7122	$8,01 \times 10^6$

Tabela 6: Prikaz mas genoma kulture *Synechococcus* in *Anabaena cylindrica*

Vrsta	Sev	Masa genoma [ng]*
Synechococcus sp.	PCC 7002	$3,68 \times 10^{-6}$
Anabaena cylindrica	PCC 7122	$7,62 \times 10^{-6}$

*Podatki o masi genomov in koncentraciji celic cianobakterijskih kultur so bili pridobljeni iz baze podatkov Nacionalnega inštituta za biologijo.

Tabela 7: Prikaz koncentracije DNA prilagojene kulture *Synechococcus* in *Anabaena cylindrica* po izolaciji z metodo fluorometrije. A – *Anabaena cylindrica* PCC 7122, S – *Synechococcus* sp. PCC 7002. Prva števka predstavlja tehnično ponovitev izolacije (tri ponovitve), druga pa ponovitev merjenja koncentracije (tri ponovitve).

Št. vzorca	Ime vzorca	Koncentracija [ng/µL]
1	A1-1	6.864
2	A1-2	6.5
3	A1-3	6.452
4	A2-1	6.562
5	A2-2	6.52
6	A2-3	5.53
7	A3-1	6.778
8	A3-2	6.589
9	A3-3	6.856
10	S1-1	0.145
11	S1-2	0.158
12	S1-3	0.121
13	S2-1	0.372
14	S2-2	0.281
15	S2-3	0.271
16	S3-1	0.022
17	S3-2	0.031
18	S3-3	pod mejo zaznave

Povprečna izmerjena vrednost koncentracije DNA kulture *Anabaena cylindrica* PCC 7122 znaša 6,654 ng/µL, koncentracija kulture *Synechococcus* sp. PCC 7002 pa 0,1611 ng/µL (Tabela 7). Pri izračunani povprečnih izmerjenih koncentracij smo upoštevali meritve fluorometrije, ker je v primerjavi s spektrofotometrijo bolj natančna.

Učinkovitost izolacije prilagojenih kultur je v pričakovanem rangu do 100%. Izračunali smo, da je učinkovitost izolacije kulture *Anabaena cylindrica* PCC 7122 bila 72,68% učinkovita in

Skeledžija, E. Primerjava učinkovitosti izolacije DNA med različnimi kulturami cianobakterij.
Ljubljana, Gimnazija Vič, 2024

93,60% učinkovita za kulturo *Synechococcus sp. PCC 7002*. Učinkovitost izolacije DNA iz kulture *Synechococcus sp. PCC 7002* je bila za 20,92% bolj učinkovita kot iz kulture *Anabaena cylindrica PCC 7122*.

7. DISKUSIJA

Metoda merjenja koncentracije DNA s spektrofotometrijo in fluorometrijo pred samo izolacijo (Graf 1) DNA ni bila učinkovita, ker se je v okolje vzorca sprostilo preveč drugih snovi, ki so motile merjenje koncentracije. To so na primer proteini, maščobe, klorofil, ostali pigmenti in druge organske molekule. Zaradi nastale težave smo koncentracijo DNA pred izolacijo izračunali na podlagi števila celic, mase genoma in volumna uporabljenih vzorcev (Tabela 1 in Tabela 2).

Dobljeni vrednosti učinkovitosti izolacije DNA sta bili previsoki glede na naša pričakovanja. Vrednost bi morala znašati med 0% in 100%, mi pa smo dobili podatek o 223% in 112% in učinkovitosti izolacije. Izračunane pričakovane koncentracije temeljijo na predpostavki, da ima vsaka celica eno kopijo genoma. Znano pa je, da se lahko v cianobakterijah pojavlja večih kopijah genoma; včasih tudi do 200 ali več kopij. To bi lahko bistveno vplivalo na dejansko koncentracijo DNA pred izolacijo. Števila kopij genoma v sklopu te raziskovalne naloge ne moremo določiti. Glede na rezultate lahko sklepamo, da sta obe kulti verjetno imeli več kot eno kopijo genoma. [27]

Samo na podlagi teh rezultatov hipoteze ne moremo potrditi, ker ne poznamo podatkov o številu kopij genoma obeh cianobakterijskih kultur.

Zaradi nenavadnih rezultatov smo se odločili izračunati učinkovitost izolacije DNA obeh kultur na podlagi predpostavljenega števila različnih kopij genoma (Tabela 8). Pri naših prvotnih izračunih učinkovitosti izolacije smo predpostavljal le eno kopijo genoma. Zanimalo nas je, pri katerem številu kopij genoma bi vsaka izmed kultur imela učinkovitost izolacije med 10% in 100%. To je namreč najbolj verjeten razpon učinkovitosti, ki bi ga pričakovali (Tabela 8).

Tabela 8: Izračunana učinkovitost izolacije DNA iz kulture *Microcystis* in *Synechococcus* ob predpostavljenem različnem številu kopij genoma. Z zeleno so označene vrednosti med 10 in 100 %.

Število kopij genoma	1	2	5	10	20	50	100	200
<i>Microcystis</i> sp. PCC 7806	222,7%	111,4%	44,5%	22,3%	11%	4,5%	2,2%	1,1%
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	111,7%	55,9%	22,3%	11,2%	5,6%	2,2%	1,1%	0,6%

Ob predpostavnki, da so smiselni rezultati samo med 10% in 100%, sklepamo, da je kultura *Microcystis* sp. PCC 7806 verjetno vsebovala od 5 do 20 kopij genoma, kultura *Synechococcus* sp. PCC 7002 pa od 2 do 10 kopij genoma.

Ker se je v raziskavi izkazalo, da je podatek o neznanem število kopij genoma problematičen za pridobitev zanesljivih izračunov, smo empiričnemu delu dodali še poskuse z dvema drugima prilagojenima kulturama. To sta *Anabaena cylindrica* PCC 7122 in *Synechococcus sp.* PCC 7002. Uporabili smo DNA izolirano iz teh kultur gojenih v gojišču brez fosfata, za katere predpostavljamo, da so imele v času izolacije DNA samo eno kopijo genoma na celico. Znano je namreč, da ob odsotnosti fosfata v gojišču cianobakterije začnejo razgrajevati svojo lastno molekulo DNA, z namenom, da bi pridobile vir fosfata. Zaradi tega se število kopij genoma zmanjša. Predpostavljamo, da bo v teh kulturah izračunana učinkovitost izolacije znašala med 10% in 100%.

Izmerili smo, da je učinkovitost izolacije kulture *Anabaena cylindrica* PCC 7122 bila 73% učinkovita in 94% učinkovita za kulturo *Synechococcus sp.* PCC 7002, zato lahko svojo predpostavko o učinkovitosti izolacije potrdimo.

Znano je namreč, da so bakterije na površini celic dodatno podprte s proteinsko plastjo, imenovano S-sloj. Znano je, da imajo bakterije, ki tvorijo kolonije - *Microcystis* sp., debelejši beljakovinski S-sloj primerjavi z enoceličnimi bakterijami, ki kolonij ne tvorijo - *Synechococcus* sp. Omenjena proteinska plast bi lahko zaradi strukturne kompleksnoti dodatno otežila izolacijo DNA. [21] [22] [23]

Iz kulture *Synechococcus sp.* PCC 7002 smo za 21% bolj učinkovito izolirali DNA v primerjavi s kulturo *Anabaena cylindrica* PCC 7122. Do omenjene razlike med učinkovitostima izolacije bi lahko prišlo zaradi večih razlogov. Za manj učinkovito izolacijo DNA kulture *Anabaena cylindrica* PCC 7122 bi lahko bila odgovorna nitasta struktura povezav celic. Celice kulture *Synechococcus sp.* PCC 7002 se namreč nahajajo v obliki kokov. Na podlagi tega predpostavljamo, da je liza celic kulture *Anabaena cylindrica* PCC 7122 manj učinkovita zaradi združenosti celic v niti.

Znano je tudi, da so nekatere cianobakterije sposobne okoli svojih celic sintetizirati kompleksne heteropolisaharide, ki vsebujejo tudi proteine, nukleinske kisline in lipide, ki pa lahko ostanejo pritrjeni na površino celice v obliki kapsularnih polisaharidov ali pa se sprostijo v okolje. Omenjeni polisaharidi bi lahko predstavliali vzrok za manj učinkovito izolacijo. V nadaljnih poskusih bi zato lahko sledili posebnim encimskim protokolom, ki bi ovoj učinkovito razbili.

8. ZAKLJUČEK

Cianobakterije se, tako kot drugi organizmi, med seboj razlikujejo po morfološki zgradbi. Morfološke značilnosti organizmov vplivajo na učinkovitost izolacije DNA. Cilj raziskave je bil primerjati učinkovitost izolacije DNA med morfološko različnima kulturama cianobakterij, *Microcystis sp. PCC 7806* in *Synechococcus sp. PCC 7002*.

Pričakovano koncentracijo DNA v začetni kulturi smo izračunali že vnaprej na podlagi znanih podatkov o velikosti genoma posameznih kultur in koncentraciji celic v kulturi. Ko smo opravili lizo in izolacijo DNA, smo z metodama spektrofotometrije in fluorometrije izmerili aktualno koncentracijo DNA v obeh kulturah.

V raziskavo smo vpeljali dve prilagojeni kulturi cianobakteriji *Anabaena cylindrica PCC 7122* in *Synechococcus sp. PCC 7002*. S stradanjem omenjenih kultur predpostavljam, da imajo celice obeh kultur v sebi le eno kopijo genoma. Učinkovitost izolacije kulture *Synechococcus sp. PCC* zaradi razlik v zgradbi in obliki celic ter povezav med njimi. Z omenjeno metodo smo raziskavo dopolnili in izboljšali kakovost končnih rezultatov.

Raziskavo bi lahko poskušali izboljšati z uporabo novih metod za natančnejše določanje koncentracije DNA pred izolacijo. Namesto uporabe mikroskopskega štetja celic in teoretičnih izračunov, bi lahko preizkusili metode iz drugih raziskav, na primer tekočinsko kromatografijo. [29]

S preizkušanjem navedenih metod bi lahko natančnost in zanesljivost naših rezultatov še dodatno izboljšali.

9. LITERATURA IN VIRI

- [1] Alja, Štraser. **“Cianobakterije in njihovi toksini.”**
<https://www.galenia.si/files/Cianobakterije%20in%20njihovi%20toksini-ilovepdf-compressed.pdf>. (Dostopano 3.3.2024)
- [2] DeNovix. **“Laboratory Equipment | Life Science Technologies,”** February 28, 2024.
<https://www.denovix.com/>. (Dostopano 3.3.2024)
- [3] **“Lysis Buffer.”** In *Wikipedia*, December 23, 2023.
[https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lysis_buffer&oldid=1191372667#SDS_\(sodium_dodecyl_sulfate\)_lysis_buffer](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lysis_buffer&oldid=1191372667#SDS_(sodium_dodecyl_sulfate)_lysis_buffer). (Dostopano 3.3.2024)
- [4] **“Fluorescenčna spektroskopija.”** In *Wikipedija, prosta enciklopedija*, September 28, 2022.
https://sl.wikipedia.org/w/index.php?title=Fluorescen%C4%8Dna_spektroskopija&oldid=5772442. (Dostopano 3.3.2024)
- [5] **“Modrozelene cepljivke.”** In *Wikipedija, prosta enciklopedija*, October 13, 2022.
https://sl.wikipedia.org/w/index.php?title=Modrozelene_cepljivke&oldid=5804937. (Dostopano 3.3.2024)
- [7] **Zgradba nukleotida.** 2017. Prevzeto 18.3.2022 s spletnne strani:
<https://socratic.org/questions/how-do-you-draw-a-nucleotide-and-label-its-three-basic-parts>.
- [8] **Laboratorijska naprava DeNovix za merjenje koncentracije DNA z metodama spektrofotometrije in fluorometrije.** 2022. Prevzeto 19.3.2022 s spletnne strani:
<https://www.denovix.com/>. (Dostopano 3.3.2024)
- [10] Parikh, Amit, and Datta Madamwar. **“Partial Characterization of Extracellular Polysaccharides from Cyanobacteria.”** *Bioresource Technology* 97, no. 15 (October 1, 2006): 1822–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.008>. (Dostopano 3.3.2024)
- [11] US EPA, OW. **“What Are the Effects of HABs.”** Overviews and Factsheets, August 16, 2018.
<https://www.epa.gov/habs/what-are-effects-habs>. (Dostopano 3.3.2024)
- [12] **“Introduction to the Cyanobacteria.”** <https://ucmp.berkeley.edu/bacteria/cyanointro.html>. (Dostopano 3.3.2024)
- [13] **“Cyanobacteria - an Overview | ScienceDirect Topics.”**
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/cyanobacteria>. (Dostopano 3.3.2024)
- [14] Chemistry LibreTexts. **“2.1.5: Spectrophotometry,”** October 2, 2013.
https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_M

[aps/Supplemental Modules \(Physical and Theoretical Chemistry\)/Kinetics/02%3A Reaction Rates/2.01%3A Experimental Determination of Kinetics/2.1.05%3A Spectrophotometry.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94402/) (Dostopano 3.3.2024)

- [15] Saini, Dinesh Kumar, Sunil Pabbi, and Pratyush Shukla. “**Cyanobacterial Pigments: Perspectives and Biotechnological Approaches.**” *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 120 (October 2018): 616–24. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>. (Dostopano 3.3.2024)
- [16] **Zgradba molekule DNA.** Privzeto 3.3.2024 s spletnne strani https://www2.nau.edu/lrm22/lessons/dna_notes/dna_notes.html.
- [17] **Kultura Synechococcus sp. pod mikroskopom.** Privzeto 3.3.2024 s spletnne strani <https://utex.org/products/utex-3154?variant=31945366601818>.
- [18] **Kultura Microcystis sp. pod mikroskopom.** Privzeto 3.3.2024 s spletnne strani <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-1450-14>.
- [19] **Sistematska uvrstitev cianobakterij.** Privzeto 3.3.2024 s spletnne strani https://en.wikipedia.org/wiki/Three-domain_system.
- [20] **Naslovnica.** Privzeto 3.3.2024 s spletnne strani <https://www.deq.ok.gov/state-environmental-laboratory-services/environmental-public-health-information/harmful-algal-blooms/what-are-cyanobacteria/>.
- [21] Jürgens, Uwe J., Cornel Martin, and Jürgen Weckesser. “**Cell Wall Constituents of Microcystis Sp. PCC 7806.**” *FEMS Microbiology Letters* 65, no. 1 (November 1, 1989): 47–51. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0378109789903649>. (Dostopano 3.3.2024)
- [22] Zu, Yao, Sujuan Hong, Chongxin Xu, Weiwei Li, Siyu Chen, and Jianhong Li. “**Cell Wall Surface Layer (S-Layer) Promotes Colony Formation in Microcystis: Comparison of S-Layer Characteristics between Colonial and Unicellular Forms of Microcystis and Function Conformation.**” *Environmental Science and Pollution Research* 27, no. 34 (December 1, 2020): 42254–63. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08254-w>. (Dostopano 3.3.2024)
- [23] Hoiczyk, Egbert, and Alfred Hansel. “**Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope.**” *Journal of Bacteriology* 182, no. 5 (March 2000): 1191–99. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94402/>. (Dostopano 3.3.2024)
- [24] Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. “**The Structure and Function of DNA.**” In *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.* Garland Science, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>. (Dostopano 3.3.2024)

- [25] Cell Science from Technology Networks. “**Prokaryotes vs Eukaryotes: What Are the Key Differences?**” Accessed March 3, 2024. <http://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/prokaryotes-vs-eukaryotes-what-are-the-key-differences-336095>. (Dostopano 3.3.2024)
- [26] Zerulla, K., Ludt, K., & Soppa, J. (2016). **The ploidy level of *synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters.** *Microbiology*, 162(5), 730–739. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000264>. (Dostopano 3.3.2024)
- [27] Griese, M., Lange, C., & Soppa, J. (2011). **Ploidy in cyanobacteria.** *FEMS Microbiology Letters*, 323(2), 124–131. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x>. (Dostopano 3.3.2024)
- [28] **Kultura Anabaena cylindrica pod mikroskopom.** Privzeto 3.3.2024 s spletnne strani https://www.google.com/search?client=safari&sca_esv=a691801792404b30&hl=sl&sxsrf=ACQVn0_r7PepxnHGh0ZZq2bU8hHzC2ebLA:1708889889391&q=Anabaena+cylindrica+PCC+7122&tbo=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwjtxMT2nseEAxWjR_EDHVUVBC4Q0pQJegQICB&biw=1709&bih=975&dpr=2#imgrc=DpEo0xk-RdZ7qM.
- [29] “**Anabaena Cylindrica - an Overview | ScienceDirect Topics.**” <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/anabaena-cylindrica>. (Dostopano 3.3.2024)
- [30] Bruin, Olle M. de, and H. C. Birnboim. “**A Method for Assessing Efficiency of Bacterial Cell Disruption and DNA Release.**” *BMC Microbiology* 16, no. 1 (August 26, 2016): 197. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0815-3>. (Dostopano 3.3.2024)