

## **58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024**

### **KAM ODIDEJO TOKSIČNE CIANOBAKTERIJE POZIMI?**

Raziskovalno področje: EKOLOGIJA Z VARSTVOM OKOLJA

Raziskovalna naloga

Avtorica: Petra Zadravec

Mentorica: prof. Helena Bajec

Somentorica: doc. dr. Tina Eleršek



Maribor, april 2024

## Povzetek

Cianobakterije so fotoavtotrofni prokarionti, ki so eni najbolj ključnih proizvajalcev kisika na Zemlji. Najpogosteje jih lahko opazimo poleti zaradi pojava »cvetenja« oz. njihove velike namnožitve. Nekateri rodovi predstavljajo nevarnost drugim bitjem zaradi sekundarnih metabolitov (cianotoksinov), ki so lahko strupeni. V okviru te raziskovalne naloge smo preučevali prisotnost potencialno toksičnih cianobakterij v Hotinjskem ribniku pozimi oz. v mesecu oktobru, novembru, januarju, februarju in marcu s pomočjo metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR) in kvalitativno z metodo mikroskopije. Naši rezultati so pokazali, da so potencialno toksične bakterije lahko prisotne tudi pozimi, kar je zanimiv nov podatek, posebno v luči globalnega segrevanja, ki vpliva tudi na življenjski cikel cianobakterij.

## Ključne besede

- Cianobakterije
- Prisotnost
- Potencialno toksični rodovi
- Cianotoksi
- Cianobakterijsko cvetenje
- Hotinjski ribnik
- Pozimi
- Vzorčenje fitoplanktona in biofilma
- Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
- Mikroskopija
- Okolje

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentoricama Heleni Bajec in doc. dr. Tini Eleršek za vso pomoč in usmerjanje pri načrtovanju raziskovalne naloge, predvsem pri izvedbi tega eksperimentalnega dela, za spremljanje nastajanja raziskovalne naloge, ves trud, ki je bil vložen z napotki glede pisanja in oblikovanja naloge. Zahvaljujem se za njun žrtvovan čas, da je bila raziskovalna naloga uspešno napisana in zaključena. Zahvaljujem se tudi Nacionalnemu inštitutu za biologijo, čigar oprema in prostori so nam omogočili eksperimentalni del te raziskovalne naloge in odkrivanje novih znanj.

# KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETIČNO OZADJE .....</b>	<b>2</b>
2.1.	<i>Značilnosti cianobakterij.....</i>	2
2.2.	<i>Sistematika cianobakterij .....</i>	4
2.3.	<i>Potencialno toksični redovi cianobakterij v Sloveniji.....</i>	4
2.4.	<i>Cianobakterijsko cvetenje.....</i>	7
2.5.	<i>Cianotoksi.....</i>	8
2.6.	<i>Dosedanje raziskave cianobakterij v Sloveniji .....</i>	10
2.7.	<i>Hipoteze .....</i>	12
<b>3</b>	<b>METODOLOGIJA.....</b>	<b>13</b>
3.1.	<i>Kraj vzorčenja .....</i>	13
3.2.	<i>Časovna dinamika vzorčenja .....</i>	14
3.3.	<i>Merjenje abiotiskih dejavnikov.....</i>	14
3.4.	<i>Kvalitativno vzorčenje fitoplanktona .....</i>	16
3.5.	<i>Kvalitativno vzorčenje biofilma oz. fitobentosa.....</i>	17
3.6.	<i>Izolacija DNK .....</i>	18
3.7.	<i>Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času – qPCR.....</i>	19
3.8.	<i>Mikroskopiranje.....</i>	23
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
4.1.	<i>Abiotski dejavniki.....</i>	24
4.2.	<i>Rodovi cianobakterij - mikroskopija.....</i>	24
4.3.	<i>Koncentracija celic na osnovi qPCR.....</i>	28
<b>5</b>	<b>PRILOGE.....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>33</b>
6.1.	<i>Prisotnost potencialno toksičnih cianobakterij .....</i>	33
6.2.	<i>Številčnost odkritih cianobakterij .....</i>	33
6.3.	<i>Prisotnost rodov .....</i>	34
6.4.	<i>Zaznavnost s testom qPCR .....</i>	35
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČEK.....</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>DRUŽBENA ODGOVORNOST .....</b>	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>38</b>

# KAZALO SLIK

Slika 1: Splošna zgradba cianobakterijske celice (fikobilisom, karboksisom, cianoficin) – originalna slika (neprevedena): (BioRender, 2022) .....	2
Slika 2: Cianobakterijska gošča med cvetenjem (Zupančič, brez datuma) .....	3
Slika 3: Sistematski prikaz kategorizacije cianobakterij – originalna slika z: (Allaf & Peerhossaini, 2022) .....	4
Slika 4: <i>Microcystis</i> (Bayraktar, 2018)      Slika 5: <i>Woronichinia</i> (Chaffin, 2020) .....	5
Slika 6: <i>Planktothrix</i> (Wikipedia, 2023)      Slika 7: <i>Limnothrix</i> (Oemig) .....	5
Slika 8: <i>Anabaena</i> (Wikipedia, 2023)      Slika 9: <i>Aphanizomenon</i> (Baker, 20212).....	6
Slika 10: Prekomerna namnožitev planktonskih cianobakterij v jezeru Radehova (Zupančič, brez datuma) .....	7
Slika 11: Kemijska struktura mikrocistina-LR, nodularina in cilindrospermopsina (Štraser, 2014) .....	9
Slika 12: Kraj vzorčenja (Google Maps, 2023) 2312 Orehova vas, koordinate: 46.467840, 15.677708, z rdečo obrobljeno mesto vzorčenja .....	13
Slika 13: Stalni obiskovalci ribnika (Zadravec, 2022) .....	13
Slika 14: Secchijeva plošča .....	15
Slika 15: Vsebina DNeasy PowerWater kit (QIAGEN, 2024) .....	19
Slika 16: Shema verižne reakcije s polimerazo, originalna shema prevzeta z: (Goldberg, 2019) .....	20
Slika 17: Standardna PCR ploščica, ki smo jo uporabili pri prvem qPCR.....	21
Slika 18: Elektronska pipeta.....	22
Slika 19: PCR naprava, ki smo jo uporabljali za pomnoževanje tarčnih odsekov.....	22
Slika 20: nitke - <i>Planktothrix</i> cf. <i>agardhii</i> (strupena cianobakterija), krogci – diatomeje .....	26
Slika 21: <i>Dolichospermum</i> cf. <i>circinalis</i> (strupena cianobakterija) .....	26
Slika 22: <i>Microcystis</i> .....	26
Slika 23: <i>Planktothrix Agardhii</i> .....	26
Slika 24: Nitke <i>Planktothrix agardhii</i> , krogci doatomeje in več zelenih alg, med njimi <i>Ankistrodesmus</i> (desno zgoraj) in <i>Scenedesmus</i> (desno spodaj). .....	27
Slika 25: Rahlo razpadla kolonija <i>Caelosphaerium</i> .....	27
Slika 26: Hotinjski ribnik in okolica – september 2022.....	31
Slika 27: Priprava kamnov za vzorčenje biofilma .....	31
Slika 28: Laboratorij na NIB .....	32
Slika 29: Pripravljanje ploščice za qPCR.....	32

## **KAZALO GRAFOV**

Graf 1: Graf koncentracij cianobakterij v hladnejših mesecih 2022/2023 .....	29
Graf 2: Graf standardne krivulje - 16s, pridobljen s PCR testom že znanega vzorca .....	29
Graf 3: Graf standardne krivulje – mcyE, pridobljen s PCR testom že znanega vzorca.....	30

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezultati raziskav NIB od leta 1994 do 2022 za vodno telo Hotinja vas GD (brez rezultatov za Hotinjo vas LP) (Eleršek & Zupančič, 2023) .....	11
Preglednica 2: Neuradni rezultati vzorčenja 2023 v poletnem obdobju (Eleršek & Zupančič, 2023) ...	11
Preglednica 3: Rezultati merjenj abiotskih dejavnikov vode - temperature zraka, vode, prosojnosti in izračuni klorofila a.....	24
Preglednica 4: Rezultati mikroskopiranja - prisotnost rodov: rjavo - cianobakterije, zeleno - alge, modro – diatomeje, * = potencialno strupen rod .....	25
Preglednica 5: Prikaz mikroskopsko pregledanih vzorcev od avgusta 2021 do septembra 2023 (NIB podatki), z rdečim okvirčkom so označeni vzorci v okviru te raziskovalne naloge .....	25
Preglednica 6: Koncentracija celic na podlagi rezultatov qPCR, podana v številu celic na mikroliter, rdeče - na podlagi mikroskopiranja.....	28

# 1 UVOD

Cianobakterije so fotoavtotrofni enocelični ali večcelični mikroorganizmi, ki naj bi pred milijardami let močno povečali koncentracijo kisika v Zemeljski atmosferi. Posledično se je popolnoma spremenila sestava življenjskih oblik oz. bitij na Zemlji. (LibreTexts, 2024)

Vendar pa lahko nekatere vrste cianobakterij proizvajajo snovi (cianotoksine), ki so lahko toksične za ljudi. Prevelika dolgotrajna izpostavljenost tem snovem je zelo zaskrbljujoča, predvsem zaradi nevrodgenerativnih in onkoloških učinkov. (Eleršek, 2014) Cianobakterije se lahko ob ustreznih pogojih močno namnožijo in tvorijo goščo (»cvet«) na vodni površini. Za večino vrst so optimalni pogoji za takšno namnožitev poleti, ko je dovolj hranih in so temperature visoke, pretok pa nizek. (Mantzouki, in drugi, 2018)

Do zdaj so bile v Sloveniji cianobakterije raziskovane predvsem poleti zaradi »cvetenja toksičnih cianobakterij«, kar je razvidno iz podatkov slovenske spletne platforme ciano.slo. (Zupančič, brez datuma)

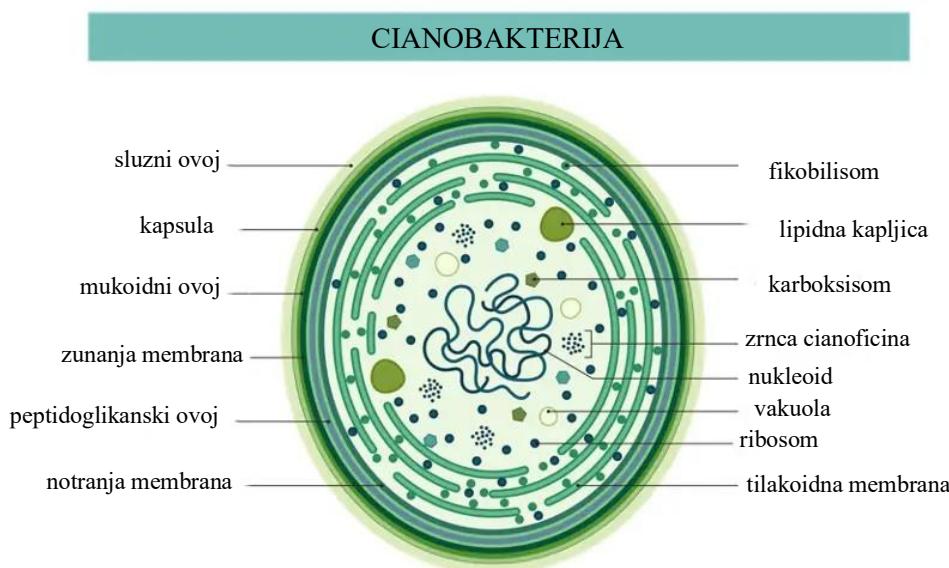
Namen naše raziskovalne naloge je bilo ugotoviti, kaj se dogaja s cianobakterijami (potencialno toksičnimi rodovi) pozimi; ali popolnoma izginejo oz. odmrejo ali jih je morda možno zaznati z različnimi metodami kot sta mikroskopija in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR). Pri raziskovalni nalogi smo se osredotočali predvsem na dokazovanje njihove prisotnosti, vendar smo žeeli s pomočjo metode mikroskopije tudi taksonomsko identificirati najpogosteje rodove.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

### 2.1. Značilnosti cianobakterij

Cianobakterije so prokariotski organizmi, ki izvajajo oksigeno fotosintezo in vsebujejo fotosintetske pigmente značilne za alge (klorofil a), poleg tega pa tudi za cianobakterije specifične pigmente (fikocianine), ki jim dajejo značilno modro-zeleno barvo, ciano oz. modrozelene alge, ter fikoetrine, ki jim dajejo škrlatno barvo. Predvideva se, da izvor cianobakterij sega v predkambrij in so zato cianobakterije najstarejši (živi) fosili, stari 3,5 milijarde let. (Schopf & Walter, 1982)

Cianobakterije lahko najdemo v vseh okoljih, tako v celinskih kot tudi v slanih. (Eleršek, 2014) Cianobakterije so lahko enocelični ali večcelični organizmi, slika spodaj (Slika 1) pa prikazuje splošne značilnosti cianobakterijske celice.



Slika 1: Splošna zgradba cianobakterijske celice (fikobilisom<sup>1</sup>, karboksisom<sup>2</sup>, cianoficin<sup>3</sup>) – originalna slika (neprevedena): (BioRender, 2022)

Delijo si značilnosti z bakterijami, nekatere vrste imajo možnost fiksiranja atmosferskega dušika v določenih pogojih. Imajo celično steno, podobno Gram-negativnim bakterijam,

<sup>1</sup> Fikobilisom - agregati proteinov, ki pobirajo svetlobo, pritrjeni na stromalno stran tilakoidnih membran cianobakterij in rdečih alg

<sup>2</sup> Karboksisom - poliedrični mikrokompartiment, ki deluje kot modul za fiksacijo CO<sub>2</sub> v celicah cianobakterij in nekaterih bakterij

<sup>3</sup> Cianoficin - polimer, sestavljen iz aminokislin, ki jih proizvajajo cianobakterije, s številnimi potencialnimi uporabami

sestavljeni iz lipopolisaharidov. (Suthers & Rissik, 2009) Hkrati pa so fotoavtotrofni organizmi, kar je njihova ključna skupna lastnost z evkarionskimi algami. Povezane so tako s prokarionti kot z evkarionskimi algami, zato so jih včasih uvrščali med alge. Danes jih uvrščamo med prokarionte, obstajata pa dva vzporedna sistema klasifikacije – *botanična klasifikacija* in *mikrobiološka nomenklatura*. (Eleršek, 2014)

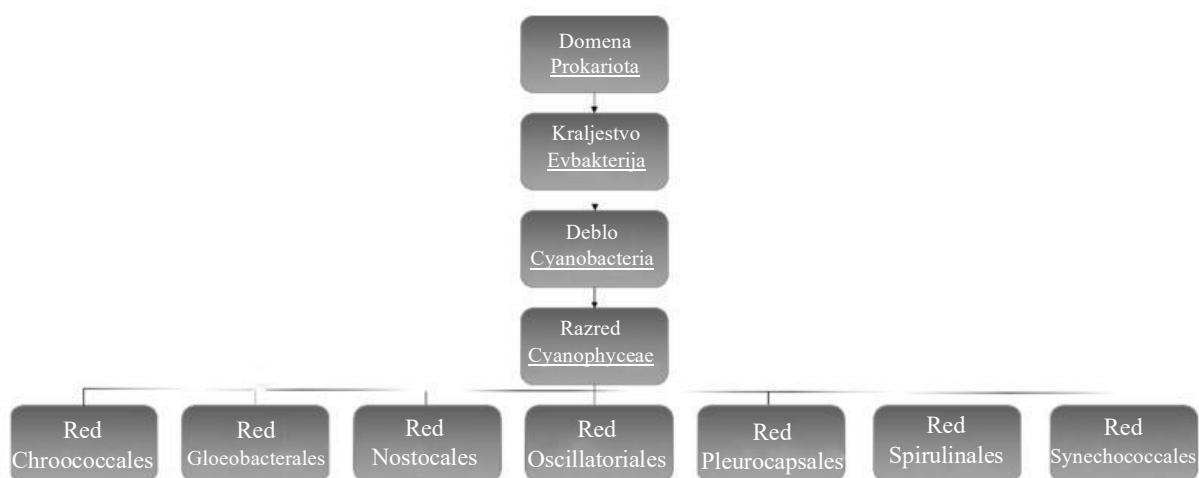


Slika 2: Cianobakterijska gošča med cvetenjem (Zupančič, brez datuma)

Prej omenjene cianobakterije, ki imajo možnost fiksacije dušika, imajo tudi nekoliko drugačen življenjski cikel od ostalih vrst – dodano imajo fazo vezave dušika. Model tega cikla sta uvedla Hense in Beckmann ter vključuje štiri stopnje življenjskega cikla; vegetativno fazo brez vezave dušika, vegetativno fazo vezave dušika, fazo mirovanja in fazu nove rasti. Poletne koncentracije cianobakterij v vodi (njihova številčnost) se v tem modelu spreminjajo. Ugotovitve kažejo, da so te spremembe posledica svetlobe, temperature in raztopljenega anorganskega dušika. V ta model ni vključen vpliv fosforja na rast cianobakterij, vendar je tudi ta ključen. (Hieronymus, in drugi, 2021)

## 2.2. Sistematika cianobakterij

Cianobakterije glede na pojavnost v vodnih telesih delimo na planktonske in bentoške. Planktonske cianobakterije so tiste, ki lebdijo v vodi, bentoške pa so tiste, ki živijo v stiku s podlago. Število vseh vrst še ni znano, ocenjeno je na približno 8000, od tega pa jih je znanih in kategoriziranih 5185. Kategorizirane so v 9 redov: *Chroococcales*, *Gloeobacterales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales*, *Spiruliniales* in *Synechococcales*. (Allaf & Peerhossaini, 2022)



Slika 3: Sistematski prikaz kategorizacije cianobakterij – originalna slika z: (Allaf & Peerhossaini, 2022)

## 2.3. Potencialno toksični redovi cianobakterij v Sloveniji

Potencialno toksični redovi v Sloveniji so opisani v nadaljevanju (Eleršek, 2014):

Chroococcales:

Za ta red so značilne majhne celice v premeru nekaj mikrometrov brez posameznih mukoznih ovojev. Običajno so organizirane v kolonije, ki jih je mogoče videti tudi s prostim očesom. So modro-zelenih barv, čeprav pod mikroskopom običajno izgledajo rjavo ali črno.

Rodovi, značilni za Slovenijo: *Microcystis* (Slika 4) in *Woronichinia* (Slika 5)



Slika 4: *Microcystis* (Bayraktar, 2018)



Slika 5: *Woronichinia* (Chaffin, 2020)

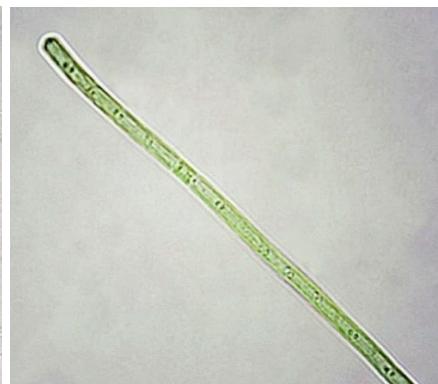
#### Oscillatoriales:

Za red Oscillatoriales so značilne nitaste celice, ki se v obliki vlaken nahajajo v kolonijah. So modro/rjavo-zelene barve. Filamenti so sestavljeni iz trihomov<sup>4</sup>. Konica trihoma niha. Zanje je značilno drsenje proti primernemu svetlobnemu viru.

Rodovi, značilni za Slovenijo: *Planktothrix* (Slika 6) in *Limnothrix* (Slika 7)



Slika 6: *Planktothrix* (Wikipedia, 2023)



Slika 7: *Limnothrix* (Oemig)

<sup>4</sup> večcelična struktura, ki je sestavljena iz verig celic in tvorijo "lasu podobno" strukturo

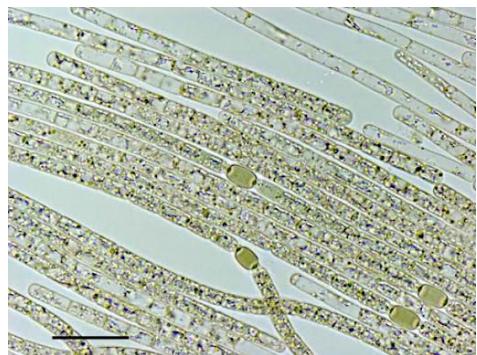
## Nostocales:

Filamenti se lahko pojavijo posamezno ali v kolonijah ter so prosto-plavajoči oz. v občutljivem sluznem ovoju. Trihomi so lahko ravni, ubočeni ali nepravilno usločeni. Lahko so enake debeline ali proti koncu zašiljeni. Celice so po navadi okrogle ali sodčaste oblike.

Rodovi, značilni za Slovenijo: *Anabaena* (*Dolichospermum*) (Slika 8) in *Aphanizomenon* (Slika 9)



Slika 8: *Anabaena* (Wikipedia, 2023)



Slika 9: *Aphanizomenon* (Baker, 20212)

## 2.4. Cianobakterijsko cvetenje

Cianobakterijsko cvetenje je splošno uporabljen izraz za nastanek gošče cianobakterij na vodni površini. Ta izraz ni popolnoma točen, saj cianobakterije ne cvetijo v ožjem pomenu besede, pomeni pa prekomerno namnožitev, ki jo lahko opazimo kot zeleno, rjavo ali rdečkasto plast na površini stoečih voda ali počasneje tekočih voda. Za večino prekomernih namnožitev so odgovorne planktonske vrste cianobakterij (Slika 10). (Zupančič, brez datuma)

Procesi, ki naj bi bili vključeni v nastanek gošče oz. prekomernega razmnoževanja teh mikroorganizmov, še niso popolnoma razumljeni. Nedavne študije in opazovanja kažejo, da ima življenski cikel cianobakterij pomembno vlogo pri določanju časa, trajanja in obsega cvetenja.



Slika 10: Prekomerna namnožitev planktonskih cianobakterij v jezeru Radehova (Zupančič, brez datuma)

Do tega pojava pride največkrat v poletnih mesecih pri visokih temperaturah, saj takrat cianobakterije najbolje uspevajo zaradi dobrih pogojev za fotosintezo – njihov temperaturni optimum sega med  $25^{\circ}\text{C}$  in  $30^{\circ}\text{C}$ , te temperature pa so značilne za poletne mesece. (Lurling, Eshetu, Faassen, Kosten, & Huszar, 2013) Vendar potrebujemo za razmnoževanje tudi hraniila. Povišano vsebnost hranilnih snovi v vodi imenujemo **eutrofikacija**. S tem mislimo predvsem dušikove in fosforjeve spojine, ki pridejo v vodo z izpiranjem gnojil s kmetijskih površin, kanalizacije ali drugih odpadnih voda. (Zupančič, brez datuma)

## 2.5. Cianotoksini

Cianotoksini so sekundarni metaboliti nekaterih rodov cianobakterij. V vodo se sprostijo ob razpadu celice. Najbolj raziskana je skupina mikrocistinov. Čeprav so planktonske vrste tiste, ki jih največkrat povežemo s cvetenjem in toksičnostjo voda, pa lahko tudi bentoške vrste proizvajajo toksine, kot so anatoksini. (Lopes & Vasconcelos, 2011)

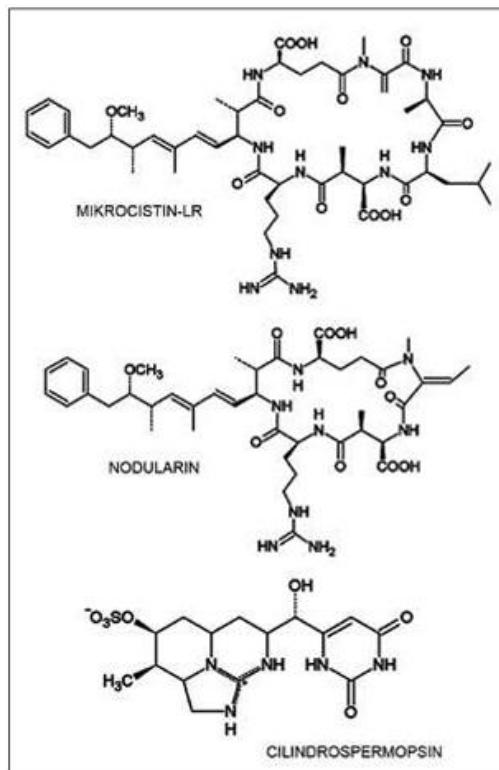
Cianotoksine lahko razvrščamo glede na njihovo delovanje pri sesalcih. Najpogostejsi vključujejo hepatotoksine in nevrotoksine. Hepatotoksini vplivajo predvsem na jetrne celice. Sem sodijo mikrocistini in nodularini. Mikrocistini so ciklični heptapeptidi, ki obstajajo v številnih oblikah, nodularini pa so pentapeptidi, oboji pa uničijo jetrne celice in lahko povzročijo smrt organizma. (Wiki FKKT, 2010) Med nevrotoksine pa spadajo saksitoksini in anatoksini. Saksitoksini se največkrat kopičijo v školjkah in so zelo strupeni. Povzročajo mišično paralizo in posledično smrt organizma. (ACS Chemistry for Life, 2023) Anatoksini so značilni za celinsko vodno okolje, vplivajo pa na skoraj vse pomembnejše organe organizma, podobno povzročijo paralizo trupa in vodijo v smrt organizma. (Lopes, Silva, & Vasconcelos, 2022) Obstajajo še druge skupine toksinov, npr. citotoksini (strupeni za celice) in dermatotoksini (vplivajo na kožo).

En cianobakterijski rod lahko proizvaja enega ali več različnih cianotoksinov. Po dosedanjih podatkih so v Sloveniji mikrocistini značilni predvsem za cianobakterije rodov *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Limnothrix*, *Woronichinia* in *Aphanizomenon*. Anatoksini in saksitoksini pa so značilni predvsem za *Anabaeno* in *Aphanizomenon*. (Eleršek, Potencialno toksične cianobakterije v celinskih vodah Slovenije, 2014)

V Evropi obstajajo evidence o povezavah smrti živali (psov) in cianotoksini, na svetu pa so zabeleženi tudi primeri smrti ljudi. Eden bolj znanih primerov je dogodek iz Brazilije leta 1996, ko je voda, ki je vsebovala visoke koncentracije cianotoksinov, povzročila smrt več desetih ljudi.<sup>5</sup> (Carmichael, in drugi, 2001)

---

<sup>5</sup> 116 od 131 bolnikov je po rutinskem zdravljenju s hemodializo februarja leta 1996 doživel motnje vida, slabost in bruhanje. Nato se je pri 100 bolnikih razvila akutna odpoved jeter, od teh jih je 76 umrlo. Decembra 1996 je bilo mogoče 52 smrti pripisati skupnemu sindromu, ki se zdaj imenuje Caruarujev sindrom, povzročenem zaradi prisotnosti velikih količin mikrocistina v vodi, uporabljeni za dializo jeter. (Carmichael, in drugi, 2001)



Slika 11: Kemijkska struktura mikrocistina-LR, nodularina in cilindrospermopsina (Štraser, 2014)

## **2.6. Dosedanje raziskave cianobakterij v Sloveniji**

Cianobakterije so manjši del fitoplanktonske združbe, ki je vključena v nacionalni monitoring voda, ki ga izvaja Agencija za okolje. Podatki o cianobakterijah (9 lokacij) so shranjeni v bazi podatkov, ki jih (proti plačilu) lahko pridobimo od Agencije za okolje. Ti podatki niso povezani z informacijami o možni strupenosti niti s tem, ali je šlo za pojav »cvetenja«, ki je viden na površini vodnega telesa. Da bi bili podatki občanom bolje dostopni, predvsem podatki o morebitnih pojavih toksičnih cianobakterij, na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) zbirajo vse dosedanje podatke o toksičnosti cianobakterij na spletni platformi ciano slo ([www.ciano.si](http://www.ciano.si)), tudi s pomočjo državljanov. Namen platforme je tudi, da se preuči obsežnost tega pojava v vseh predelih Slovenije, predvsem v tistih, ki so zaznamovani s poletnimi »cvetenji« evtrofnih jezer.

Večina raziskav je vezanih na poletje (ko je »cvet« viden), ni pa še raziskano, kaj se s cianobakterijami dogaja pozimi. V Sloveniji je množično pojavljanje cianobakterij zaznano v Blejskem jezeru, medtem ko za evtrofne zadrževalnike »zimskih« podatkov ni. Rodovi, ki se pojavljajo v Sloveniji, so pogosti tudi v drugih državah; na primer na Poljskem, kjer se v evtrofnem jezeru Luboński kljub nizkim temperaturam (3°C, podobno kot pri nas) dominantno pojavljajo rodovi *Planktothrix*, *Limnothrix* in *Aphanizomenon*. (Wejnerowski, Rzymski, Kokociński, & Meriluoto, 2018)

Dejstvo, da obstaja možnost cvetenja pozimi, pomeni, da cianobakterije pozimi ne izginejo. Glede na to, da so bile v raziskavah za »cvetenje« odgovorne vrste, ki jih lahko zasledimo tudi v Sloveniji, nas je zanimalo, ali lahko do tega pojava pride tudi v naših jezerih. Doslej takšnih raziskav oz. dlje trajajočih spremmljanj prisotnosti potencialno toksičnih rodov cianobakterij pozimi v Sloveniji še ni bilo (razen Blejskega jezera).

V prejšnjih letih je bilo v jezeru oziroma ribniku Hotinja vas zaznanih veliko potencialno toksičnih cianobakterij, nekaj tudi že zgoraj omenjenih rodov – *Microcystis*, *Woronichinia*, *Aphanizomenon* in mnogo drugih (Preglednica 1, Preglednica 2).

*Preglednica 1: Rezultati raziskav NIB od leta 1994 do 2022 za vodno telo Hotinja vas GD (brez rezultatov za Hotinjo vas LP) (Eleršek & Zupančič, 2023)*

Vodno telo	Datum	Tip vzorca	Cianotoksin	Metoda	Koncentracija cianotoksinov	Toksičnost (LD <sub>100</sub> )	Koncentracija genov	Potencialno toksične vrste (zaznane z mikroskopijo)
Hotinja vas LP	11. 10. 1994	plankton	MC	HPLC, testi na miših	3430 µg/g liof.	50 mg i.p./kg miši		<i>M. aeruginosa</i> (100%)
	17. 2. 1995	plankton	MC	HPLC, testi na miših	860 µg/g liof.	500 mg i.p./kg miši		<i>M. aeruginosa</i> (100%)
	18. 6. 1997	plankton	MC	HPLC	2156 µg/g liof.			<i>M. aeruginosa</i> (100%)
	4.09. 1997	plankton	MC	HPLC	778 µg/g liof.			<i>M. aeruginosa</i> (100%)
	1. 10. 1997	plankton	MC	HPLC	2968 µg/g liof.			<i>M. aeruginosa</i> (100%)
Hotinja vas GD (gasilski dom)	11. 10. 1994	plankton	MC	HPLC, testi na miših	1278 µg/g liof.	250 mg i.p./kg miši		<i>M. aeruginosa</i> (95%), <i>A. flos-aquae</i> (5%)
	17. 2. 1995	plankton	MC	HPLC, testi na miših	1310 µg/g liof.	1000 mg i.p./kg miši		<i>M. aeruginosa</i> (100%)
	18. 6. 1997	plankton	MC	HPLC	96,2 µg/g liof.			<i>D. solitarium</i> (40%), <i>A. flos-aquae</i> (40%), <i>M. aeruginosa</i> (15%), <i>D. flos-aquae</i> (5%)
	25. 8. 2021	plankton	MC	LC-MS/MS, qPCR	526 ng/L		pozitivno	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i>
	25. 8. 2021	plankton	ANA	LC-MS/MS	1000 ng/L			
	25. 8. 2021	biofilm	MC	LC-MS/MS, qPCR	72,4 ng/g s.t.		nizko	
	25. 8. 2021	biofilm	ANA	PCR			zelo nizko	
	26. 4. 2022	biofilm	MC	LC-MS/MS	1500 ng/g s.t.			
	23. 5. 2022	plankton	MC	LC-MS/MS	9466,7 ng/L			<i>M. viridis</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i>
	23. 5. 2022	plankton	ANA	LC-MS/MS	1206 ng/L			
	23. 5. 2022	biofilm	MC	LC-MS/MS	36.400 ng/g s.t.			
	23. 5. 2022	biofilm	ANA	LC-MS/MS	200 ng/g s.t.			
	20. 6. 2022	plankton	MC	LC-MS/MS	4660 ng/L			<i>M. viridis</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i>
	20. 6. 2022	biofilm	MC	LC-MS/MS	15.000 ng/g s.t.			
	20. 7. 2022	plankton	MC	LC-MS/MS	4720 ng/L			<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>D. solitarium</i> , <i>D. flos-aquae</i> , <i>Woronichinia</i> sp.
	20. 7. 2022	biofilm	MC	LC-MS/MS	23.200 ng/g s.t.			
	20. 7. 2022	biofilm	ANA	LC-MS/MS	140 ng/g s.t.			
	16. 8. 2022	plankton	MC	LC-MS/MS	2126 ng/L			<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>P. agardhii</i> (malo)
	16. 8. 2022	plankton	ANA	LC-MS/MS	34 ng/L			
	21. 9. 2022	plankton	MC	LC-MS/MS	1494 ng/L			<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i>

*Preglednica 2: Neuradni rezultati vzorčenja 2023 v poletnem obdobju (Eleršek & Zupančič, 2023)*

ribnik Hotinja vas (gasilski dom)	6. 4.2023	<i>A. flos-aquae</i>
	23. 5.2023	<i>M. flos-aquae</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>Ps. cf. catenata</i>
	16. 6.2023	<i>M. flos-aquae</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>Pl. agardhii</i>
	18. 7.2023	<i>Dolichospermum</i> sp., <i>Pl. agardhii</i> , <i>Microcystis</i> sp., <i>Ps. catenata</i> (redko), <i>Aphanizomenon</i> sp. (redko), <i>D. solitarium</i> (redko)
	23. 8.2023	<i>Pseudanabaena</i> sp., <i>M. flos-aquae</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>Oscillatoria</i> sp.
	8. 9. 2023	<i>D. solitarium</i> , <i>D. flos-aquae</i> , <i>M. aeruginosa</i>

## **2.7. Hipoteze**

### **Hipoteza 1:**

Na podlagi raziskave o cianobakterijah, ki je bila izvedena na Poljskem (zimska prekomerna namnožitev z rodovi, prisotnimi tudi pri nas) (Wejnerowski, Rzymski, Kokociński, & Meriliuoto, 2018), pričakujemo, da na podlagi podobne geografske lege, sovpadajočega podnebja in podobnega trofičnega stanja jezera tudi pri nas potencialno toksične cianobakterije pozimi ne izginejo oz. odmrejo.

### **Hipoteza 2:**

Glede na temperaturni optimum cianobakterij, ki sega med 25°C in 30°C, pričakujemo, da bo največ cianobakterij v mesecu oktobru, ko bodo temperature najvišje.

### **Hipoteza 3:**

Na podlagi predhodnih raziskav Hotinjskega ribnika izvedenih s strani NIB v poletnem času, v katerih so ugotovili, da med potencialno toksičnimi rodovi cianobakterij najbolj prevladuje rod *Microcystis*, tudi v naši raziskavi pričakujemo, da bo ta rod prisoten tudi pozimi.

### **Hipoteza 4:**

Pričakujemo, da cianobakterij kljub njihovi prisotnosti v Hotinjskem ribniku zaradi manjšega celokupnega števila celic ne bomo zaznali s kvalitativno analizo opazovanja z mikroskopom.

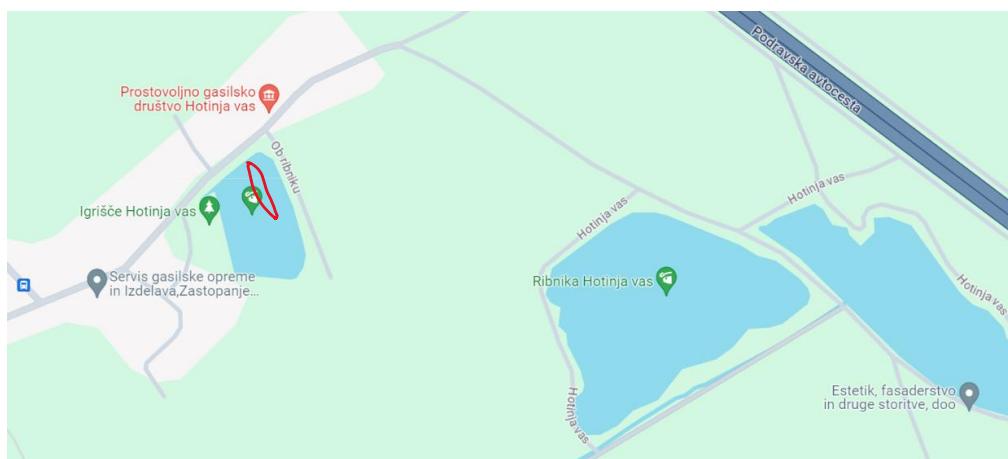
### **Hipoteza 5:**

Zaradi večje občutljivosti testa qPCR na genetski material cianobakterij v Hotinjskem ribniku pričakujemo, da bomo cianobakterije s to analizo zaznali.

## 3 METODOLOGIJA

### 3.1. Kraj vzorčenja

Vzorčenje smo opravljali v ribniku v Hotinji vasi (občina Hoče-Slivnica) (Slika 12). Ribnik leži tik ob gasilskem domu prostovoljnega gasilskega društva Hotinja vas. V bližini ležita še dva večja ribnika z enakim imenom. Hotinjski ribnik v površini približno 1 ha in je nastal kot vodni zbiralnik, ki je v preteklosti omogočal napajanje živine, služil pa je tudi kot zbiralnik vode za primer požarne nevarnosti, danes ga uporabljajo predvsem za ribarjenje. Naseljen je z avtohtonimi vrstami rib, okoli njega se nahaja veliko ptic (Slika 13). Predstavlja tudi habitat ogroženim vrstam dvoživk, zato zanj velja varstveni režim zoološke naravne dediščine. Na sredini ribnika je majhen otok z vrbo, v bližini ribnika pa tudi otroško igrišče. Okoli ribnika so postavljene klopi. (T., 2021)



Slika 12: Kraj vzorčenja (Google Maps, 2023) 2312 Orehova vas, koordinate: 46.467840, 15.677708, z rdečo obrobljeno mesto vzorčenja



Slika 13: Stalni obiskovalci ribnika (Zadravec, 2022)

## **3.2. Časovna dinamika vzorčenja**

Vzorčili smo v hladni polovici leta, natančneje v oktobru in novembru 2022, nato pa še v januarju, februarju in marcu leta 2023. Vzorčili smo enkrat mesečno, vsakič po istem protokolu (navedeno v 3.3.-3.5.).

## **3.3. Merjenje abiotskih dejavnikov**

### *3.3.1. Merjenje temperature vode in zraka*

Pripomoček:

- Elektronski termometer Vernier

Z elektronskim termometrom smo najprej izmerili temperaturo zraka, nato pa še temperaturo vode.

### *3.3.2. Meritev prosojnosti vode*

Pripomoček:

- Secchijeva plošča (Slika 14)

Prosojnost vode se določa s pomočjo Secchijeve globine<sup>6</sup>. Merjenje Secchijeve globine po SIST EN ISO 7027:2000 je način merjenja prosojnosti, oziroma motnosti vode. (Majcen, 2016)

---

<sup>6</sup> Maksimalna globina, do katere je še vidna bela plošča



Slika 14: Secchijeva plošča

### **3.4. Kvalitativno vzorčenje fitoplanktona**

Fitoplankton je sestavljen iz številnih vrst alg in cianobakterij. S kvalitativnim vzorčenjem si pripravimo vzorce, ki jih nato uporabimo za mikroskopiranje in za izolacijo DNK – kako se uporabljajo ti vzorci, je opisano spodaj.

#### **Material:**

- 50 ml centrifugirke (konusne ali samostoječe)
- petrijevke
- parafilm
- 1000 ml reagenčne steklenice - avtoklavirane
- filtrirni papir GF/C
- filtrirna nuča
- papirnate brisačke
- rokavice
- hladilna posoda (izolirana posoda z ledom)
- zamrzovalnik

Najprej smo si nadeli rokavice in zajeli vodo iz jezera na način, da smo potopili celotno steklenico prib. 10 – 20 cm pod vodo in počakali, da se napolni. Steklenico smo nato zaprli in postavili v škatlo za transport. Če je bila voda v steklenici preveč bistra, smo napolnili še drugo steklenico, da smo imeli dovolj vzorca. Steklenico smo nato prevažali v termo izolirani posodi z ledom. V laboratoriju smo vzorec nežno premešali (nekajkrat obrnili steklenico na glavo) in prefiltrirali tako, da se je filter nekoliko obarval zeleno, pri tem pa smo si zapisali volumen prefiltriranega vzorca. Filter smo dali v sterilno plastično petrijevko in zamrznili (-20°C). Petrijevko smo pred transportom preventivno zavili s parafilmom, da ne bi prišlo do kontaminacije vzorca.

### **3.5. Kvalitativno vzorčenje biofilma oz. fitobentosa**

Vzorčenje biofilma smo uporabili za pridobitev vzorcev s cianobakterijami s kamnov ali drugih predmetov iz Hotinjskega ribnika. Te vzorce smo nato uporabili za qPCR.

#### **Material:**

- fotografске kadičke
- 50 ml centrifugirke (konusne ali samostoječe)
- robčki DNA remover ali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- destilirana voda
- absolutni etanol
- alu folija
- vrečke za smeti
- papirnate brisačke
- rokavice

Pripravili smo si laboratorijsko kadičko, ki je bila predhodno očiščena z detergentom in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodikovim peroksidom ter sprana z destilirano vodo in pokrita z aluminijasto folijo. Vanjo smo nalili 50 ml destilirane vode. Nadeli smo si rokavice in iz obrobja jezera vzeli približno 5 kamnov, ki smo jih najprej položili na aluminijasto folijo, s katero je bila pokrita kadička, ter pustili, da se voda odcedi. Ocenili smo pokritost kamnov z organizmi glede na barvo ter jih nato sprali v prej pripravljeni destilirani vodi. Vzorec 10 ml vode, sedaj polne z organizmi, smo vlili v centrifugirko ter vzorcu dodali 40 ml (do oznake 50 ml) 96% etanola. Vzorec smo v hladilni torbi prenesli do laboratorija in ga zamrznili na -20°C.

### **3.6. Izolacija DNK**

Izolacija DNK je potrebna za nadaljnjo uporabo vzorcev pri metodi qPCR. Za izolacijo smo uporabili protokol: *DNeasy PowerWater Kit for the isolation of genomic DNA from filtered water samples, including turbid water*<sup>7</sup>.

#### **Material:**

- Centrifuga za 15 ml epruvete ( $\leq 4000 \times g$ )
- Filtrirni lijaki za večkratno uporabo
- Filtrirne membrane
- Mikrocentrifuga ( $13.000 \times g$ )
- Pipeta – 1ml konica
- Vortex-Genie® 2 Vortex - stresalec
- Adapter Vortex (kat. št. 13000-V1-5 ali 13000-V1-15)
- DNeasy PowerWater kit – raztopine PW1, PW3, PW4, IRS, spin kolone, zbiralne epruvete, etanol (Slika 15)

#### **Postopek:**<sup>8</sup>

Najprej smo odmrznili filter in v epruveto dodali 1 ml raztopine PW1. Nato smo dali epruveto v Vortex za 5 minut in nato centrifugirali  $\leq 4000 \times g$  1 min. Supernatant – tekočino smo nato prenesli v čisto 2 ml epruveto. Ponovno smo centrifugirali pri  $13.000 \times g$  1 min, nato pa smo tekočino prenesli v čisto epruveto in dodali 200  $\mu l$  raztopine IRS ter premešali in inkubirali pri  $2-8^{\circ}C$  5 min. Nato smo centrifugirali pri  $13.000 \times g$  1 min ter ponovili postopek prenašanja supernatanta. Dodali smo 650  $\mu l$  raztopine PW3 in premešali. Raztopino smo nato dali v MB Spin kolono<sup>9</sup> in centrifugirali pri  $13.000 \times g$  1 min ter postopek ponavljali, dokler nismo obdelali vsega supernatanta. Filter MB Spin kolone smo postavili v zbiralno epruveto in dodali 650  $\mu l$  raztopine PW4 ter ponovno centrifugirali. Dodali smo 650  $\mu l$  etanola ter dvakrat ponovili

---

<sup>7</sup> DNeasy PowerWater Kit za izolacijo genomske DNK iz filtriranih vzorcev vode, vključno z motno vodo

<sup>8</sup> Pri delu smo upoštevali previdnostne ukrepe, navedene v protokolu.

<sup>9</sup> Spin kolone omogočajo komercialno ekstrakcijo DNK v laboratorijih za molekularno biologijo. Sestavljeni so iz silicijeve smole, ki selektivno veže DNK ali RNK, odvisno od dejavnikov, vključenih v metodo ekstrakcije. Tako vam ostane visokokakovosten material za kloniranje in dolgorajno sekvenciranje.

centrifugiranje. Dodali smo 100 µl raztopine EB in ponovno centrifugirali, s tem pa smo končali postopek izolacije DNK.



Slika 15: Vsebina DNeasy PowerWater kit (QIAGEN, 2024)

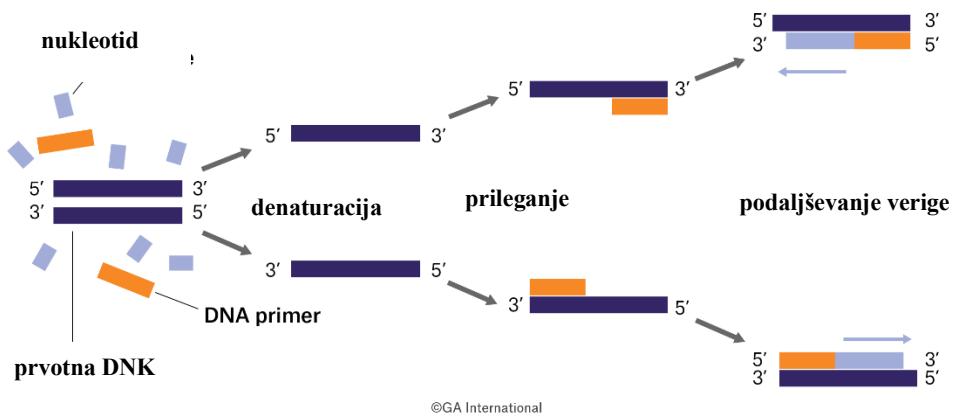
### 3.7. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času – qPCR

#### 3.7.1. Osnovni princip verižne reakcije s polimerazo – PCR

PCR je *in vitro* metoda za pomnoževanje specifičnih odsekov molekule DNK. Je hitra in enostavna metoda, široko uporabljena v molekularni biologiji, s pomočjo katere lahko zaznamo posamezne gene v celicah ali merimo izražanje genov. Pomnoževanje poteka na osnovi encimske reakcije v treh stopnjah:

1. Denaturacija – s segrevanjem na 95°C razpremo DNK (temperaturo in čas lahko prilagodimo glede na dano DNA-polimerazo)
2. Prileganje – vezava oligonukleotidnih začetnikov (»primerjev«) na iskano zaporedje (temperatura prileganja je osnovana na podlagi talilne temperature začetnikov)
3. Podaljševanje verige – reakcija poteka pri 70 – 72°C, kar je optimalna temperatura za delovanje DNA Taq polimeraze. Začne se izgrajevati komplementarna veriga DNK.

Te tri stopnje predstavljajo en cikel PCR, ki se po navadi ponovi prib. 40-krat. (Mramor, 2018)



Slika 16: Shema verižne reakcije s polimerazo, originalna shema prevzeta z: (Goldberg, 2019)

### 3.6.2. qPCR

Glavna razlika med PCR-jem in qPCR-jem je možnost merjenja količine produkta vzporedno s potekom reakcije – kvantifikacija (qPCR). Merjenje količine produkta temelji na merjenju fluorescence – izmerjeni fluorescentni signal je sorazmeren količini nastalega produkta. Poznamo več načinov zaznavanja fluorescence, najbolj znan je s pomočjo fluorescentnih barvil. (Mramor, 2018)

V našem postopku smo uporabili dva testa za qPCR. Z enim smo zaznavali cianobakterije oz. gen 16S (16S-cyano), z drugim pa gene za cianotoksine (mcyE).

#### Material in pripomočki:

- Elektronska pipeta (Slika 18)
- Izolirana DNK

Mešanica za 16S-cyano:

- destilirana voda – Mili-Q
- SYBR Green master mix<sup>10</sup>
- Primer<sup>11</sup> CYAN108F – 10 µM
- Primer CYAN377R – 10 µM

Mešanica za mcyE:

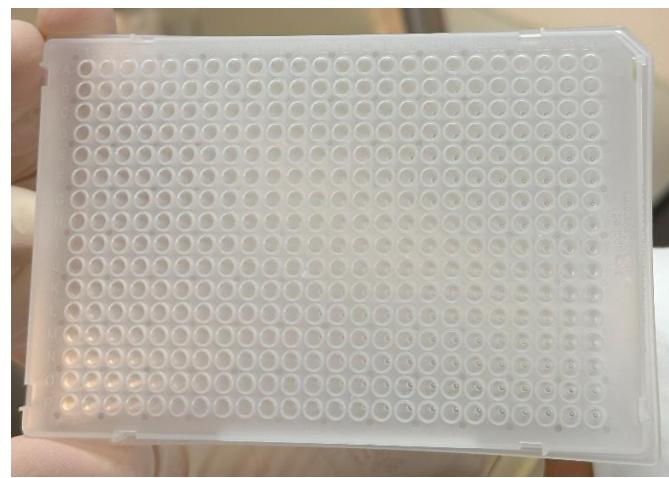
- destilirana voda – Mili-Q
- SYBR Green master mix
- Primer DQmcyF – 10 µM
- Primer DQmcyR – 10 µM

Obe mešanici sta vsebovali naslednje količine:

- Za eno reakcijo:
  - 1,40 µl Mili-Q
  - 5 µl SYBR Green master mix
  - 0,8 µl primer 1 (ali CYAN108F ali DQmcyF)
  - 0,8 µl primer 2 (ali CYAN377R ali DQmcyR)
  - 2 µl izolirane DNK

Ena reakcija pomeni en prostorček na PCR ploščici (standard PCR plate)(Slika 17). Količine smo preračunali glede na število reakcij, ki smo jih izvedli.

Vse količine smo odmerili s pomočjo navadne avtomatske in elektronske pipete z različnimi nastavki, ki so omogočali točno odmerjanje.



Slika 17: Standardna PCR ploščica, ki smo jo uporabili pri prvem qPCR

---

<sup>10</sup> fluorescentno barvilo

<sup>11</sup> = začetnik



Slika 18: Elektronska pipeta

PCR ploščico smo nato prelepili z zaščitno folijo, ki prepreči izhlapevanje prej pripravljene mešanice, in jo vstavimo v qPCR aparaturo (Slika 19), v kateri potem poteka verižna reakcija s polimerazo, hkrati pa se meri količina želenih oz. iskanih genov.



Slika 19: PCR naprava, ki smo jo uporabljali za pomnoževanje tarčnih odsekov

### **3.8. Mikroskopiranje**

Mikroskopiranje se uporablja za lažjo identifikacijo rodov oz. vrst mikroorganizmov, ki jih opazujemo. Pri tej raziskovalni nalogi je bilo uporabljeno predvsem zato, da smo dodatno potrdili prisotnost cianobakterij v vodi, tudi identificirali posamezne rodove oz. vrste, če je bilo to možno.

#### **Pripomočki:**

- sedimentacijski stekleni valji (5-50 ml) za koncentriranje zelo redkih vzorcev (proizvajalec HydroBios, Nemčija)
- svetlobni mikroskop (Leica Dm750) z oljno-imerzijskimi objektivi z visoko optično ločljivostjo pri visokih povečavah (največ 1000x) za kvalitativno analizo
- standardna oprema za mikroskopiranje (objektna, krovna stekelca, čistilni pribor, pipete)
- pripomočki za beleženje

## 4 REZULTATI

### 4.1. Abiotski dejavniki

Preglednica 3 prikazuje rezultate merjenj abiotskih dejavnikov – temperature vode, zraka in prosojnost vode vseh petih vzorčenj (oktober, november, januar, februar in marec).

*Preglednica 3: Rezultati merjenj abiotskih dejavnikov vode - temperature zraka, vode in prosojnosti vode*

Datum vzorčenja:	Temperatura zraka (°C)	Temperatura vode (°C)	Prosojnost (cm)
30.10.2022	16	16	30
29.11.2022	2,2	8	35
5.1.2023	4	6,3	30
24.2.2023	5	7,7	40
16.3.2023	9	10,1	35

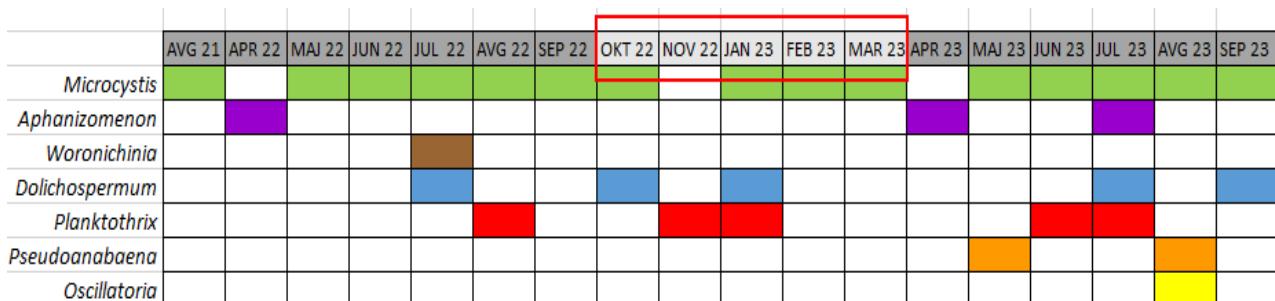
### 4.2. Rodovi cianobakterij - mikroskopija

Preglednica 4 prikazuje prisotnost rodov cianobakterij, alg in diatomej na podlagi mikroskopiranja naših vzorcev, graf 19 pod njo pa prikazuje najbolj pogoste potencialno toksične cianobakterije v vzorcih iz Hotinjskega ribnika od avgusta 2021 do septembra 2023, vključno z našimi. V hladnejšem delu leta so prevladovali rodovi *Microcystis*, *Dolichospermum* (*Anabaena*) in *Planktothrix*, ki so sicer pogosti tudi v toplejših delih let (2021-23). V aprilu leta 2022 in 2023 prevladuje rod *Aphanizomenon*, ki v naših vzorcih ni bil zaznan.

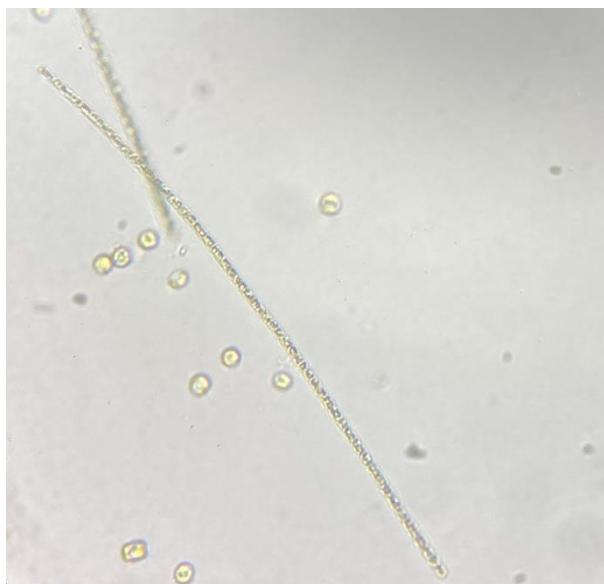
Preglednica 4: Rezultati mikroskopiranja v različnih mesecih - prisotnost rodov: rjavo - cianobakterije, zeleno - alge, modro - diatomeje, \* = potencialno strupen rod

Oktober	November	Januar	Februar	Marec
<i>Dolichospermum</i> *	<i>Planktothrix</i> *	<i>Dolichospermum</i> *	<i>Microcystis</i> *	<i>Planktothrix</i> *
<i>Microcystis</i> *	<i>Monoraphidium</i>	<i>Microcystis</i> *	<i>Closterium</i>	<i>Gomphosphaeria</i>
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Planktothrix</i> *	<i>Asterionella</i>	<i>Ankistrodesmus</i>
<i>Snowella</i>	<i>Tetrastrum</i>	<i>Gomphosphaeria</i>	<i>Aulacoseira</i>	<i>Monoraphidium</i>
<i>Pediastrum</i>	<i>Stephanodiscus</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Stephanodiscus</i> (prevladuje)	<i>Pediastrum</i>
<i>Phacus</i>		<i>Ankistrodesmus</i>		<i>Phacus</i>
<i>Scenedesmus</i>		<i>Coelastrum</i>		<i>Scenedesmus</i>
<i>Stephanodiscus</i>		<i>Pediastrum</i>		<i>Asterionella</i>
		<i>Scenedesmus</i>		<i>Cyamtoptera</i>
		<i>Fragilaria</i>		<i>Fragilaria</i>
		<i>Nitzchia</i>		<i>Nitzchia</i>
		<i>Stephanodiscus</i> (prevladuje)		<i>Stephanodiscus</i>

Preglednica 5: Prikaz mikroskopsko pregledanih vzorcev od avgusta 2021 do septembra 2023 (NIB podatki), z rdečim okvirčkom so označeni vzorci v okviru te raziskovalne naloge



Spodnje slike prikazujejo s pomočjo mikroskopije identificirane rodove cianobakterij:



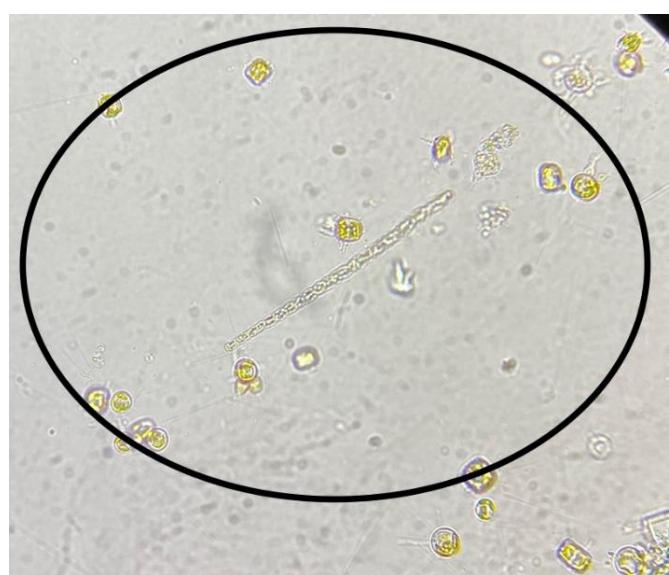
Slika 20: nitke - *Planktothrix cf. agardhii* (strupena cianobakterija), krogci – diatomeje



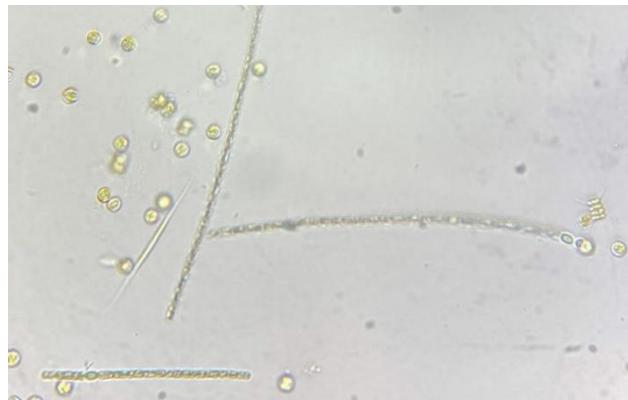
Slika 21: *Dolichospermum cf. circinalis* (strupena cianobakterija)



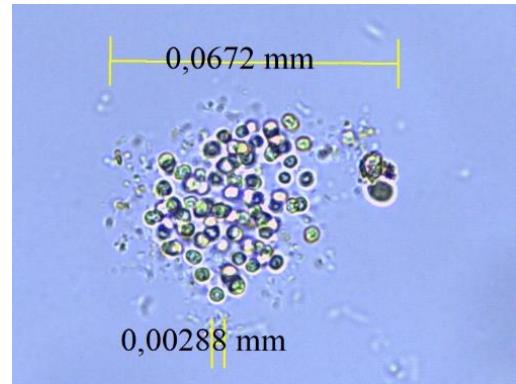
Slika 22: *Microcystis*



Slika 23: *Planktothrix Agardhii*



Slika 24: Nitke *Planktothrix agardhii*, krogci doatomeje in več zelenih alg, med njimi *Ankistrodesmus* (desno zgoraj) in *Scenedesmus* (desno spodaj).



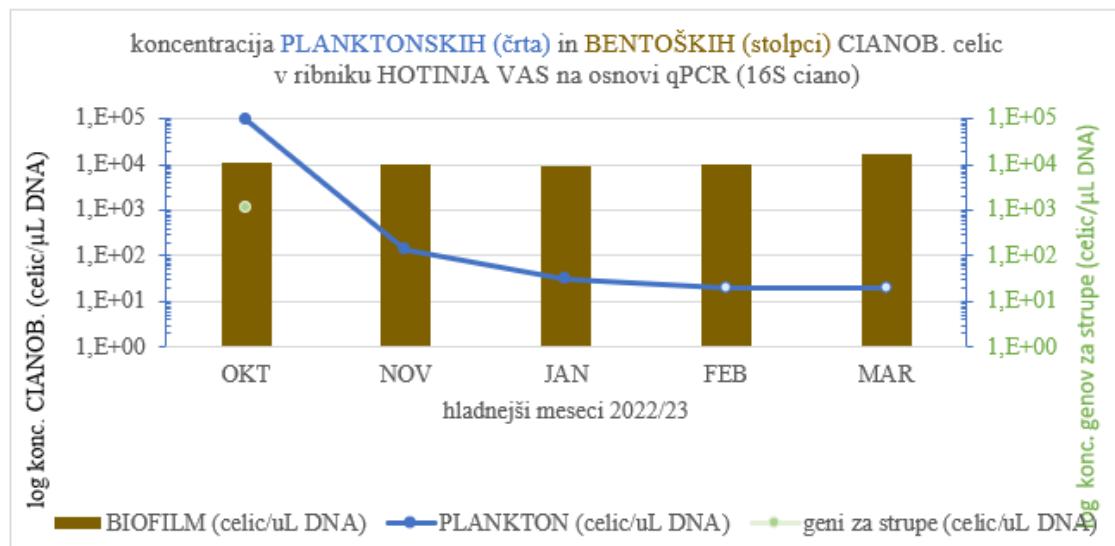
Slika 25: Rahlo razpadla kolonija  
*Caelosphaerium*

#### 4.3. Koncentracija celic na osnovi qPCR

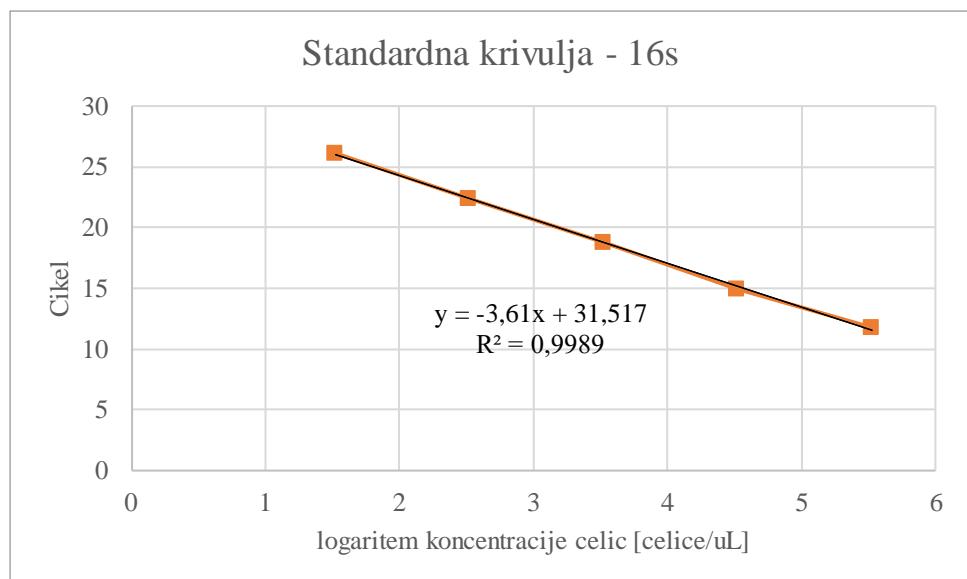
Preglednica 6 in Graf 1 pod njo prikazujeta koncentracijo cianobakterij na podlagi izračunov rezultatov testa qPCR. Računali smo posebej za planktonske in posebej za bentoške vzorce. Grafa 2 in 3 predstavlja grafa standardne krivulje oz. že znanih vzorcev, ki smo jih uporabili kot pozitivno kontrolo pri qPCR.

*Preglednica 6: Koncentracija celic na podlagi rezultatov qPCR, podana v številu celic na mikroliter, rdeče - na podlagi mikroskopiranja*

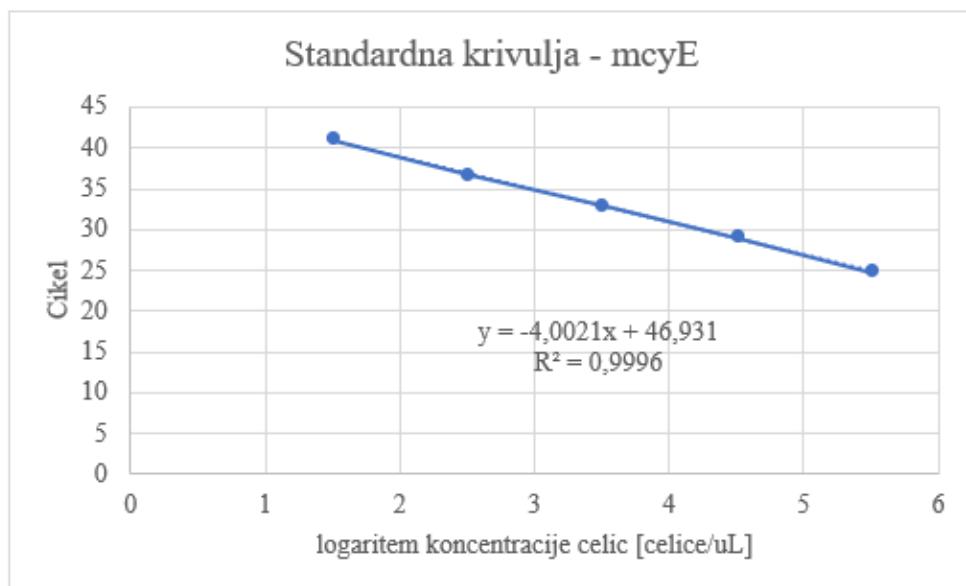
	16S-ciano		mcyE
	Koncentracija celic		Koncentracija celic
Vzorec	PLANKTON (št. celic/µL DNA)	BIOFILM (št. celic/µL DNA)	geni za strupe (št. celic/µL DNA)
OKTOBER	<b>9,03E+04</b>	<b>1,13E+04</b>	<b>1,08E+03</b>
NOVEMBER	<b>1,34E+02</b>	<b>1,01E+04</b>	
JANUAR	<b>3,04E+01</b>	<b>9,00E+03</b>	
FEBRUAR	<b>2,00E+01</b>	<b>1,04E+04</b>	
MAREC	<b>2,00E+01</b>	<b>1,70E+04</b>	



Graf 1: Graf koncentracij cianobakterij v hladnejših mesecih 2022/2023



Graf 2: Graf standardne krivulje - 16s, pridobljen s PCR testom že znanega vzorca



Graf 3: Graf standardne krivulje – mcyE, pridobljen s PCR testom že znanega vzorca

## 5 PRILOGE

Fotografije terenskega dela in eksperimentalnega dela v laboratoriju:



*Slika 26: Hotinjski ribnik in okolica – september 2022*



*Slika 27: Priprava kamnov za vzorčenje biofilma*



*Slika 28: Laboratorij na NIB*



*Slika 29: Pripravljanje ploščice za qPCR*

## **6 DISKUSIJA**

### **6.1. Prisotnost potencialno toksičnih cianobakterij**

Kot že zgoraj omenjeno (3.8.), prisotnost cianobakterij lahko dokažemo s postopkom mikrokopiranja in/ali qPCR, ki hkrati tudi šteje število iskanih genov. Prisotnost potencialno toksičnih cianobakterij zaznamo s pomočjo gena za sintezo cianotoksinov, natančneje za sintezo mikrocistina (oznaka: mcyE). To je gen, ki se nahaja le v potencialno toksičnih cianobakterijah. Kot pozitivno kontrolo smo pri testih qPCR uporabljali že znane vzorce, ki so vsebovali gen mcyE (Graf 3). V naših vzorcih sprva s qPCR nismo zaznali ničesar – vsi rezultati so bili negativni, kar pri testu qPCR lahko pomeni dvoje. Prvič, gena v vzorcu ni oz. je njegova prisotnost v vzorcu premajhna, da bi ga s qPCR zaznali. Drugič pa lahko pomeni, da je morda prisotnost tega gena v vzorcu prevelika, da bi ga sploh lahko v celoti zaznali oz. preračunali, kar se velikokrat zgodi pri neredčenih vzorcih. Razlog smo določili tako, da smo test ponovili, vendar z redčenimi vzorci. V ponovljenih vzorcih je bil s qPCR gen mcyE zaznan le oktobra – izmerjena količina je bila  $1,08E+03$  cc/ $\mu$ l (enota celica/ DNA – pomeni število celic v enem  $\mu$ l) (Preglednica 6, Graf 1 - zelena pika). Na podlagi tega vzorca lahko sklepamo, da so bile potencialno toksične cianobakterije v vodi prisotne le oktobra v planktonskih vzorcih.

Hkrati pa smo pri vseh vzorcih zaznali prisotnost potencialno toksičnih cianobakterij tudi z mikroskopom, in to pri vseh vzorčenjih. Rodovi *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum* (Preglednica 4) so vsi potencialno toksični rodovi, ki smo jih zaznali tudi po mesecu oktobru.

Na podlagi rezultatov mikroskopije potrjujemo hipotezo 1, saj so potencialno toksične cianobakterije bile zaznane skozi celoten interval vzorčenja, torej med hladnejšim delom leta niso izginile oz. odmrle.

### **6.2. Številčnost odkritih cianobakterij**

V naši raziskovalni nalogi smo vzorčili tako plankton kot biofilm. Rezultati koncentracije planktonskih in biofilmskih cianobakterij na podlagi qPCR se precej razlikujejo, vendar jih med seboj ne moremo primerjati, saj so bili vzorčeni in izolirani z drugačnimi protokoli. Prav tako jih težko primerjamo z rezultati ostalih zimskih raziskav (zimsko cvetenje na Bledu), saj te niso potekale na enakih tipih vodnih teles – Blejsko jezero npr. ni evtrofno jezero.

Koncentracija cianobakterij je bila v biofilmskih vzorcih konstantna, kar lahko razberemo iz grafa (Graf 1) – vsi rezultati se nahajajo okrog  $1,0\text{E}+0,4$  cc/ $\mu\text{l}$  DNK. Največjo vrednost je imel marčevski vzorec –  $1,7\text{E}+0,4$  cc/ $\mu\text{l}$  DNK.

Koncentracija cianobakterij v planktonskih vzorcih pa je skozi mesece močno upadla – oktobra je imela vrednost  $9,03\text{E}+04$  cc/ $\mu\text{l}$ , marca pa s qPCR nismo dobili rezultatov. Na podlagi mikroskopije pa smo ocenili vrednost koncentracije približno  $2\text{E}+01$  cc/ $\mu\text{l}$  (Preglednica 6 in Graf 1).

Razlike med biofilmski in planktonski vzorci so precejšnje, vendar jih, kot smo omenili že zgoraj, jih ne moremo primerjati med seboj. Predvidevamo, da so biofilmske vrste ostale konstantne, saj ostanejo ves čas pritrjene na kamne blizu zunanje površine in bi lahko zato imele več hranič kot planktonske, ki plavajo v vodi. Iz rezultatov v hladnejših mesecih (vsi rezultati razen oktobra) sklepamo, da so planktonske nekoliko bolj odvisne od sprememb v temperaturi vode (Preglednica 6 in Graf 1).

Na podlagi navedenega lahko potrdimo našo hipotezo 2, ki pravi, da oktobra zaradi višjih temperatur pričakujemo največje število zaznanih cianobakterij (planktonskih in biofilmskih skupaj). Rezultati se torej skladajo z navedeno hipotezo, saj je bilo ob višji temperaturi vode ( $16^\circ\text{C}$ ) (Preglednica 3) število cianobakterij največje.

### 6.3. Prisotnost rodov

V planktonskih vzorcih prvega vzorčenja smo s pomočjo mikroskopije opazili cianobakterije potencialno strupenih rodov *Dolichospermum* in *Microcystis*. (Preglednica 4 in 5) Novembra smo v planktonu opazili le cianobakterije rodu *Planktothrix*, medtem ko smo januarja zaznali vse prej omenjene rodove. Februarja smo opazili le *Microcystis*, v marcu pa ponovno le potencialno strupeni rod *Planktothrix*. Opazili smo, da so bile torej najpogosteje cianobakterije rodu *Microcystis*, saj so bile opažene v treh od petih vzorčenj.

Z zgoraj navedenimi rezultati smo potrdili našo hipotezo 3, na podlagi katere smo pričakovali, da bo največ zaznanih potencialno toksičnih cianobakterij pripadalo rodu *Microcystis*, hkrati pa smo na podlagi zgoraj omenjenih rezultatov ovrgli hipotezo 4, torej, da z mikroskopijo ne bomo zaznali cianobakterij zaradi njihove premajhne številčnosti. Mikroskopija, s katero smo kljub

manjši številčnosti zaznali cianobakterije, nam je tudi omogočila dokazati prisotnost potencialno toksičnih rodov v prvi točki diskusije.

#### **6.4. Zaznavnost s testom qPCR**

Kot je bilo omenjeno že prej (6.1.), smo s qPCR zaznali prisotnost cianobakterij. Kot pozitivno kontrolo smo pri vseh testih qPCR uporabljali že znane vzorce, ki so vsebovali cianobakterijsko DNK – torej so vsebovali gen 16S, ki smo ga iskali. (Graf 2) To je gen, ki se nahaja v vseh cianobakterijah in z njim potrjujemo samo prisotnost cianobakterij. Sprva so bili rezultati naših vzorcev negativni, enako, kot je bilo omenjeno že v prvi točki diskusije. Tudi tukaj smo vzorce razredčili in ponovili postopek qPCR. Po redčenju vzorcev smo dobili pozitivne rezultate, tako za planktonске kot biofilmske vzorce, ki so bili dokaj visoki (planktonski okoli od 2+01 do 9E+04).

Z zgoraj opisanim smo potrdili hipotezo 5, ki pravi, da bomo zaradi visoke občutljivosti uporabljeni metode (qPCR) na genetski material cianobakterij te zaznali. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času se je izkazala za zelo zanesljivo metodo kljub prvotnim negativnim rezultatom neredčenih vzorcev, saj je to zelo pogost pojav, na katerega je treba paziti pri izvedbi qPCR.

## **7 ZAKLJUČEK**

V naši raziskovalni nalogi z naslovom Kam odidejo toksične cianobakterije pozimi smo dokazali, da potencialno strupeni rodovi cianobakterij v hladnih mesecih koledarskega leta ne izginejo, temveč da so v nekoliko manjšem številu še vedno prisotni v vodi. Čeprav smo potencialno toksične gene v njih s qPCR zaznali le oktobra, smo jih z mikroskopijo opazili tudi v drugih vzorcih, kar pomeni, da se njihovo število v zimskih mesecih vendarle močno zmanjša. Ugotovili smo tudi, da številčnost biofilmskih vrst cianobakterij ostane skozi zimo dokaj konstantna, medtem ko se številčnost planktonskih vrst močno zmanjša. Največje število oz. največjo koncentracijo cianobakterij (planktonskih in bentoških skupaj) je imel prvi vzorec – oktobrski. Z mikroskopijo smo uspeli odkriti nekaj potencialno toksičnih vrst cianobakterij, poleg tega pa smo uspeli identificirati še nekaj drugih alg (zelene alge, diatomeje...).

Spremljanje potencialno toksičnih rodov cianobakterij je zelo pomembno za monitoring varnosti ljudi in živali ter posledično zaradi zmožnosti ohranjanja kvalitete vode. Strokovnjaki lahko ob večjem pojavu strupenih cianobakterij institucijam, pristojnim za upravljanje z jezeri, predlagajo izvedbo posebnih ukrepov, ki lahko preprečijo povečano nevarnost za druga bitja in tudi človeka. Naši rezultati so pokazali, da so potencialno strupene cianobakterije lahko prisotne tudi pozimi, kar je zanimiv nov podatek. Ker pa so njihove koncentracije nizke in ker v zimskem času ni sezone za kopanje, vodne športe in intenziven ribolov, redno spremljanje stanja v zimskih mesecih pa zaenkrat še ni nujno za zagotavljanje varnosti za ljudi in živali. Vsekakor pa je zelo pomembno, da se zaradi zgoraj navedenih razlogov stanje voda in posledično njihova varnost za ljudi in živali redno in učinkovito spremlja v toplejših meseciv, ko se izvajajo zgoraj naštete aktivnosti.

## **8 DRUŽBENA ODGOVORNOST**

Osnovni cilj te naloge je prispevati k ozaveščanju ljudi o ključni vlogi varstva narave oz. vodnih teles. Želeli smo predstaviti biološko analizo priljubljene ribiške točke v Hočah, natančneje Hotinjskega ribnika, ter raziskati trenutno ekološko stanje s poudarkom na prisotnosti potencialno toksičnih cianobakterij. Naš namen je bil pokazati, kako lahko spremljamo prisotnost cianobakterij in posledično nadzorujemo vodna telesa v Sloveniji.

Spremljanje ribnikov je ključnega pomena, saj se v severovzhodni Sloveniji celinske vode nahajajo blizu podtalnice, in morebitne spremembe v obremenjenosti z organskimi in anorganskimi snovmi pa lahko vplivajo na ljudi, ki to vodo uporabljajo, zlasti tiste, ki jo redno piyejo. Prisotnost cianotoksinov ima lahko resne posledice za ekosistem in tudi za ljudi, zato se pogosto spremlja na številnih območjih v Sloveniji, rezultati pa so objavljeni na spletnem portalu [www.ciano.si](http://www.ciano.si). Ker smo v naši raziskavi ugotovili, da so koncentracije cianobakterij pozimi nizke, menimo, da zimsko spremljanje njihove številčnosti ni nujno. Smiselno pa je v naslednjih letih in desetletjih spremljati spreminjanje stanja zaradi podnebnih sprememb, ki bi zaradi globalnega segrevanja ozračja in posledično višjih zimskih temperatur v prihodnosti lahko vplivale tudi na številčnost cianobakterij pozimi.

## 9 VIRI

- ACS Chemistry for Life. (23. oktober 2023). *Saxitoxin*. Pridobljeno iz American Chemical Society - Saxitoxin: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/s/saxitoxin.html>
- Allaf, M. M., & Peerhossaini, H. (24.. marec 2022). *Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond*. Pridobljeno iz National Institutes of Health (.gov): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9025173/>
- Baker, A. (20212). *Phycokey -- an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects*. Pridobljeno iz University of New Hampshire Center for Freshwater Biology: [http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano\\_filaments/cyano\\_unbranched\\_fil/tapered\\_filaments/APHANIZOMENON/Aphanizomenon\\_Image\\_page.html](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano_filaments/cyano_unbranched_fil/tapered_filaments/APHANIZOMENON/Aphanizomenon_Image_page.html)
- Bayraktar, E. (2018). *Microcystis sp. Algae under microscopic view stock photo*. Pridobljeno iz iStock: <https://www.istockphoto.com/photo/microcystis-sp-algae-under-microscopic-view-gm1010152146-272285560>
- BioRender. (2022). *Cyanobacteria Structure*. Pridobljeno iz BioRender templates: <https://www.biorender.com/template/cyanobacteria-structure>
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., Si An, J., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., . . . Eaglesham, G. K. (julij 2001). Environmental health perspectives. *Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins*, str. 663-668.
- Chaffin, J. (2020). *Genus: Woronchinia and Coelosphaerium*. Pridobljeno iz Ohio Sea Grant, osu.edu: <https://ohiosseagrant.osu.edu/research/plankton/woronchiniaandcoelosphaerium>
- Eleršek, T. (2014). *Potencialno toksične cianobakterije v celinskih vodah Slovenije*. Ljubljana: Nacionalni inštitut za biologijo.
- Eleršek, T., & Zupančič, M. (2023). *Zemljevid tveganja - cianotoksini podrobno*. Pridobljeno iz CIANO SLO: <https://www.ciano.si/interaktivni-zemljevid/>
- Goldberg, A. (1. avgust 2019). *A Brief History of PCR and Its Derivatives*. Pridobljeno iz LABTAG | BLOG: <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/>
- Google Maps. (2023). *Hotinski ribnik*. Pridobljeno iz Google Maps: <https://www.google.com/maps/@46.4676993,15.6800682,16.62z?entry=ttu>
- Hieronymus, J., Eilola, K., Olofsson, M., Hense, I., Meier, N. M., & Almroth-Rosell, E. (2021). *Modeling cyanobacteria life cycle dynamics and historical nitrogen fixation in the Baltic Proper*. Pridobljeno iz Biogeosciences: [https://bg.copernicus.org/articles/18/6213/2021/#:~:text=The%20Cyanobacteria%20Life%20Cycle%20\(CLCA%20non%2Dgrowing%20recruiting%20stage.](https://bg.copernicus.org/articles/18/6213/2021/#:~:text=The%20Cyanobacteria%20Life%20Cycle%20(CLCA%20non%2Dgrowing%20recruiting%20stage.)

- LibreTexts. (1. . januar 2024). *Cyanobacteria*. Pridobljeno iz Microbiology (eBook): [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(Boundless\)/08%3A\\_Microbial\\_Evolution\\_Phlogeny\\_and\\_Diversity/8.09%3A\\_Nonproteobacteria\\_Gram-Negative\\_Bacteria/8.9A%3A\\_Cyanobacteria](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/08%3A_Microbial_Evolution_Phlogeny_and_Diversity/8.09%3A_Nonproteobacteria_Gram-Negative_Bacteria/8.9A%3A_Cyanobacteria)
- Lopes, G., Silva, M., & Vasconcelos, V. (2022). *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria*. Elsevier Science.
- Lopes, V. R., & Vasconcelos, V. M. (23. avgust 2011). *Planktonic and benthic cyanobacteria of European brackish waters: a perspective on estuaries and brackish seas*. Pridobljeno iz Taylor & Francis Online: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09670262.2011.602429>
- Lurling, M., Eshetu, F., Faassen, E. J., Kosten, S., & Huszar, V. J. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 552-559.
- Majcen, I. (2016). *METODOLOGIJA VREDNOTENJA EKOLOŠKEGA STANJA JEZER NA PODLAGI FITOPLANKTONA*. Ljubljana: Ministrstvo za okolje in prostor.
- Mantzouki, E., Lürling, M., Fastner, J., De Senerpont Domis, L., Wilk-Woźniak, E., Koreivienė, J., . . . Krztoń, W. (2018). Temperature Effects Explain Continental Scale Distribution of Cyanobacterial Toxins. *Toxins* 10, 156.
- Mramor, S. (2018). *Optimizacija metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za ocenjevanje multipotentnosti mezenhimskih maticnih celic*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani - Fakulteta za farmacijo.
- Oemig, G. (brez datuma). *Limnothrix*. Pridobljeno iz Atlas of Cyanobacteria: <https://atlasofcyanobacteria.com/browse.php?path=./Cyanobacteria/Synechococcales/Pseudanabaenaceae/Limnothrix>
- QIAGEN. (2024). *QIAGEN*. Pridobljeno iz DNeasy PowerWater Kit: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powerwater-kit>
- Schopf, J., & Walter, M. (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria. V N. Carr, & B. Whitton, *The biology of cyanobacteria*. Oxford: Blackwell.
- Suthers, I. M., & Rissik, D. (2009). *PLANKTON: A guide to their ecology and monitoring for water quality*. Collingwood: CSIRO PUBLISHING.
- Štraser, A. (2014). Cianobakterije in njihovi toksini. *Živiljenje in tehnika*, 45-50.
- T., V. (3. februar 2021). *Občina Hoče - Slivnica*. Pridobljeno iz Hotinjski ribniki – naravne znamenitosti Občine Hoče - Slivnica: <https://www.hoce-slivnica.si/dogodek/364711>
- Wejnerowski, Ł., Rzymski, P., Kokociński, M., & Meriluoto, J. (22. junij 2018). The structure and toxicity of winter cyanobacterial bloom in a eutrophic lake of the temperate zone. *Ecotoxicology*, 752–760. Pridobljeno iz National Institutes of Health (.gov): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6061131/>

Wiki FKKT. (10. december 2010). *Mikrocistin*. Pridobljeno iz Mikrocistin:  
<https://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Mikrocistin>

Wikipedia. (2023). *Anabaena circinalis*. Pridobljeno iz Wikipedia:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Anabaena\\_circinalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Anabaena_circinalis)

Wikipedia. (2023). *Planktothrix*. Pridobljeno iz Wikipedia:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Planktothrix>

Zhang, W., Liu, J., Xiao, Y., Zhang, Y., Yu, Y., Zheng, Z., . . . Li, Q. (23. september 2022). *The Impact of Cyanobacteria Blooms on the Aquatic Environment and Human Health*. Pridobljeno iz MDPI: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/10/658>

Zupančič, M. (brez datuma). *Ali lahko cianobakterije cvetijo?* Pridobljeno iz ciano.si:  
<https://www.ciano.si/ali-lahko-cianobakterije-cvetijo/>