

**VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA**

**DIPLOMSKO DELO  
UPORABA MOLEKULARNIH ORODIJ PRI ZAZNAVANJU  
CIANOBAKTERIJ**

**JANJA ZABUKOVNIK**

**VELENJE, 2019**

**VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA**

**DIPLOMSKO DELO  
UPORABA MOLEKULARNIH ORODIJ PRI ZAZNAVANJU  
CIANOBAKTERIJ**

**JANJA ZABUKOVNIK**  
Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentorica: pred. dr. Anja Bubik  
Somentorica: doc. dr. Tina Eleršek

VELENJE, 2019

Številka: 726-2/2019-2  
Datum: 15. 1. 2019

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študentka Visoke šole za varstvo okolja **Janja Zabukovnik** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

**Uporaba molekularnih orodij pri zaznavanju cianobakterij**

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

**Molecular tools for cyanobacteria identification**

Mentorica: **pred. dr. Anja Bubik**

Somentorica: **doc. dr. Tina Eleršek**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Diplomskim redom VŠVO.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat VŠVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.



Izr. prof. dr. Boštjan Pokorny  
dekan

Visoka šola za varstvo okolja

Trg mladosti 7 | 3320 Velenje

t: 03 898 64 10 | f: 03 89864 13 | e: info@vsvo.si

[www.vsvo.si](http://www.vsvo.si)



## IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisana Janja Zabukovnik, vpisna številka 34160045, študentka visokošolskega strokovnega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtorica diplomskega dela z naslovom Uporaba molekularnih orodij pri zaznavanju cianobakterij, ki sem ga izdelala pod mentorstvom pred. dr. Anje Bubik in somentorstvom doc. dr. Tine Eleršek.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala Marija Bubik, profesorica slovenskega jezika;
- dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

Datum:

Podpis avtorice:

## ZAHVALA

»Če ti preostane samo še dih, ga porabi za to, da rečeš *HVALA*.«

-Pam Brown

In HVALA vsem vam, ki ste bili z mano na tej čudoviti in vznemirljivi poti študija, in tistim, ki ste mi pomagali pri pisanju diplomske naloge!

Zares bi se iskreno zahvalila mojima najboljšima mentoricama, pred. dr. Anji Bubik in doc. dr. Tini Eleršek. Obema najlepša HVALA za vso nesebično podporo in pomoč, za vse nasvete in vzpodbudne besede. Hvala tudi Maši in Karmen za vso pomoč pri nastajanju te diplomske naloge!

Zahvalila bi se tudi Nacionalnemu inštitutu za biologijo iz Ljubljane, ki mi je omogočil izvajanje eksperimentalnega dela in pa gospe Mariji Bubik, ki je lektorirala diplomsko delo.

In seveda HVALA tudi mojemu Timoteju, ki mi je skozi celotno pisanje stal ob strani in me vzpodbujal, in HVALA vsem domačim, ki so me podpirali in mi vedno znova dajali zagon s spodbudnimi besedami!

## IZVLEČEK

Za ljudi, živali in okolje predstavljajo cianobakterijska cvetenja potencialno nevarnost, saj lahko cianobakterije proizvajajo toksine. Med drugim ta pojav ogroža tudi površinske zaloge pitne vode povsod po svetu. Obstaja sicer nekaj senzorskih metod, ki nam pomagajo zaznati cianobakterije, še preden pride do prekomerne namnožitve. Eden izmed možnih novejših načinov obravnavanja cianobakterijske problematike je zgodnja zaznava potencialno toksičnih sevov cianobakterij z uporabo novejših molekularnih metod na osnovi okoljske DNK (eDNK), kot je npr. verižna reakcija s polimerazo (PCR). Te metode so v molekularni biologiji izjemno pomembne, saj nam omogočajo nov, temeljitejši (bolj specifičen) in hitrejši način vpogleda v ekološko dinamiko. Uporaba teh metod bi nam pomagala zaznati in odkriti cianobakterije pred njihovim masovnim pojavom, hkrati pa bi lahko te metode dopolnile oz. nadgradile tradicionalne morfo-taksonomske metode. Analize eDNK omogočajo poleg identifikacije tudi določanje toksigenega potenciala cianobakterij ter zgodnje odkrivanje invazivnih vrst alg.

Za ugotavljanje potenciala uporabe molekularnih orodij pri zaznavanju cianobakterij smo izvedli vzorčenje Velenjskega in Perniškega jezera, kjer smo izmerili osnovne parametre (temperaturo vode, temperaturo zraka, pH, motnost, prevodnost, vsebnost kisika). Vzorcema smo izmerili klorofil in iz njih izolirali eDNK. Za qPCR analizo smo izbrali pet različnih začetnih oligonukleotidov (18S rDNK, ki omogoča zaznavanje evkariontskih organizmov v vzorcu, 16S rDNK, ki omogoča zaznavanje prokariontskih organizmov v vzorcu, 16S-ciano, ki omogoča zaznavanje vseh cianobakterij v vzorcu, 16S-Pla, ki omogoča zaznavo predstavnikov rodu *Planktothrix*, ki imajo potencial za sintezo mikrocistinov, in McyE, ki omogoča zaznavo vseh cianobakterij s potencialom za sintezo mikrocistinov).

Ugotovili smo, da imajo inovativna molekularna orodja na osnovi eDNK velik potencial za zgodnje opozarjanje na prisotnost cianobakterijskih cvetenj. V primerjavi z mikroskopijo so lahko nova orodja hitrejša in bolj specifična, saj bodo zaznala že majhne koncentracije cianobakterij, tudi pikocianobakterije. Za bolj trdne zaključke bi morali optimizirati uporabljene začetne oligonukleotide, poskuse pa izvajati v boljši časovni in prostorski resoluciji (bolj pogosto vzorčenje na več lokacijah).

Ključne besede: Cianobakterije, nove molekularne metode, eDNK, qPCR.

## ABSTRACT

For humans, animals and the environment, cyanobacterial blooms pose a potential threat because cyanobacteria can produce toxins. Among other issues, this phenomenon also threatens surface drinking water supplies all over the world. There are some sensory methods that help us detect cyanobacteria before excessive reproduction occurs. One possible way to deal with the cyanobacterial problem is early detection of potentially toxic cyanobacterial strains by using new molecular methods based on environmental DNA (eDNA), such as polymerase chain reaction (PCR). In molecular biology these methods are extremely important, because they allow us to have a new, more thorough (more specific) and quicker way of gaining insight into the ecological dynamics. These methods can help us detect cyanobacteria before their mass occurrence, and at the same time they could upgrade and supplement traditional morphologic-taxonomic methods. In addition to identification, eDNA analyses also identify the toxigenic potential of cyanobacteria and early detection of invasive algae species.

In order to evaluate the potential of molecular tools for detection of cyanobacteria we performed sampling on Velenje and Pernica lakes, where basic parameters were measured (water temperature, air temperature, pH, turbidity, conductivity, dissolved oxygen concentration). In the samples we measured chlorophyll content and isolated eDNA. For qPCR analysis, we selected five different oligonucleotides (18S rDNA for detection of eukaryotic organisms and 16S rDNA for detection of prokaryotic organisms in the sample, 16S-cyano for detection of all cyanobacteria in the sample, 16S-Pla for detection of potentially microcystin-producing representatives of the genus *Planktothrix* and McyE which enables detection of all potentially-microcystin producing cyanobacteria).

We concluded that innovative eDNA-based molecular tools have a high potential for early warning of cyanobacterial blooms. Compared to microscopy they may be faster and more specific, as they can detect small concentrations of cyanobacteria, as well as picocyanobacteria. However, for more strict conclusions we should optimize oligonucleotides and try to perform experiments in a better temporal and spatial resolution (sampling more often in multiple locations).

Keywords: Cyanobacteria, new molecular methods, eDNA, qPCR.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Predstavitev problematike .....	1
1.2	Namen in cilji.....	1
1.3	Hipotezi .....	1
2	FITOPLANKTON V POVRŠINSKIH VODAH.....	2
2.1	Cianobakterije .....	2
2.2	Cianobakterijsko cvetenje.....	3
2.3	Bioaktivne snovi cianobakterij .....	3
2.4	Cianobakterijski toksini.....	4
3	METODE DOLOČEVANJA FITOPLANKTONA.....	5
3.1	Klasični načini morfo-taksonomije .....	5
3.2	Sodobni molekularni pristopi .....	5
3.3	Sodobni molekularni pristopi za zaznavanje cianobakterij.....	6
4	MATERIALI IN METODE.....	7
4.1	Vzorčenje .....	7
4.2	Ekološko stanje Velenjskega in Perniškega jezera .....	7
4.3	Priprave vzorcev .....	8
4.3.1	Priprava vzorca za merjenje klorofila .....	8
4.3.2	Priprava vzorca za izolacijo eDNK.....	9
4.4	Določitev koncentracije klorofila .....	9
4.5	Morfološko-taksonomska analiza .....	9
4.6	Izolacija eDNK.....	10
4.7	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo – qPCR.....	12
4.8	Disociacijske krivulje .....	15
4.9	Ocena kakovosti in količine DNK s tehniko »Nanodrop« .....	15
5	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	16
5.1	Fizikalno-kemične lastnosti vzorcev vode.....	16
5.2	Vsebnost klorofila in fitoplankton .....	18
5.3	Morfološko-taksonomska analiza vzorcev .....	18
5.4	Ugotavljanje količine in kvalitete eDNK.....	22
5.5	Analiza qPCR.....	22
6	SKLEPI .....	26
7	POVZETEK.....	27
8	SUMMARY.....	28
9	VIRI IN LITERATURA.....	29
10	PRILOGE .....	32



## KAZALO SLIK:

Slika 1: Primerjava tradicionalnega pristopa in novih molekularnih orodij pri določevanju ocene ekološkega stanja, ki je osnova za upravljanje vodnih virov (Avtor: Eco-AlpsWater, Eleršek, 2018).....	6
Slika 2: GF/C filter po filtraciji Perniškega jezera (Zabukovnik, 2019).....	8
Slika 3: Prefiltrirana vzorca Perniškega jezera in Velenjskega jezera skozi Sterivex filter (Zabukovnik, 2019).....	11
Slika 4: Vzorčenje Velenjskega jezera (Zabukovnik, 2019).....	16
Slika 5: Vzorčenje Perniškega jezera (Zabukovnik, 2019).....	17
Slika 6: Različne najdene vrste fitoplanktona v Velenjskem jezeru (Zabukovnik, 2019). A, B, Č, D – predstavniki rodu <i>Cyclotella</i> (diatomeje), različne orientacije; C – predstavnik rodu <i>Navicula/Nitzscia</i> ; E – manjši del <i>Nitzscia linearis</i> . Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pri povečavi 400x, fotografije smo posneli s pomočjo kamere Cmax 5 PRO.....	20
Slika 7: Najpogostejši predstavniki fitoplanktona v Perniškem jezeru (Zabukovnik, 2019). A – <i>Nitzscia linearis</i> ; B, C – predstavnik rodu <i>Phormidium</i> .; Č – <i>Aulacosira granulata</i> . Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pri povečavi 400x, fotografije smo posneli s pomočjo kamere Cmax 5 PRO.....	21
Slika 8: Redkejša vrsta fitoplanktona v Perniškem jezeru (Zabukovnik, 2019). A – diatomeja, predstavnik rodu <i>Gyrosigma</i> ; B – <i>Cymatopleura solea</i> ; C – zelena alga, predstavnik <i>Scenedesmus quadricauda</i> desno zgoraj in diatomeja <i>Nitzscia palea</i> levo spodaj; Č – zelena alga, predstavnik rodu <i>Scenedesmus</i> . Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pri povečavi 400x, fotografije smo posneli s pomočjo kamere Cmax 5 PRO.....	21
Slika 9: »Nanodrop« analiza vzorca iz Velenjskega jezera (levo) in iz Perniškega jezera (desno).....	22
Slika 10: Disociacijska krivulja pomnoženih tarčnih zaporedij z začetnim oligonukleotidom McyE na vzorcu Perniškega in Velenjskega jezera. X-os predstavlja temperaturo (°C) in y-os spremembo fluorescence v času reakcije.....	24
Slika 11: Disociacijska krivulja pomnoženih tarčnih zaporedij z začetnim oligonukleotidom 16S-ciano na vzorcu Perniškega in Velenjskega jezera. X-os predstavlja temperaturo (°C) in y-os spremembo fluorescence v času reakcije.....	25

## KAZALO PREGLEDNIC:

Preglednica 1: Lestvica za določanje evtrofičnosti vodnega telesa (povzeto po Ambrožič in sod., 2008 in OECD, 1982).....	8
Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov.....	13
Preglednica 3: Postavitev vzorcev na testno ploščico.....	14
Preglednica 4: Izmerjeni parametri na Velenjskem jezeru.....	16
Preglednica 5: Izmerjeni parametri na Perniškem jezeru 2 – pri pregradi.....	17
Preglednica 6: Izmerjen klorofil a v vzorcu Velenjskega in Perniškega jezera.....	18
Preglednica 7: Vrstna sestava ter ocena števila celic (na mililiter) pogostih vrst fitoplanktona v Velenjskem in Perniškem jezeru. Nekaterih rodov oz. vrst pri štetju nismo opazili (npr. <i>Nitzschia</i> v Velenjskem jezeru, <i>Scenedesmus</i> sp. v Perniškem jezeru), smo jih pa opazili pri kvalitativnem pregledu vzorca (nekaj predstavnikov je vidnih na Slikah 7, 8 in 9).....	19
Preglednica 8: Ct vrednosti vzorcev, ki smo jih testirali s petimi različnimi začetnimi oligonukleotidi (18S, 16S, 16S-ciano, 16S-Pla, McyE).....	23

## KAZALO PRILOG

Priloga 1: Rezultati qPCR analize za gen 18S z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.....	32
Priloga 2: Rezultati qPCR analize za gen 16S z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.....	33
Priloga 3: Rezultati qPCR analize za gen 16S-ciano z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev. .....	33
Priloga 4: Rezultati qPCR analize za gen 16S-Pla z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.	34
Priloga 5: Rezultati qPCR analize za gen mcy z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.....	35

# 1 UVOD

## 1.1 Predstavitev problematike

Kot vemo, se nekatera območja na svetu že borijo s posledicami pomanjkanja vodnih virov, zato je zelo pomembno, da jih že zdaj poizkušamo ohraniti. Na kvaliteto vodnih virov vpliva ogromno dejavnikov, kot npr. antropogeni učinki, podnebne spremembe, vplivi kmetijstva in invazije potencialno toksičnih organizmov. Vse to povzroča izgubo biotske raznovrstnosti in s tem so ogrožene tudi ekosistemske storitve rek in jezer (WWT, 2016). Vodne vire uporabljamo za različne namene, v glavnem kot zajetja pitne vode, kmetijstvo, industrijo in za rekreacijo ter turizem. V Sloveniji so glavne zaloge pitne vode, ki je večinoma dobre kvalitete, v podzemnih vodah, ki so boljše zaščitene od površinskih voda. Številne države zaradi površine ali geološke sestave tal nima te možnosti in zato morajo kot vire pitne vode uporabljati površinske vodne vire (jezera, reke, zadrževalniki). Zaradi naraščanja števila prebivalstva se tudi raba vode povečuje; več kot 70 odstotkov vse porabljene vode se uporabi za kmetijstvo, ki v največji meri prispeva k obremenjenosti voda s hranili. Ker se povečujeta tudi industrija in proizvodnja hrane, je več tudi s hranili obremenjenih odpadnih voda, posledično pa je povečano tudi izpiranje hranil v površinska vodna telesa (izpiranje naravnih in umetnih gnojil, izcedne vode komunalnih odpadkov, industrijske odplake). Vode tako postanejo evtrofne, kar pomeni, da so obogatene s hranili, predvsem s spojinami dušika in fosforja (Sedmak, 2011). Evtrofikacija povzroči pospešeno rast cianobakterij, alg in drugih planktonov, kar lahko vodi do neravnovesja in posledično do poslabšanja kakovosti vode (Uradni list RS, št. 45/07). Prav zaradi evtrofikacije prihaja tudi do masovnega pojava cianobakterij in/ali alg – cvetenj. Množična cianobakterijska cvetenja ne predstavljajo negativno motnjo le za vodni ekosistem, ampak zaradi proizvodnje toksičnih metabolitov, tudi grožnjo za zdravje ljudi. Zato je pravočasno zaznavanje toksičnih vrst cianobakterij in alg z vidika ohranjanja kvalitete vodnega telesa zelo pomembno.

## 1.2 Namen in cilji

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti možnost uporabe novih molekularnih orodij zaznavanja okoljske DNK – eDNK (iz angl. environmental DNA) pri zgodnjem zaznavanju cvetenj potencialno toksičnih cianobakterij.

Želeli smo ugotoviti, ali je količina dednega materiala, ki smo jo v vodnem telesu zaznali s pomočjo molekularnih metod določevanja eDNK, v povezavi s stopnjo evtrofnosti, kar je v tesni povezavi z ekološkim stanjem vodnega telesa. Izbrali smo dve vodni telesi z različno stopnjo evtrofnosti, ter hkrati s pomočjo eDNK pridobiti informacijo o biotski raznovrstnosti s poudarkom na zaznavanju potencialno toksičnih cianobakterij. Zgodnje zaznavanje strupenih cianobakterij omogoča pravočasno opozarjanje na možnost strupenega cianobakterijskega cvetenja. Zato ta tehnika predstavlja pomemben korak k zagotavljanju varnosti zaradi zgodnjega zaznavanja okoljskih tveganj in ohranjanju vodnega okolja ter njegove biotske raznovrstnosti.

## 1.3 Hipotezi

V diplomskem delu smo si zastavili dve hipotezi:

**Hipoteza 1:** Inovativna molekularna orodja na osnovi eDNK so uporabna kot zgodnje opozorilo na prisotnost toksičnih cianobakterij.

**Hipoteza 2:** Količina dednega materiala iz vzorca površinske vode je v povezavi s stopnjo evtrofnosti vodnega telesa.

## 2 FITOPLANKTON V POVRŠINSKIH VODAH

Fitoplankton sestavljajo drobni avtotrofni organizmi, ki prosto lebdijo v vodi in se pasivno premikajo z vodnimi tokovi. So najpomembnejši oksigeni organizmi in so vključeni v biogeokemijsko kroženje ogljika v naravi. Fitoplankton, v širšem pomenu besede, je rastlinski plankton, ki vsebuje avtotrofne mikroorganizme (drobne alge in cianobakterije), ki se pri ustreznih pogojih zelo hitro razmnožujejo in so del biomase v vodah. Vsaj eno ali več vrst alg lahko najdemo v skoraj vsakem območju svežih voda, npr. v jezerih, rekah, akumulacijah, močvirjih. Najpogosteje so prisotne kot mikroorganizmi, ki jih lahko vidimo samo s pomočjo mikroskopa (Bellinger in Sigeo, 2015).

Alge so velika in raznolika skupina organizmov, ki jih lahko ločimo morfološko ali fiziološko. Čeprav so alge majhne, to še ne pomeni, da niso enako pomembne v vodnem telesu, kot so višje rastline in ribe. Če se populacija alg poveča, jih je mogoče videti s prostim očesom kot obarvano vodno telo ali gosta površinska »pena«. Morfologija alg je zelo raznolika, od posamezne celice do kompleksnih kolonij in filamentov, nekatere vrste so se sposobne tudi aktivno gibati. Alge so pomembni primarni proizvajalci tako v celinskih kot tudi v morskih sistemih, ki lahko imajo tudi negativne učinke na vodne ekosisteme. Kadar so alge prisotne v zelo velikem številu, kar je posledica prekomernega razmnoževanja oz. t.i. cvetenja vodnega telesa. Pri razgradnji cveta se voda deoksigenira, kar povzroči smrt rib in drugih organizmov. Nekateri toksini, ki jih alge lahko proizvedejo, pa so lahko smrtni za vodne in kopenske organizme. Predstavniki fitoplanktona se lahko uporabijo tudi za oceno in prepoznavanje različnih vplivov kot posledica hitrega odziva na spremembe v okolju, npr. bogatenje vodotoka s hranili (eutrofikacija), industrijsko onesnaževanje, spremembe hidrološkega režima vodnega telesa. Nekatero vrste alg so našli tudi kot fosile v geoloških usedlinah (jezerski sedimenti) in nam dajejo informacije o okoljskih spremembah iz preteklosti (Bellinger in Sigeo, 2015).

### 2.1 Cianobakterije

Cianobakterije so prokarioti, uvrščamo jih med bakterije. Ime so dobile po svojih modrozelenih (ciano) pigmentih. Cianobakterije lahko najdemo v vseh vodah, živijo pa tudi v ekstremnih okoljih, kot so puščave, vulkanski vrelci in izjemno slana območja. Cianobakterij pa ne najdemo samo v vodnih, ampak tudi v nekaterih kopenskih ekosistemih (v tleh ali pa na vlažnih površinah) (Eleršek, 2014). Združujejo lastnosti bakterij in alg (rastlin), sposobne so izrabljati svetlobo za svojo rast in razvoj, kot hrano lahko uporabljajo od preprostih soli do zapletenih organskih molekul (Sedmak, 2006). Nekatero cianobakterije imajo sposobnost fiksacije dušika, kar zelo prispeva k rodovitnosti zemlje, pomembno vlogo imajo tudi pri ohranjanju biokemičnega kroženja snovi v naravi. Cianobakterije so aerobni fotoavtotrofi, razmnožujejo se z delitvijo, njihov osnovni način za pridobivanje energije je fotosinteza.

Cianobakterije so mikroorganizmi stari okoli 3,5 milijarde let. So ene izmed najstarejših živih bitij na našem planetu in so odgovorne za nastanek zemeljske atmosfere. Že več milijard let ti organizmi ohranjajo prvotno osnovno strukturo, odkritih je bilo na stotine različnih fosilov, ki vsebujejo mikrobne ostanke, med katerimi v večini prevladujejo cianobakterije. Po morfologiji jih delimo na:

- enocelične;
- mnogocelične;
- kolonijske in
- nitaste oz. filamentozne: gre za ponavljajočo celično delitev v eni sami ravnini in tako to večcelično strukturo imenujemo trihom, ki je lahko raven ali zavit. Vegetativne celice se lahko organizirajo v heterociste. To so ciste z debelo steno in poroznim protoplastom s sposobnostjo fiksacije dušika. Ali pa v akinete, ki so velike celice z debelo steno, ki

so namenjene preživetju v neugodnih razmerah, ki je povezano s shranjevanjem rezervnih snovi.

Vse vrste cianobakterij vsebujejo klorofile in pomožne pigmente, fikocianine ali fikoeritrine. Pomožni fotosintetski pigmenti omogočajo, da lahko cianobakterije učinkovito izrabljajo tudi tiste dele svetlobnega spektra, ki jih drugi avtotrofi ne morejo. Vse imajo tudi pomembno vlogo pri biogeokemičnem kroženju snovi in proizvodnji kisika (Sedmak, 2011).

## 2.2 Cianobakterijsko cvetenje

Prekomeren razrast avtotrofnih mikroorganizmov imenujemo tudi »cvetenje«. Gre za pojav zelo visoke koncentracije fitoplanktona, v kateri so organizmi običajno ene vrste neobičajno namnoženi ali zgoščeni. Začetnega cianobakterijskega cvetenja pogosto ne moremo oz. težko opazimo s prostim očesom, lahko pa ga opazimo, ko se pojavi na površju vodnega telesa (Sedmak, 2006).

Velikokrat se cianobakterijska prekomerna razrast pojavi v vodnih zadrževalnikih. Veliko površinskih vodnih teles je zajezenih ali pa kako drugače reguliranih (nadzorovanih), kar vodnemu telesu spremeni kakovost, saj se podaljšajo zadrževalni časi, spremeni se transport sedimentov, vse to pa skupaj z eutrofikacijo lahko omogoči veliko namnoženost organizmov. Ta pojav ne ogroža samo celinskih stoječih vodnih virov, ampak je problematičen tudi za počasne reke v sušnem obdobju. Ravno to lahko privede do masovnega razrasta cianobakterij, ki so izjemno nezahtevne in običajno v eutrofnih vodah nadvladajo vsem ostalim fitoplanktonskim organizmom (Sedmak, 2011).

Veliko vrst planktonskih cianobakterij ima v svojih celicah posebne plinske vezikle, s katerimi uravnavajo lebdenje v vodnem stolpcu. Kadar se cianobakterije pomikajo proti površini vodnega telesa, to lahko povzroči do 100-kratno koncentracijo le-teh. Dodatno se lahko zgostijo tudi zaradi vetra. Ko nastane t.i. cianobakterijska gošča, je dobro vidna prostemu očesu, načeloma je lahko gošča zelene ali škrlatne barve, odvisno od pomožnih pigmentov, ki prevladujejo. Cvetenje cianobakterij je že samo po sebi škodljivo, kadar so cianobakterije, ki cvetenje povzročajo, sposobne proizvajati škodljive snovi (sekundarne metabolite) za okolje in organizme (Sedmak, 2006). Cvetenje cianobakterij je tako eden izmed dejavnikov povsem naravnega izvora, ki ogroža vodne vire. Zaradi povečane eutrofikacije voda se vse pogosteje pojavlja tudi cvetenje cianobakterij, zelo pogosto potencialno toksičnih vrst, ki svoje metabolne produkte oz. toksine ob razpadu cveta spuščajo v vodno okolje ter predstavljajo visoko tveganje za zdravje tako okolja kot tudi ljudi (Sedmak, 2011).

Pojav cianobakterijskega cvetenja je velik problem povsod po svetu, tudi v Sloveniji (Sedmak, 2011). Zato se danes na področju molekularne biologije razvijajo novi pristopi in metode za določevanje okoljske DNK – eDNK, ki so hitrejše in učinkovitejše od tradicionalnih metod, ter omogočajo ocenjevanje ekološkega stanja vodnih teles v realnem času.

## 2.3 Bioaktivne snovi cianobakterij

Cianobakterije so zmožne tvorjenja heterogene skupine metabolitov, ki so priznani kot biološko aktivne snovi oz. bioaktivne snovi. Najpomembnejše bioaktivne snovi so iz vrst peptidov, retinoidov, alkaloidov, laktonov, fosfolipidov ... Pri proučevanju bioaktivnih snovi je potrebno ponovno opredeliti pojma »toksično« in »toksin«, saj je veliko odprtih vprašanj v zvezi z biološko ravno, na kateri je toksičnost že dokazana: tkiva, molekule, strupenost za sesalce, ljudi ... Zato je lažje uporabiti izraze »nevrotoksin« in »hepatotoksin«, ki se nanašata na dobro opisane toksine, ki jih tvorijo cianobakterije (npr. mikrocistini, anatoksin-a). Škodljivih učinkov cianobakterij ni mogoče pripisati samo hepatotoksinom ali nevrotoksinom, ampak tudi drugim bioaktivnim snovem, ki imajo strupene učinke tudi na sesalce. Čeprav je bila številčnost

bioaktivnih snovi v okolju predhodno ocenjena, zaenkrat v Evropski uniji ni določena nobena smernica, ki bi opredeljevala določanje bioaktivnih snovi cianobakterij. Seveda bo v prihodnosti potrebno ovrednotiti obseg nevarnosti v povezavi s pojavom teh snovi v ekosistemu in pri sesalcih (Eleršek in sod., 2017).

## 2.4 Cianobakterijski toksini

Bioaktivne snovi cianobakterij, ki imajo toksične učinke na sesalske celice, imenujemo cianotoksini. Cianotoksini so zelo raznolika skupina naravnih strupenih snovi. Ti imajo za organizme in okolje škodljive učinke. Z vidika strupenosti predstavljajo večjo grožnjo za kopenske organizme kot pa za vodne, čeprav izvirajo iz vodnih organizmov (Eleršek, 2014). Glede na tarčo delovanja jih delimo na ciklične peptide (hepatotoksine), alkaloide (nevrotoksine), citotoksine in endotoksine (Sedmak, 2011). Pri višjih organizmih se učinki lahko opišejo kot hepatotoksičnost (vplivajo na delovanje jetrnih celic; npr. mikrocistini), nevrotoksičnost (vplivajo na prenos živčnih signalov; npr. anatoksin), dermatotoksičnost, genotoksičnost in inhibicija proteinske sinteze (Eleršek, 2014).

Cianotoksini delujejo na različne načine:

- ciklični peptide mikrocistinskega tipa so usmerjeni predvsem na jetra,
- alkaloidi so usmerjeni na živčni sistem,
- lipopolisaharidi učinkujejo na kožo in sluznice (Sedmak, 2011).

Nekateri izmed najbolj poznanih in raziskanih cianotoksinov, ki imajo negativne učinke na okolje in ljudi, so mikrocistini, anatoksini, cilindrospermopsini in saksitoksini. Mikrocistini spadajo med monociklične heptapeptide, ki učinkujejo zelo podobno kot okadaična kislina, ki je prisotna v dinoflagelatih (Bubik, 2012).

Organizmi so tem biološko aktivnim snovem izpostavljeni na različne načine; ljudje prihajamo z njimi v stik preko pitne vode, hrane, aerosolov in pri rekreaciji oziroma vodnih športih. Bolj so jim izpostavljeni fitoplanktonski organizmi in vodne živali, saj so v neposrednem stiku z biološko aktivnimi snovmi cianobakterij. Ostale živali so jim lahko izpostavljene preko aerosolov, pitne vode ter hrane, rastline pa preko namakalnih sistemov. Vnos toksina v organizem poteka na različne načine:

- z vdihavanjem,
- preko kože,
- z zaužitjem toksina, ki je prisoten v vodi ali hrani.

Po zaužitju večjih količin cianotoksinov se navadno pri ljudeh pričnejo kazati znaki, kot so bruhanje, driska, omrtvičenost, glavobol, poškodbe jeter, ledvic, pljuč ... (npr. Codd G. in sod., 1999).

### 3 METODE DOLOČEVANJA FITOPLANKTONA

Monitoring voda in posledično tudi ekološko stanje voda se v Sloveniji izvaja že več kot 30 let. Od leta 2000 monitoring ureja evropska Vodna direktiva (WFD). Ekološko stanje voda se ugotavlja s pomočjo bioloških, fizikalno-kemijskih, hidromorfoloških ter kemijskih elementov kakovosti. Vodna telesa se spremlja in vrednoti v skladu z WFD, Uredbo o stanju površinskih voda (Uradni list RS, št. 14/09, 98/10, 96/13 in 24/16), (Uredba o stanju površinskih voda 2016) in Pravilnikom o monitoringu stanja površinskih voda (Uradni list RS, št. 10/09, 81/11 in 73/16), (Pravilnik o monitoringu stanja površinskih voda 2016).

Fitoplankton je eden izmed pomembnih bioloških elementov kakovosti jezer. Vzorčenje, laboratorijska obdelava vzorcev in določitev ekološkega stanja so predpisani z Metodologijo vzorčenja in laboratorijske obdelave fitoplanktona za vrednotenje ekološkega stanja jezer v Sloveniji (Uredba o stanju površinskih voda in Pravilnik o monitoringu stanja površinskih voda 2016).

#### 3.1 Klasični načini morfo-taksonomije

Za lažje prepoznavanje organizmov v vodnih telesih se za identifikacijo organizmov uporabljajo t.i. taksonomske kategorije (Sedmak, 2011). Cianobakterije je zelo težko razvrščati v taksonomske kategorije, kljub temu, da spadajo med relativno majhno skupino glede na število vrst (število se giblje nekje od sto do nekaj tisoč vrst – odvisno od taksonomskega sistema). Razvrščanje je težavno ravno zaradi tega, ker med sorodnimi taksoni ni preprostih morfoloških razlik in celice so izjemno majhne – povprečno organizmi v premeru merijo okoli 1 mikrometer (Eleršek, 2014). Tradicionalni monitoring po Vodni direktivi ima tudi svoje omejitve, kot so: zamuden čas, omejena prostorska in časovna ločljivost in nagnjenost k napakam oz. različnosti subjektivne zaznave posameznega taksonomskega strokovnjaka in njegovega znanja. Napredek molekularnih genomskih orodij bi zgoraj omenjene probleme rešil in dopolnil (Lesse, 2016).

#### 3.2 Sodobni molekularni pristopi

V zgodnjih 70-tih letih so se pričeli razvijati različni molekularni pristopi v biologiji, tudi na področju fitoplanktona. Najprej so razvili molekularne tehnike za odkrivanje in razločevanje fitoplanktonskih organizmov s pomočjo različnih označevalcev – markerjev (ogljikovi hidrati, toksini, beljakovine in nukleinske kisline), (Xiao in sod., 2014).

Tehnološki napredek je kasneje zagotovil razvoj orodja za odkrivanje vrst z uporabo prisotne deoksiribonukleinske kisline (DNK) v vodnih oz. kopenskih okoljih (okoljska DNK oz. eDNK) (Valentini in sod., 2016). Detekcija vrst na podlagi eDNK je pokazala večjo sposobnost zaznavanja in boljšo stroškovno učinkovitost v primerjavi s tradicionalnimi morfološko-taksonomskimi metodami. Poznamo več pristopov, ki temeljijo na uporabi oziroma zaznavanju eDNK:

- specifičen pristop oz. eDNK barkodiranje z uporabo oligonukleotidov, ki so specifični za posamezno vrsto (cilj pristopa je odkrivanje posameznih vrst v okolju),
- multispecifičen pristop oz. metabarkodiranje eDNK (cilj pristopa je sočasna identifikacija več taksonov iz okoljskega vzorca, brez predhodnega poznavanja vrste, ki bo najverjetneje prisotna v vzorčenem ekosistemu) in
- pristop z uporabo oligonukleotidov, ki so specifični za določeno taksonomsko skupino; to so metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS, ang. next generation sequencing), (Valentini in sod., 2016).

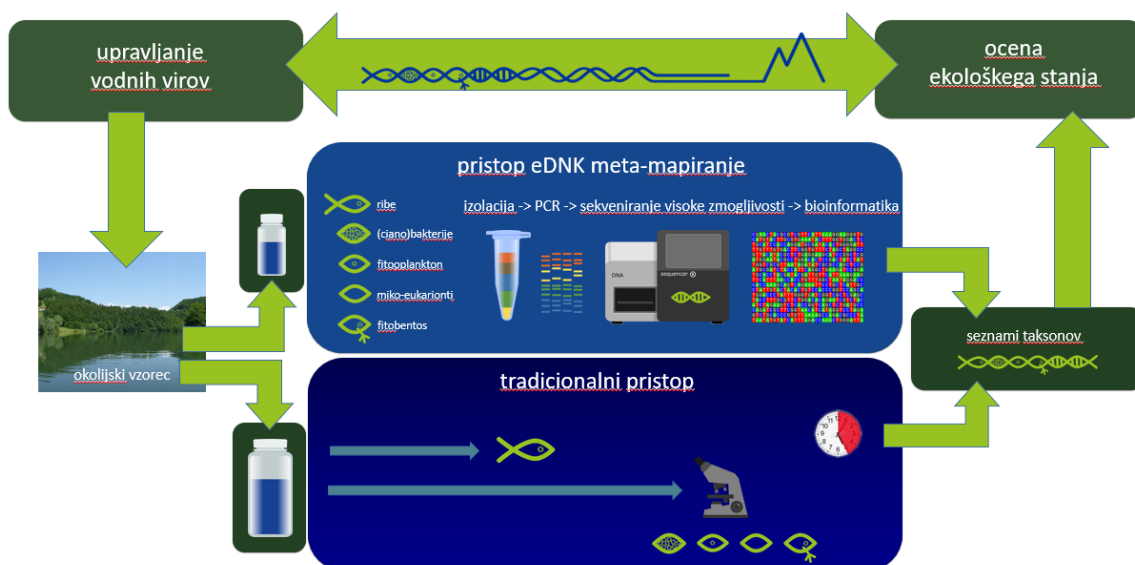
Za večje vodne organizme, kot so npr. ribe, je v nasprotju s klasičnimi metodami raziskav prednost metode eDNK predvsem neinvazivnost, saj pri tem načinu ne spreminjamo, motimo ali ubijemo organizmov. Za vse skupine organizmov velja, da se hkrati tudi zmanjša tveganje za nenamerna širjenja bolezni in tujih vrst v druga okolja (Valentini in sod., 2016).

### 3.3 Sodobni molekularni pristopi za zaznavanje cianobakterij

Ena izmed pogosto uporabljenih in pomembnih sodobnih molekularnih orodij danes je verižna reakcija s polimerazo (PCR, ang. polimerase chain reaction), razvijajo se tudi nove metode metabarkodiranja in metode sekveniranja nove generacije (NGS). Ta orodja so v molekularni biologiji izjemno pomembna, saj nam omogočajo nov temeljitejši in hitrejši način vpogleda v ekološko dinamiko. Uporaba PCR metode, novih metod metabarkodiranja in metod NGS nam lahko pomagajo zaznati in odkriti cianobakterije pred njihovim masovnim pojavljanjem, hkrati pa bi lahko te metode dopolnile oz. nadgradile tradicionalne morfo-taksonomske metode. Analize eDNK namreč omogočajo tudi analizo in identifikacijo toksigenih cianobakterij, zgodnje odkrivanje invazivnih vrst alg in identifikacijo alg. Uporaba teh metod je koristna tudi za oceno ekološkega stanja vodnih virov, saj je metoda hitrejša in bolj učinkovita kot tradicionalna morfološka zaznava (Bush in sod., 2017).

Posledica cvetenj cianobakterij in sproščanja sekundarnih metabolitov v vodno telo je tudi zmanjšana biotska raznovrstnost in slabše ekološko stanje (Cvitanič in sod., 2016). Sedaj se za oceno ekološkega stanja in opazovanje biotske raznovrstnosti za biološki element »alge« uporabljajo le morfo-taksonomija, ki temelji na analizi vrstne sestave fitoplanktonske in fitobentoške združbe, zato je v prihodnje potrebno začeti uporabljati tudi sodobnejše pristope, ki omogočajo specifično zaznavo strupenih cianobakterij (Lesse, 2016).

Zgoraj omenjeno problematiko naslavlja tudi mednarodni projekt Eco-AlpsWater, ki se izvaja v okviru programa Interreg Alpine Space (Slika 1). Eden ključnih ciljev je namreč razvoj molekularnega orodja na osnovi eDNK, s katerim bi v prihodnosti omogočili še boljše upravljanje z vodami, hkrati so takšna orodja primerna tudi za preventivno spremljanje in zgodnje opozarjanje na tveganje zaradi strupenih cianobakterij. V projektu sodeluje tudi Nacionalni inštitut za Biologijo, ki mi je omogočil izvedbo vseh eksperimentov.



Slika 1: Primerjava tradicionalnega pristopa in novih molekularnih orodij pri določevanju ocene ekološkega stanja, ki je osnova za upravljanje vodnih virov (Avtor: Eco-AlpsWater, Eleršek, 2018).



## 4 MATERIALI IN METODE

### 4.1 Vzorčenje

V diplomskem delu smo analizirali Velenjsko in Perniško jezero, ki smo ju vzorčili v spomladanskem času (marec 2019). Pri vsakem vzorčenju smo vzeli približno 6 l vzorca, v vodnem telesu pa smo istočasno izmerili še različne fizikalno-kemijske parametre: temperatura zraka, temperatura jezera, pH, prevodnost, motnost, količino raztopljenega kisika v jezeru.

### 4.2 Ekološko stanje Velenjskega in Perniškega jezera

Velenjsko jezero spada med Šaleška jezera, ki so nastala zaradi degradacije okolja kot posledica izkopavanja lignita v Premogovniku Velenje. Tri jezera, poleg Velenjskega še Škalsko in Družmirsko jezero, so nastala zaradi ugrezanja. Velenjsko jezero je s površino 1,4 km<sup>2</sup> in prostornino 20,5 milijonov m<sup>3</sup> zaenkrat največje jezero izmed teh treh, globoko je 54 m. V preteklosti so nasip med Velenjskim in Družmirskim jezerom ohranjali in utrjevali z elektrofiltrskim pepelom, ki je stranski produkt kurjenja premoga v Termoelektrarni Šoštanj, imeli so tudi direkten iztok pepelne mešanice v jezero. Prav to je pripeljalo do velikega onesnaževanja, takrat je bilo jezero turkizne barve in je imelo izredno visok pH (11). Po sanaciji območja (zgradili so zaprt krogotok tako, da se je voda vračala nazaj v Termoelektrarno Šoštanj) se je kvaliteta vode v jezeru že v prvem letu zelo izboljšala. Počasi pa se je ponovno vzpostavilo naravno ravnovesje (Šterbenk in sod., 2004). Ekološko stanje Velenjskega jezera je bilo leta 2016 zmerno. Velenjsko jezero je preobremenjeno z organskimi snovmi, kar se odraža v zelo slabih kisikovih razmerah. Koncentracija celotnega fosforja je 2016 znašala 83 µg P/l<sup>-1</sup>. Poleg tega so v jezeru stalno prekoračene vrednosti sulfatov (SO<sub>4</sub>) – povprečna letna koncentracija 590 mg/l. Problematična je tudi visoka vrednost molibdena (Mo) – povprečna letna koncentracija 88 µg/l (Dolinar in sod., 2018).

Perniško jezero spada med akumulacijska jezera in se razprostira med naseljema Vukovje in Vosek. Jezero je razdeljeno na dva dela, ki ju ločuje ozka pregrada. Površina obeh delov znaša 2,03 km<sup>2</sup>, povprečno je jezero globoko 3 m. V Perniško jezero se stekata dva potoka in reka Pesnica (Medmrežje 1). Leta 2016 je bilo ekološko stanje, ki upošteva več različnih bioloških elementov, Perniškega jezera slabo. Prav tako je bilo slabo tudi ekološko stanje samo na podlagi biološkega elementa fitoplankton, kar je pomembno za interpretacijo naših rezultatov. Perniško jezero je preobremenjeno s hranili. Izmerjene so bile visoke koncentracije celotnega fosforja; vrednost celotnega fosforja je 125 µg P/l<sup>-1</sup> (Dolinar in sod., 2018).

Na podlagi OECD kriterijev je Velenjsko jezero eutrofn, saj je koncentracija fosforja 83 µg P/l<sup>-1</sup>, Perniško jezero pa hipereutrofn, saj koncentracija fosforja presega 100 µg P/l<sup>-1</sup> (Preglednica 1).

Preglednica 1: Lestvica za določanje evtrofičnosti vodnega telesa (povzeto po Ambrožič in sod., 2008 in OECD, 1982).

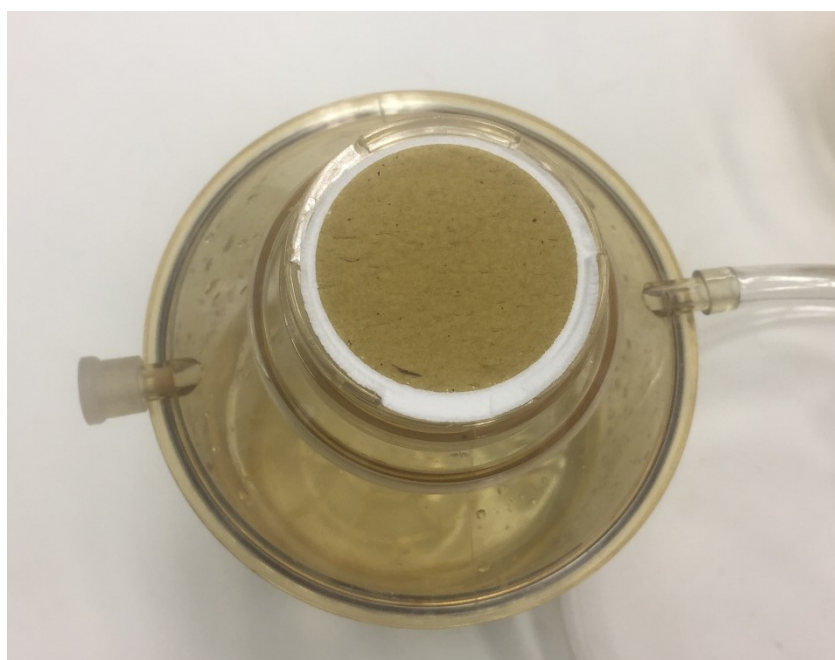
OECD KRITERIJI						
Trofična stopnja	Celotni fosfor (povprečje)	Anorganski dušik (povprečje)	Prosojnost (povprečje)	Prosojnost (minimum)	Klorofil a (povprečje)	Klorofil a (maksimum)
STANJE jezera	( $\mu\text{g P/L}$ )	( $\mu\text{g N/L}$ )	(m)	(m)	( $\mu\text{g/L}$ )	( $\mu\text{g/L}$ )
U-oligotrofno	< 4	< 200	> 12	> 6	< 1	< 2,5
Oligotrofno	< 10	200 - 400	> 6	> 3	< 2,5	< 8
Mezotrofno	10 - 35	300 - 650	6 - 3	3 - 1,5	2,5 - 8	8 - 25
Evtrofno	35 - 100	500 - 1500	3 - 1,5	1,5 - 07	8 - 25	25 - 75
Hiperevtrofno	> 100	> 1500	< 1,5	< 0,7	> 25	> 75

### 4.3 Priprave vzorcev

#### 4.3.1 Priprava vzorca za merjenje klorofila

Za določevanje klorofila v vzorcu smo uporabili metodo ekstrakcije z etanolom (EtOH) (SIST ISO 10260, 2001). Pri vzorcu Velenjskega jezera smo vzeli 1000 ml vzorca in ga prefiltrirali skozi Glass-Microfibre Discs filter (GF/C), ki smo ga namestili na filtrirno napravo. S pomočjo podtlaka, ki nam je omogočil filtracijo vzorca. Po filtraciji celotnega vzorca, smo s pinceto filter odstranili in ga prenesli v stekleno epruveto, jo ustrezno označili ter vanjo dodali še 10 ml 90 % EtOH. Stekleno epruveto smo zaprli in shranili v zmrzovalnik.

Pri pripravi vzorca Perniškega jezera smo skozi GF/C filter prefiltrirali manj vzorca, 400 ml, in ponovili enak postopek kot zgoraj (Slika 2).



Slika 2: GF/C filter po filtraciji Perniškega jezera (Zabukovnik, 2019).

#### 4.3.2 Priprava vzorca za izolacijo eDNK

Pri pripravi vzorca za izolacijo eDNK smo vsak vzorec prefiltrirali skozi Sterivex filter (Sterivex, Qiagen, Nemčija). S pomočjo 50 ml brizge smo počasi filtrirali vzorec. Postopek polnjenja brizge smo ponavljali, dokler se pore v Sterivex filtru niso zamašile (z brizgo nismo morali več potiskati vzorca skozi filter). Brizgo smo zavrgli, Sterivex filter smo prenesli v označeno vrečko ter ga shranili pri -20°C. Vzorec Perniškega jezera smo prefiltrirali hitro in uporabili le 100 ml vzorca, ko se je Sterivex filtrska kolona popolnoma zamašila. Vzorec Velenjskega jezera smo filtrirali dlje časa in uporabili smo 3000 ml vzorca (60 x 50 ml). Pri količini 3000 ml smo s filtriranjem končali, kljub temu, da se pore na filtru niso povsem zamašile, filter se je le rahlo obarval.

#### 4.4 Določitev koncentracije klorofila

Koncentracijo klorofila smo določali po metodi z etanolom (SIST ISO 10260, 2001): Najprej smo predpripravljen vzorec (poglavje 4.2.1.) vzeli iz zmrzovalnika in ga ekstrahirali v vodni kopeli na 75°C za 5 minut. Vzorec smo zatem pustili 15 minut na sobni temperaturi in ga odcentrifugirali pri 4000 obratih/min in supernatantu izmerili absorbanco pri 665 in 750 nm. Vzorec smo zakisali. Desetim ml vzorca smo dodali 0.01 ml 3M HCl in ponovno izmerili absorbanco pri 665 in 750 nm v časovnem razmiku od 5 do 30 minut. Koncentracijo klorofila a smo nato izračunali po formuli:

$$\text{Klorofil a} = \frac{(A - A_a)}{K_o} \times \frac{R}{R-1} \times \frac{10^3 V_e}{V_s \times d} \text{ (}\mu\text{g/l)}$$

A  $A_{665} - A_{750}$  (pred zakisanjem)

$A_a$   $A_{665} - A_{750}$  (po zakisanju)

$V_e$  volumen ekstrakta v ml

$V_s$  volumen filtrata v litrih

$K_c$  koeficient 82l/ $\mu\text{g cm}$

R 1.7 (faktor/koficient)

d dolžina kivete (cm)

#### 4.5 Morfološko-taksonomska analiza

Sveža (nativna) vzorca smo pregledali pod mikroskopom in semi-kvalitativno določili prisotne fitoplanktonske vrste. Uporabili smo določevalne ključe, ki so predpisani v Metodologiji za analizo vzorcev fitoplanktona (Uredba o stanju površinskih voda 2016). Vzorce smo koncentrirali s pomočjo Hydro-Bios kompleta. Vzorec smo iz začetnega volumna 100 ml skoncentrirali na 2973  $\mu\text{l}$ . Za nadaljnjo obdelavo smo koncentrat vzorca fiksirali s paraformaldehidom. Določili smo vrste in jih šteli pod mikroskopom s števno komoro Nageotte (merjeno pri 40x povečavi). Število prešteti polj je bilo prilagojeno gostoti določene vrste. V enem Nageotte polju je bilo 1,25  $\mu\text{l}$  koncentriranega vzorca, to pomeni, da 1 celica v koncentratu v enem Nageotte polju odgovarja 23.784 celicam v 1 ml izhodnega vzorca. Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pod 40x, 100x in 400x povečavami in fotografije posneli s pomočjo kamere Cmax 5 PRO (Euromex).

## 4.6 Izolacija eDNK

Postopek izolacije eDNK smo izvajali v digestoriju, ki smo ga predhodno dezinficirali z UV svetlobo. Izolacijo eDNK smo izvedli s pomočjo predpripravljenega kompleta in protokola DNeasy PowerWater Sterivex Kit (Sterivex, Quiagen, Nemčija). Uporabili smo sterilen kemijski inventar ter pipetne nastavke s filtri. S pipetnimi nastavki se membrane v Sterivex filtru nismo dotikali.

1. Odstranili smo zgornji pokrovček Sterivex filtra, ki je bil napolnjen z vzorcem (poglavje 4.2.2.) in dodali 0,9 ml ST1B raztopine, ki smo ji predhodno dodali raztopino ST1A. ST1B raztopina omogoča sproščanje celic, ki pomaga odstraniti celice iz membrane, nato pa lahko celice v suspenziji lizirajo.
2. Z zgornjim pokrovčkom smo zaprli dovod Sterivex filtra in ga horizontalno položili na vorteks stresalnik, tako da je bil zgornji pokrovček Sterivex filtra na zunanji strani.
3. Vorteks smo nastavili na minimalno hitrost za 5 minut.
4. Nato smo Sterivex filter na vorteksu obrnili za 180° od prvotne pozicije in ga ponovno vklopili na minimalno hitrost za 5 minut.
5. Sterivex filter smo odstranili z vorteksa, ponovno odvili zgornji pokrovček ter dodali 0,9 ml tople MBL raztopine. Pred tem smo jo cca. 5–10 minut segrevali na 65°C. Nato smo Sterivex filter zaprli z zgornjim pokrovčkom.  
MBL raztopina je močan lizirni reagent, ki vsebuje detergent za lomljenje celičnih sten in odstranitev organskih in anorganskih snovi, ki niso DNK.
6. Sterivex filter smo inkubirali v vodni kopeli na 90°C za 5 minut. Ogrevanje filtrirnih enot Sterivex™ izboljšuje lizo celic organizmov, ki so lahko odporni na reagente za lizo in mehanske poškodbe. Ti vsebujejo raztopino za sproščanje bakterij (ST1B) in reagent za lizo (MBL).
7. Sterivex filter smo ohladili na sobni temperaturi za 2 min.
8. Horizontalno smo Sterivex filter namestili na vorteks, tako da je bil zgornji pokrovček na zunanji strani.
9. Vorteks smo nastavili na maksimalno hitrost za 5 minut.
10. 3 ml brizgalko smo napolnili z 1 ml zraka in jo namestili na dovod Sterivex filtra. S potiskanjem zraka v Sterivex filter smo ustvarili upor, ta je iz filtra iztisnil lizat. Tega pa smo ujeli v 2,2 ml mikrocentrifugirko.
11. Lizat smo nato prelili v 5 ml mikrocentrifugirko Power Bead s steklenimi kroglicami (pomagajo razbiti celice). Namestili smo jo horizontalno na vorteks.
12. Nastavili smo maksimalno hitrost za 5 minut. Nato pa smo vzorce centrifugirali na 4000 x g za 1 minuto.
13. S pomočjo pipete smo prenesli supernatant v 2,2 ml mikrocentrifugirko.
14. Dodali smo 300 µL IRS raztopine in nato dali mikrocentrifugirko na vorteks, da se premeša, zatem pa smo inkubirali na 4°C za 5 min.  
IRS je drugi reagent za odstranitev dodatnega organskega in anorganskega materiala, ki ni DNK, vključno s huminskimi kislinami, celičnimi ostanki in beljakovinami. Pomembno je, da odstranimo tiste, ki onesnažujejo organske in anorganske snovi in lahko zmanjšajo čistost DNK ter zavirajo nadaljnje aplikacije DNK.
15. Mikrocentrifugirko smo centrifugirali na 13,000 x g za 1 minuto in supernatant prenesli v 5 ml mikrocentrifugirko.
16. Na MB kolono s filtrom smo namestili podaljšek, ki omogoča prenos večjega volumna tekočine na kolono.
17. Podaljšek in MB kolono smo namestili na stojalo za vakumsko črpalko.
18. V mikrocentrifugirko s supernatantom smo dodali 3 ml MR raztopine, ki smo jo predhodno segreli na 65°C, 5–10 min. Segrevati jo je potrebno, da se oborine raztopijo. Uporabiti jo je treba še segreto, v obratnem primeru se lahko vezna kolona zamaši. Vzorec smo potem premešali na vorteksu.  
MB je raztopina soli visoke koncentracije. DNK se močno veže na silicijev dioksid pri visokih koncentracijah soli. Raztopina MR prilagodi koncentracijo soli, da selektivno

dovoli vezavo DNK na membrano silikatnega filtra. Medtem, ko ne-DNK organskemu in anorganskemu materialu (ki je še vedno lahko prisoten v nizkih koncentracijah) prepreči vezavo.

19. V podaljšek in MB kolono smo prenesli 4,5 ml supernatanta.
20. Ko smo vključili vakum, smo omogočili, da je lizat prešel skozi filter.
21. Odstranili smo podaljšek in ga zavrgli.
22. Zatem smo v MB kolono dodali 0,8 ml EtOH in ustvarili vakum, da je lahko popolnoma stekel skozi.  
EtOH je namenjen predpranju. To pomaga odstraniti ostanke nečistoč v in zagotovi višjo čistost in izkoristek DNK.
23. V MB kolono smo dodali 0,8 ml predhodno pretresene PW raztopine, nato pa ustvarili vakum in počakali, da je vse steklo skozi. Počakali smo še, da je vakum membrano posušil (cca. 1 minuto).  
PW je pralna raztopina na osnovi alkohola in se uporablja za nadaljnje čiščenje DNK. DNK je vezana na membrano silikatnega filtra v vezavni koloni. Ta pralna raztopina odstrani preostalo sol in druge nečistoče, hkrati pa omogoča, da DNK ostane vezana na membrano silikatnega filtra.
24. Dodali smo 0,8 ml EtOH v MB kolono, naredili vakum, in počakali, da je steklo vse skozi. Nato pa počakali še 1 minuto, da se je membrana posušila.  
EtOH oz. etanol zagotavlja popolno odstranitev raztopine ST6. Posledično imamo višjo čistost in večji izkoristek DNK.
25. Izklopili smo vakum.
26. Odstranili smo MB kolono in jo namestili na 2,2 ml mikrocentrifugirko. Centrifugirali smo jo na 13,000 x g za 2 minuti, da se je membrana osušila. Centrifugirali smo zato, da se odstrani preostali EtOH. Bistvenega pomena je, da odstranimo vse sledi izpiralne raztopine, ker lahko etanol v vzorcu moti številne nadaljnje aplikacije DNK.
27. MB kolono smo prenesli na novo 2,2 ml mikrocentrifugirko in dodali 100 µl raztopine EB. Centrifugirali smo na 13,000 x g 1 minuto.
28. MB kolono smo odstranili in zavrgli. Mikrocentrifugirko smo označili in hranili v zmrzovalniku na -20°C.



Slika 3: Prefiltrirana vzorca Perniškega jezera in Velenjskega jezera skozi Sterivex filter (Zabukovnik, 2019).

## 4.7 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo – qPCR

Kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času je zelo natančna in občutljiva metoda, ki nam omogoča določanje relativne količine tarčne DNK v vzorcu. V osnovi gre za verižno reakcijo z DNK polimerazo, ki ciklično prepisuje DNK v vzorcu, količina katere se zato v vsakem ciklu približno podvoji. Aparat po vsakem ciklu pomnoževanja zazna fluorescentni signal, ki nastaja med pomnoževanjem produkta PCR. Količina fluorescence, ki se sprosti v pomnoževalnih ciklih, je sorazmerna količini produktov nastalih od začetka reakcije do trenutka meritve. Specifičnost reakcije za določen gen zagotavlja par začetnih oligonukleotidov, ki se prilega specifičnima mestoma v tem genu, encim DNK polimeraza pa pomnožuje zaporedje nukleotidov med tema dvema mestoma (povzeto po Bubik, 2012).

Uporabili smo 5 različnih parov začetnih oligonukleotidov:

1. 16S-ciano, ki omogoča zaznavanje cianobakterij v vzorcu;
2. 16S rDNK, ki definira količino prokariotskih organizmov v vzorcu;
3. 16S-Pla, ki omogoča zaznavo predstavnikov rodu *Planktothrix* s potencialom za sintezo mikrocistinov;
4. McyE, ki omogoča zaznavo vseh cianobakterij s potencialom za sintezo mikrocistinov;
5. 18S rDNK, ki definira količino evkariotskih organizmov v vzorcu.

Lastnosti posameznih začetnih oligonukleotidov so zbrane v Preglednici 2.

Za zaznavanje potencialnih proizvajalcev mikrocistinov smo uporabili dva različna para začetnih oligonukleotidov; McyE in 16S-Pla. McyE naj bi pomnoževal gene *mcyE* v vseh cianobakterijskih vrstah, medtem ko naj bi bil 16S-Pla specifičen za gene *mcyE* v predstavnikih rodu *Planktothrix*. Rod *Planktothrix* je v Sloveniji sicer običajno prisoten v alpskih jezerih in rekah, vendar smo se za namene raziskovalnega dela odločili, da vključimo oba para začetnih oligonukleotidov.

Pri začetnih oligonukleotidih 18S rDNK in 16S rDNK smo uporabili TaqMan kemijo. Pri metodi TaqMan poleg začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na specifična zaporedja tarčne DNK, dodamo reakciji še sondo, ta se veže na del nukleotidnega zaporedja med obema začetnima oligonukleotidoma. Na 5' koncu sonde je pripeto fluorescentno barvilo, na 3' koncu pa zaviralec signala, ki pobira svetlobo izsevano z barvila. Dokler sta obe molekuli vezani na sondo, zaviralec polovi vso svetlobo, ki jo oddaja fluorescentno barvilo. Ko DNK polimeraza pri prepisovanju DNK naleti na vezano sondo, jo s svojo eksonukleazno aktivnostjo razgradi. Pri tem se sprostita nukleotida z barvilom in zaviralcem (nista več tesno skupaj) in lahko zaznamo fluorescentni signal sporočevalnega barvila (povzeto po Bubik, 2012).

Pri začetnih oligonukleotidih 16S-ciano, 16S-Pla, McyE pa smo uporabili SYBR Green kemijo. Metoda SYBR Green namesto fluorescentno označene sonde uporablja barvilo SYBR Green, ki ima visoko afiniteto vezave na dvoverižno DNK. Barvilo SYBR Green ne fluorescira v raztopini in začne oddajati fluorescenco šele po vezavi na dvoverižno DNK. Z naraščanjem količine dvoveržnega PCR produkta narašča tudi fluorescenca SYBR Green, ki jo aparat zazna (povzeto po Bubik, 2012).

Rezultat qPCR analize je med drugim tudi Ct vrednost. Le-ta označuje cikel, v katerem količina produkta naraste dovolj, da signal lahko zaznamo. Vrednost Ct za posamezno reakcijo je odvisna od količine DNK, ki je prisotna na začetku reakcije. Večja kot je, manj ciklov je potrebnih, da dobimo dovolj intenziven signal, ki ga lahko zaznamo.

Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov.

Začetni oligonukleotid	Začetni oligonukleotid »naprej«	Zaporedje začetnega oligonukleotida »naprej«	Začetni oligonukleotid »nazaj«	Zaporedje začetnega oligonukleotida »nazaj«	Zaporedje sonde	Pričakovana dolžina	Referenca
18S	komercialno dostopen kit: Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VIC™/MGB probe, primer limited) (Applied Biosystems);						
16S	16S-F	GGAGTACGGC CGCAAGGT	16S-R	CATGCTCCACCG CTTGTG	AAAACCTCAAATGAA TTGACG	ni podano	Mahnič, 2012.
16S - ciano	cyano-real16SF	AGCCACACTG GGACTGAGAC A	cyano-real16SR	TCGCCCATTGCG GAAA	/	80 bp	Al-Tebrineh in sod., 2010.
16S-Pla	McyE-F2	ATCCAAGTCTG CTGTAAAGA	16S-plaR3	CTCTGCCCTACT ACACTCTAG	/	248 bp	Ostermaier. V., Kurmayer. R. 2009.
McyE	McyE-F2b	TGAAATTTGTG TAGAAGGTG	McyE-R4	AATTCTAAAGCCC AAAGACG	/	810 bp	Rantala in sod., 2004, Rantala in sod., 2008.

Potek metode:

Kvantitativni PCR (qPCR) je potekal z napravo ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System. Naš qPCR protokol pa je potekal po naslednji shemi:

- 2 min na 50°C, 10 min na 95°C (iniciacija – aktivacija DNK polimeraze, začetna denaturacija dvoverižne DNK),
- 45 ponovitev,
- 15 s na 95°C (denaturacija dvoverižne DNK),
- 1 min na 60°C (prileganje začetnih oligonukleotidov, elongacija – podaljševanje verige).

Za preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov pri kemiji SYBR Green smo na koncu protokola dodali še disociacijo pri 15 s na 95°C, 15 s na 60°C in 15 s na 95°C.

Reakcije pomnoževanja smo izvedli na mikrotitrski plošči s 384 luknjicami, kjer smo v vsako luknjico nanесли 8 µL reakcijske mešanice.

Reakcijske mešanice so vsebovale naslednje količine reagentov:

- pri 18S rDNK 2,50 µL vode, 5,00 µL 2x TaqMan Universal master mix (Applied Biosystems) in 0,50 µL Primer/probe mix (20x) (Applied Biosystems),
- pri 16S 2,15 µL vode, 5,00 µL 2x TaqMan Universal master mix (Applied Biosystems), 0,30 µL 16S\_F (30 µM), 0,30 µL 16S\_R (30 µM) in 0,25 µL 16S\_S (10 µM),
- pri 16S-ciano, 16S-Pla in McyE pa 1,20 µL vode, 5,00 µL uni SYBR green master mix, 0,90 µL 16S-ciano\_F (10 µM) in 0,90 µL 16S-ciano\_R (10 µM).

Nato smo dodali še po 2 µL vzorca DNK. Po 10 µL končne reakcijske PCR mešanice smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščico s 384 luknjicami v zaporedju, ki ga prikazuje Preglednica 3.

Preglednica 3: Postavitev vzorcev na testno ploščico.

1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x	1 10x
1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x	1 100x
2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x	2 10x
2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x	2 100x
												3 10x	3 10x		
						4 10x	4 10x		4 10x	4 10x					
PC 18S	PC 18S		PC 16S	PC 16S											
5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x	5 10x
NTC1	NTC2		NTC1	NTC2		NTC1	NTC2		NTC1	NTC2		NTC1	NTC2		
18S			16S				16S-ciano			16S-Pla			mcyE		

Legenda vzorcev:

1 – Perniško jezero (10x redčen vzorec, 100x redčen vzorec)

2 – Velenjsko jezero (10x redčen vzorec, 100x redčen vzorec)

3 – Koseški bajer – pozitivna kontrola za McyE (10x redčen vzorec)

4 – *Planktothrix rubescens* cvet, Blejsko jezero (10x redčen vzorec) – pozitivna kontrola za 16S-ciano in 16S-Pla



5 – slepa kontrola oz. ozadje (kontrola DNK izolacije, ki nam pove, če smo imeli kontaminacijo med izolacijo. Postopek izolacije je bil isti kot pri testiranih vzorcih, delali smo vzporedno izolacijo, samo da smo namesto vzorca jezera prefiltrirali sterilno vodo).

NTC – negativna kontrola, reakcija z vodo brez nukleaz namesto DNK vzorca (ang. no template control),

PC 18S – pozitivna kontrola za 18S

PC 16S – pozitivna kontrola za 16S

Oranžna barva – 18S

Modra barva – 16S

Vijolična barva – 16s-ciano

Turkizna – 16s-Pla

Zelena – McyE

#### 4.8 Disociacijske krivulje

Analiza disociacijske krivulje se izvede po qPCR analizi z namenom ocene specifičnosti pomnoženih produktov glede na njihove disociacijske lastnosti. Os x prikazuje temperaturo, os y pa fluorescenco (F). Temperatura disociacije je odvisna od dolžine pomnožene DNK in vsebnosti G:C in pufr. Najvišja točka krivulje (vrh) predstavlja temperaturo disociacije, pri kateri je ~ 50% DNK v obliki enojne vijačnice (Bergkvist in sod., 2013). To pomeni, da bosta imela dva PCR produkta, ki nista enaka, drugačno temperaturo disociacije. Pri specifičnem pomnoževanju naših tarčnih produktov pričakujemo, da bodo vsi produkti enaki oz. vsaj zelo podobni. Sklepamo, da bodo imeli vsi DNK produkti enako temperaturo disociacije (torej samo en vrh na grafu). Če je teh vrhov več, pomeni, da se nam je pomnoževalo tudi nekaj, kar ni naša tarča; torej so nastali nespecifični produkti.

#### 4.9 Ocena kakovosti in količine DNK s tehniko »Nanodrop«

Količino DNK in podatke o njeni čistosti smo določili s spektrofotometrom NanoDrop NT-1000 (Thermo Fisher Scientific, ZDA), ki na osnovi absorbanca pri 260 nm izračuna koncentracijo DNK, iz razmerja absorbanca pri 260 nm in 280 nm pa določi čistost DNK v vzorcu (povzeto po Bubik, 2012).

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Fizikalno-kemične lastnosti vzorcev vode

Vzorčenje na Velenjskem in Perniškem jezeru je potekalo spomladi, marca 2019. Sočasno z odvzemom vzorca za izolacijo eDNK smo izmerili več fizikalno-kemijskih parametrov, ki so zapisani v Preglednicah 4 in 5.

Okolica Velenjskega jezera je na južni strani urejena, saj je tam mestna plaža (tam smo tudi vzorčili – Slika 4), severna in vzhodna stran sta poraščeni z drevjem in obvodnimi rastlinami, kot je rogoz. Na zahodni strani pri nasipu med jezeri je območje vidno degradirano.

Okolica Perniškega jezera je v večini porasla z drevjem in obvodnimi rastlinami, na južnem delu se nahaja zbiralnik, kjer je zapora. Tam smo Perniško jezero tudi vzorčili (Slika 5).



Slika 4: Vzorčenje Velenjskega jezera (Zabukovnik, 2019).

Preglednica 4: Izmerjeni parametri na Velenjskem jezeru.

Izmerjeni parametri	
Temperatura zraka	11,6 °C
Temperatura vode	7,6 °C
pH	6,85
Prevodnost	307,4 $\mu\text{S}/\text{cm}^*$
Motnost	0,7 NTU**
Kisik	0,9 mg/l

\*enota  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (mikro Simens na centimeter),

\*\*NTU (ang. NTU – nephelometric turbidity unit oz. nefelometrične turbidimetrične enote).



Slika 5: Vzorčenje Perniškega jezera (Zabukovnik, 2019).

Preglednica 5: Izmerjeni parametri na Perniškem jezeru 2 – pri pregradi.

Izmerjeni parametri	
<b>Temperatura zraka</b>	13,1 °C
<b>Temperatura vode</b>	11,1 °C
<b>pH</b>	6,80
<b>Prevodnost</b>	301,5 $\mu$ S/cm
<b>Motnost</b>	35,2 NTU
<b>Kisik</b>	0,9 mg/l

Ugotovili smo, da sta se v času naših meritev jezera razlikovali le v enem parametru; in sicer pri motnosti, ki je bila v Perniškem jezeru precej višja. Motnost je višja zaradi evtrofnosti in s tem večje količine fitoplanktona. K večji evtrofnosti prispeva obdelovanje kmetijskih površin in izpiranje v vse pritoke, ti se iztekajo v to akumulacijsko jezero. Pri pregledu vzorca pod mikroskopom smo ugotovili, da je bilo v vzorcu veliko suspendiranih sedimentov in smeti, kar dodatno prispeva k višji motnosti.

## 5.2 Vsebnost klorofila in fitoplankton

Meritve klorofila so pokazale, da je v Perniškem jezeru več kot 200x več klorofila kot v Velenjskem jezeru (Preglednica 6). Rezultati se skladajo z opazovanjem in štetjem pod mikroskopom, saj smo v vzorcu iz Perniškega jezera zaznali več fitoplanktonskih organizmov (Preglednica 7). Perniško jezero je tudi bolj eutrofno; to pomeni, da imajo organizmi na voljo več hranil, kar omogoča boljšo rast fitoplanktonskih organizmov.

Preglednica 6: Izmerjen klorofil a v vzorcu Velenjskega in Perniškega jezera.

Vzorec	Klorofil a [ $\mu\text{g/l}$ ]
Velenjsko jezero	0,60
Perniško jezero	125,20

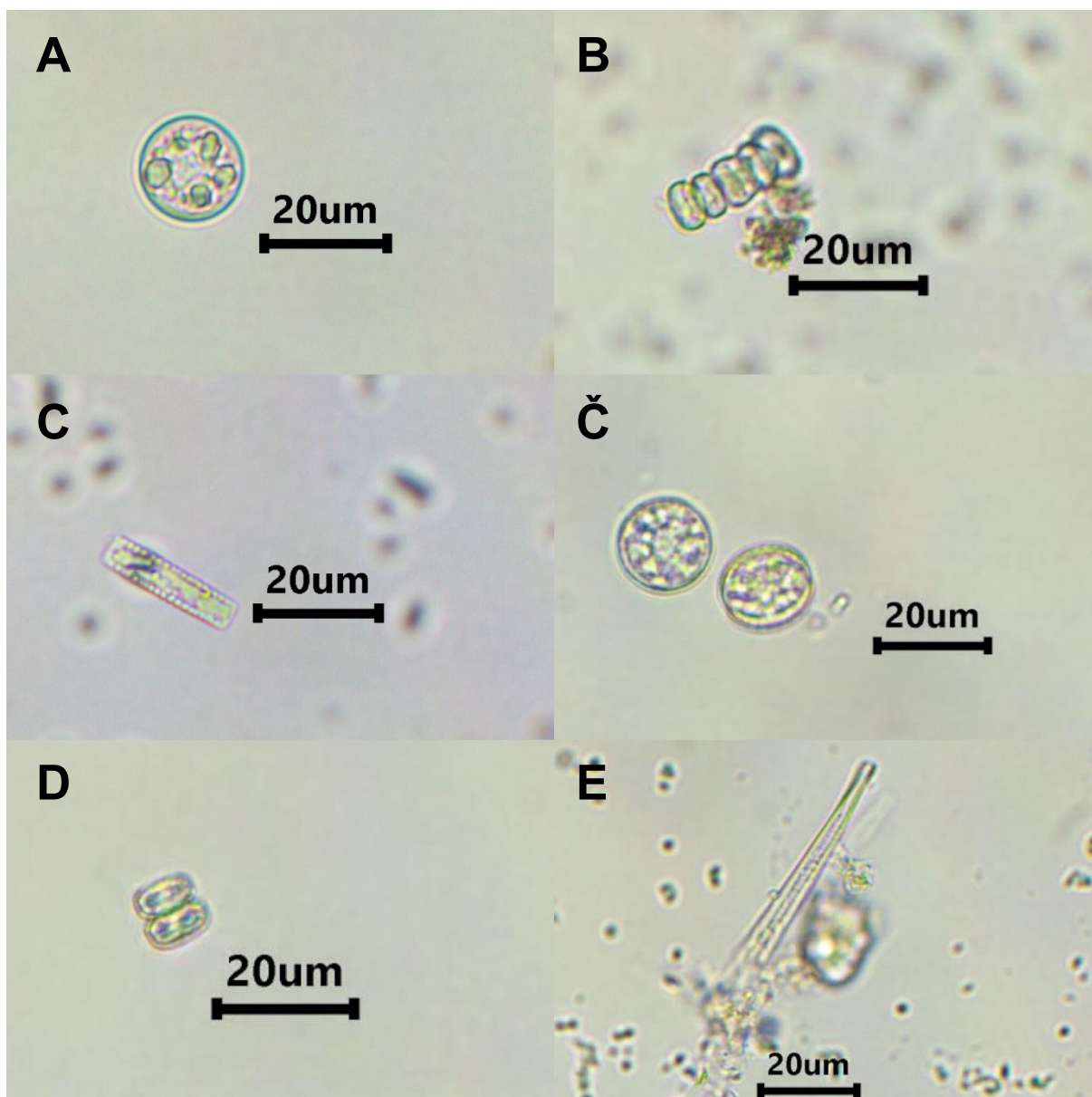
## 5.3 Morfološko-taksonomska analiza vzorcev

Mikroskopski pregled vzorca iz Velenjskega jezera je pokazal, da v vzorcu (glede na število celic na mililiter vzorca) prevladujejo diatomeje rodu *Cyclotella* (Slika 6), kar je pričakovano glede na spomladanski letni čas. V Preglednici 7 je predstavljena tudi vrstna sestava v Velenjskem jezeru, kjer smo našli bistveno manj (4-krat manj) različnih rodov in vrst fitoplanktona kot v Perniškem jezeru.

Mikroskopski pregled vzorca iz Perniškega jezera je pokazal, da v vzorcu (glede na število celic na mililiter vzorca) prevladujejo alge iz rodu *Chlamydomonas* in cianobakterije (rod *Phormidium* in *Oscillatoria*) (Slika 7). V manjšini so bile prisotne tudi zelene alge (Slika 8). V Preglednici 7 je predstavljena vrstna sestava v Perniškem jezeru, kjer smo našli vsaj 24 različnih vrst fitoplanktona.

Preglednica 7: Vrsta sestava ter ocena števila celic (na mililiter) pogostih vrst fitoplanktona v Velenjskem in Perniškem jezeru. Nekaterih rodov oz. vrst pri štetju nismo opazili (npr. *Nitzschia* v Velenjskem jezeru, *Scenedesmus* sp. v Perniškem jezeru), smo jih pa opazili pri kvalitativnem pregledu vzorca (nekaj predstavnikov je vidnih na Slikah 7, 8 in 9).

Vrstna sestava fitoplanktona		število celic na ml
Velenjsko jezero	<i>Cryptomonas</i> sp.	$7 \cdot 10^4$
	<i>Cyclotella meninghiana</i>	$1 \cdot 10^5$
	<i>Dynobryon</i> sp.	$2 \cdot 10^3$
	<i>Franceia</i> sp.	$8 \cdot 10^3$
	<i>Tetrastrum</i> sp.	$2 \cdot 10^4$
	<i>Trachelomonas</i> sp.	$2 \cdot 10^4$
Perniško jezero	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	$8 \cdot 10^3$
	<i>Aulacoseira granulata</i>	$2 \cdot 10^4$
	<i>Carteria</i> sp.	$4 \cdot 10^4$
	<i>Chlamydomonas</i> sp.	$1 \cdot 10^5$
	<i>Cryptomonas</i> sp.	$5 \cdot 10^4$
	<i>Cymatopleura solea</i>	$2 \cdot 10^3$
	<i>Didimocystis</i> sp.	$5 \cdot 10^3$
	<i>Euglena</i> sp.	$2 \cdot 10^4$
	<i>Franceia</i> sp.	$1 \cdot 10^4$
	<i>Gomphospaeria aponina</i>	$8 \cdot 10^3$
	<i>Gyrosigma</i> sp.	$2 \cdot 10^3$
	<i>Koliela</i> sp.	$5 \cdot 10^4$
	<i>Melosira varians</i>	$5 \cdot 10^4$
	<i>Monoraphidium</i> sp.	$1 \cdot 10^4$
	<i>Navicula</i> sp.	$2 \cdot 10^4$
	<i>Nitzschia linearis</i>	$2 \cdot 10^4$
	<i>Oscillatoria</i> sp.	$1 \cdot 10^5$
	<i>Phacus curvicauda</i>	$2 \cdot 10^4$
	<i>Phormidium</i> sp.	$2 \cdot 10^5$
	<i>Pseudanabaena catenata</i>	$3 \cdot 10^3$
	<i>Pseudokirchneriella</i> sp.	$2 \cdot 10^4$
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	$2 \cdot 10^4$
<i>Tetraedron</i> sp.	$2 \cdot 10^4$	
<i>Trachelomonas</i> sp.	$1 \cdot 10^4$	



Slika 6: Različne najdene vrste fitoplanktona v Velenjskem jezeru (Zabukovnik, 2019). A, B, Č, D – predstavniki rodu *Cyclotella* (diatomeje), različne orientacije; C – predstavnik rodu *Navicula/Nitzscia*; E – manjši del *Nitzscia linearis*. Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pri povečavi 400x, fotografije smo posneli s pomočjo kamere Cmex 5 PRO.



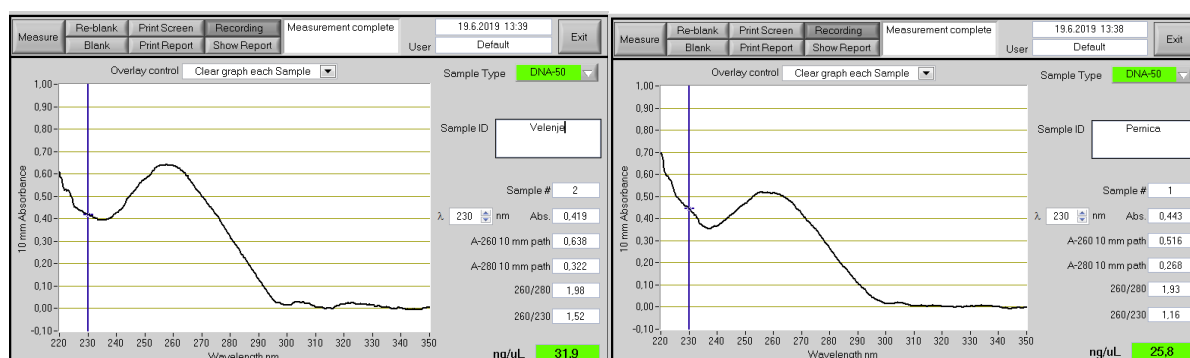
Slika 7: Najpogostejši predstavniki fitoplanktona v Pernškem jezeru (Zabukovnik, 2019). A – *Nitzsca linearis*; B, C – predstavnik rodu *Phormidium*.; Č – *Aulacosira granulata*. Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pri povečavi 400x, fotografije smo posneli s pomočjo kamere Cmax 5 PRO.



Slika 8: Redkejši vrste fitoplanktona v Pernškem jezeru (Zabukovnik, 2019). A – diatomeja, predstavnik rodu *Gyrosigma*; B – *Cymatopleura solea*; C – zelena alga, predstavnik *Scenedesmus quadricauda* desno zgoraj in diatomeja *Nitzsca palea* levo spodaj; Č – zelena alga, predstavnik rodu *Scenedesmus*. Mikroskopirali smo s pomočjo binokularnega mikroskopa BioBlue (Euromex), pri povečavi 400x, fotografije smo posneli s pomočjo kamere Cmax 5 PRO.

## 5.4 Ugotavljanje količine in kvalitete eDNK

Količina DNK, izmerjena z »Nanodrop« tehnologijo, v vzorcu Perniškega jezera (nekoncentriran vzorec) in vzorcu Velenjskega jezera (30x koncentriran vzorec) kaže na podobne vrednosti koncentracije in čistosti eDNK v obeh vzorcih. Razmerje med absorbanca  $A_{260}/A_{280} = 1,93$  za Perniško jezero oziroma  $A_{260}/A_{280} = 1,98$  za Velenjsko jezero (vrednost 2,0 predstavlja zelo dobro čistost) potrjuje primerno čistost izolirane DNK. Izmerjena koncentracija DNK je bila med vzorcema primerljiva: Velenjsko jezero: 31,9 ng/ $\mu$ L, Perniško jezero: 25,8 ng/ $\mu$ L (Slika 9). Vzorec Velenjskega jezera je bil 30x koncentriran, zato ima posledično malo višjo absorbanco. Meritve Nanodrop lahko motijo tudi nečistoče v vzorcu, ki jih je bilo v vzorcu Perniškega jezera več, a niso vidne iz razmerja  $A_{260}/A_{280}$ . Če upoštevamo 30x koncentriranje vzorca iz Velenjskega jezera, lahko na podlagi Nanodrop meritev izračunamo, da je bilo v Perniškem jezeru 25x več eDNK kot v Velenjskem jezeru.



Slika 9: »Nanodrop« analiza vzorca iz Velenjskega jezera (levo) in iz Perniškega jezera (desno).

## 5.5 Analiza qPCR

Rezultati qPCR analiz so zbrani v Preglednici 8. Ugotovili smo:

1. Naš sistem deluje pod kontroliranimi pogoji:

- med izvedbo qPCR ni prišlo do kontaminacije (negativna kontrola se ni pomnoževala);
- med izolacijo DNK ni prišlo do kontaminacije (slepa kontrola);
- vse 4 pozitivne kontrole so pokazale pozitiven rezultat (pozitivne kontrole so opisane v legendi vzorcev pri Preglednici 3).

2. V Perniškem jezeru je prisotnih kar nekaj inhibitorjev pomnoževanja, kar je razvidno iz Ct vrednosti pri 10x redčitvi vzorca DNK (Priloga 1) v primerjavi z vrednostmi pri 100x redčitvi (Preglednica 8). Ne moremo izključiti, da so bili inhibitorji prisotni tudi pri 100x redčitvi. Da bi to raziskali, bi morali narediti redčitveno vrsto 10x–100.000x in primerjati rezultate.

3. V Perniškem in Velenjskem jezeru sta prisotni 18S in 16S rDNK. Glede na mikroskopske analize lahko zaključimo, da 18S v Velenjskem jezeru ne izvira iz evkariontskih alg, ampak verjetno iz drugih višjih evkariontskih organizmov (npr. kopalci, rekreativci, ribe ... vsa 18S eDNK).

4. Glede na mikroskopske analize so nepričakovani rezultati vzorca iz Velenjskega jezera (označeno z \* v Preglednici 8), saj pod mikroskopom večjih cianobakterij nismo opazili. Rezultat si lahko razlagamo na dva načina:

- prisotnost pikocianobakterij, ki jih pod mikroskopom ne moremo ločiti od nefotosintetskih bakterij,
- neoptimizirana metoda oz. nespecifično pomnoževanje bakterij, ki se pomnožujejo z začetnimi oligonukleotidi za cianobakterije.



Glede na BLAST analizo, ki so jo izvedli sodelavci na projektu Eco-AlpsWater, so to lahko *Legionella* sp., *Terasakiella* sp., *Tabrizicola* sp., *Methylomicrobium* sp., *Ralstonia* sp., *Bordetella* sp., *Novosphingobium* sp., *Avibacterium* sp., *Hazenella* sp., *Escherichia albertii* in *E. coli*, *Saccharibacteria* sp., *Chloroflexi* sp., *Thermoactinomycetaceae* sp., *Ziziphus rotundifolia phytoplasma*, *Shigella* sp., *Mycobacterium leprae*, *Achromobacter insolitus*, *Gelria* sp., *Clostridia* sp., *Melghirimyces algeriensis*, *Xenococcus* sp., *Serratia* sp. in *Vibrio fluvialis*.

5. Začetni oligonukleotid 16S-Pla je pomnoževal zaporedja nekaterih cianobakterij, kar kaže na to, da se nespecifično veže tudi na nekatere druge cianobakterije, saj rodu *Planktothrix* v nobenem vzorcu nismo našli pod mikroskopom.

Preglednica 8: Ct vrednosti vzorcev, ki smo jih testirali s petimi različnimi začetnimi oligonukleotidi (18S, 16S, 16S-ciano, 16S-Pla, McyE).

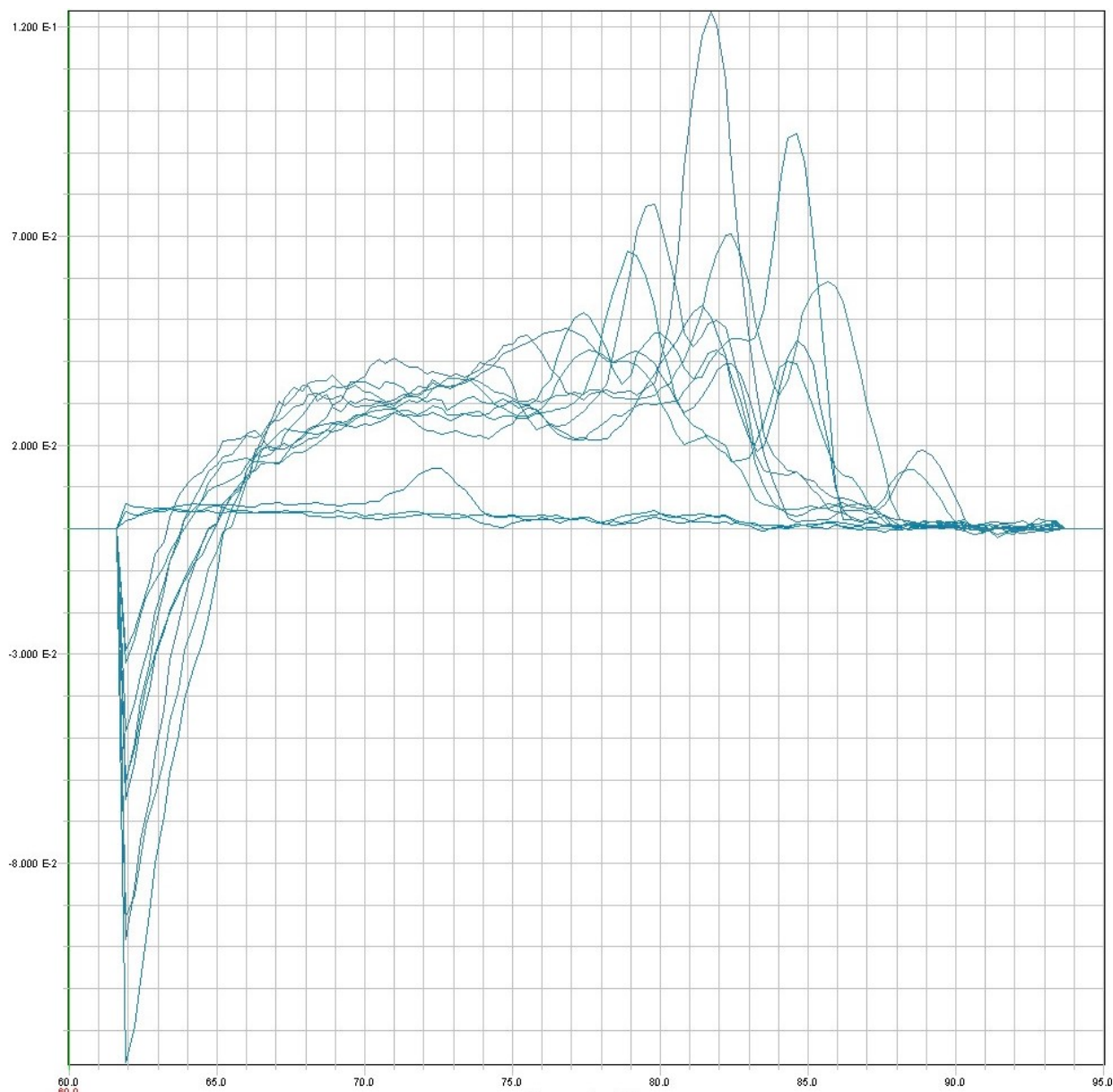
Ct vrednost pri 100-kratni redčitvi vzorca	18S	16S	16S-ciano	16S-Pla	McyE
Perniško jezero	22,36 ± 0,21	25,84 ± 0,09	20,71 ± 0,03	25,55 ± 0,15	34,68 ± 0,23
Velenjsko jezero	24,71 ± 0,06	23,10 ± 0,06	23,11 ± 0,18*	26,40 ± 0,52 *	33,46 ± 0,38 *
Pozitivna kontrola (PC)	OK	OK	OK	OK	OK
Slepa kontrola	OK	OK	OK	OK	OK
Negativna kontrola (NTC)	OK	OK	OK	OK	OK

Pri pregledu disociacijskih krivulj smo ugotovili, da v primeru McyE le-ta ne deluje specifično, saj je vidnih veliko pomnoženih produktov, ki imajo različno disociacijsko krivuljo (slika 10). Vsi ostali začetni oligonukleotidi so pomnoževali specifična tarčna zaporedja DNK zadovoljivo, kar kažejo tudi njihove disociacijske krivulje, kjer lahko opazimo samo en vrh (primer za začetni oligonukleotid 16S-ciano je viden na sliki 11).

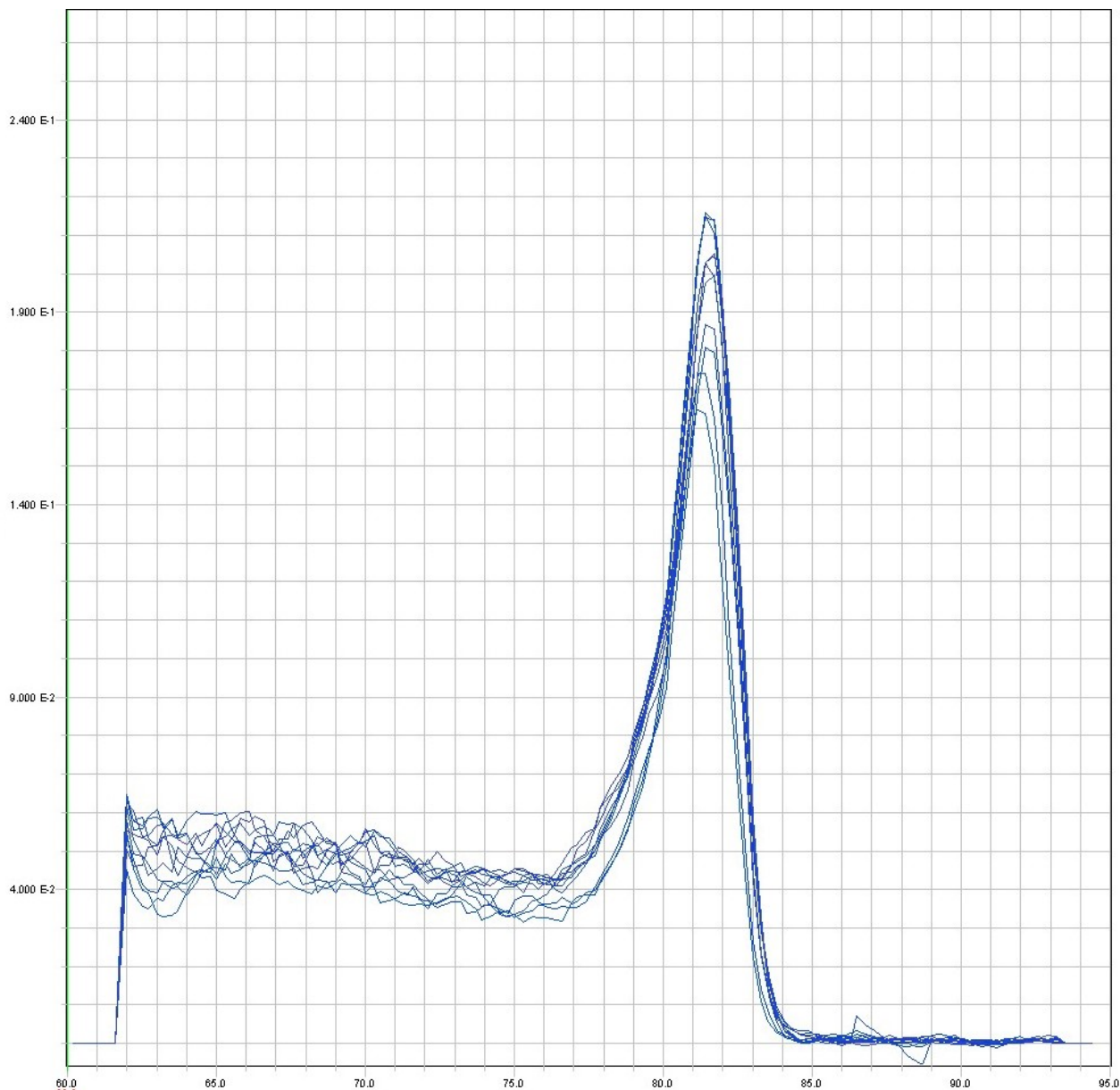
Na podlagi dobljenih Ct vrednosti pri 100x redčitvi (Preglednica 8) in s pomočjo podatkov o koncentriranju vzorca oziroma izhodiščnih volumnov vzorcev za qPCR analizo (poglavje 4.2.2.) smo izračunali, koliko več kopij posameznega tarčnega gena ima Perniško jezero v primerjavi z Velenjskim jezerom.

- **18S:** → Vzorec Perniškega jezera ima 150x več kopij tarčnega gena kot enak volumen vzorca iz Velenjskega jezera,
- **16S:** → Vzorec Perniškega jezera ima 5,79x več kopij tarčnega gena kot enak volumen vzorca iz Velenjskega jezera,
- **16S-ciano:** → Vzorec Perniškega jezera ima 198,3x več kopij tarčnega gena kot enak volumen vzorca iz Velenjskega jezera,
- **16S-Pla:** → Vzorec Perniškega jezera ima 66,8x več kopij tarčnega gena kot enak volumen vzorca iz Velenjskega jezera,
- **McyE:** → Vzorec Perniškega jezera ima 1,5x več kopij tarčnega gena kot enak volumen vzorca iz Velenjskega jezera.

Na podlagi zgornjega primerjalnega izračuna relativnih količin kopij tarčnih genov lahko zaključimo, da je v Perniškem jezeru prisotnih več fitoplanktonskih organizmov, predvsem pa cianobakterij (skoraj 200x več). Prav tako najdemo v Perniškem jezeru več vrst cianobakterij s potencialom za sintezo mikrocistinov, kar kaže na potencialno večjo nevarnost z vidika vpliva razrasta cianobakterij in alg na vodno telo. Rezultati za 16S-Pla niso zanesljivi zaradi ugotovitve o nespecifičnosti uporabljenih začetnih oligonuleotidov.



Slika 10: Disociacijska krivulja pomnoženih tarčnih zaporedij z začetnim oligonukleotidom McyE na vzorcu Perniškega in Velenjskega jezera. X-os predstavlja temperaturo (°C) in y-os spremembo fluorescence v času reakcije.



Slika 11: Disociacijska krivulja pomnoženih tarčnih zaporedij z začetnim oligonukleotidom 16S-ciano na vzorcu Perniškega in Velenjskega jezera. X-os predstavlja temperaturo (°C) in y-os spremembo fluorescence v času reakcije.

## 6 SKLEPI

Pomemben cilj diplomske naloge je bil ugotoviti, ali je količina dednega materiala, ki smo jo zaznali s pomočjo molekularnih metod določevanja eDNK v vodnem telesu, povezana z njihovo stopnjo evτροφnosti. Izbrali smo si dve vzorčni mesti, Velenjsko in Perniško jezero. Jezeri kažeta različno stopnjo evτροφnosti. Poleg povezave z evτροφnostjo smo s pomočjo eDNK želeli pridobiti tudi informacijo o splošni biotski raznovrstnosti alg in cianobakterij, s poudarkom na zaznavanju potencialno toksičnih cianobakterij. Zgodnje zaznavanje strupenih cianobakterij namreč omogoča pravočasno opozarjanje na možnost strupenega cianobakterijskega cvetenja in zato predstavlja pomemben korak k zagotavljanju varnosti vodnega vira (zgodnje zaznavanje okoljskih tveganj) in ohranjanju vodnega okolja ter njegove biotske raznovrstnosti.

Zadrževalnik Perniško jezero je marca 2019 v primerjavi z Velenjskim jezerom vseboval 200x več klorofila *a* in glede na morfološke mikroskopske analize 4x več različnih fitoplanktonskih vrst. Ob predpostavki, da ena fitoplanktonska celica vsebuje eno kopijo tarčnih genov, lahko na podlagi molekularnih analiz zaključimo, da je bilo v Perniškem jezeru prisotnih več fitoplanktonskih organizmov, predvsem pa cianobakterij (skoraj 200x več), kot v Velenjskem jezeru. Letno povprečje celokupnega fosforja v Perniškem jezeru je 1,5x večje v primerjavi z Velenjskim jezerom (podatki iz leta 2016), zato ni presenetljivo, da je bila količina eDNK v Perniškem jezeru 25x večja. Z molekularnimi orodji smo lahko zaznali cianobakterije na splošno. Zaradi neoptimiziranih pogojev qPCR reakcij ali nedelovanja specifičnih začetnih oligonukleotidov za mikrocistine nismo mogli določiti toksigenega potenciala cianobakterij znotraj te skupine. Za bolj trdne zaključke bi morali optimizirati začetne oligonukleotide in poskuse izvajati v večji časovni in prostorski resoluciji. Naš poskus je bil namreč samo preliminaren zaradi enkratnega vzorčenja v spomladanskem času.

### **Hipoteza 1: Inovativna molekularna orodja na osnovi eDNK so uporabna kot zgodnje opozorilo na toksične cianobakterije.**

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da imajo inovativna molekularna orodja na osnovi eDNK velik potencial za zgodnje opozarjanje. V primerjavi z mikroskopijo so lahko hitrejša in bolj specifična, saj smo zaznali že majhne koncentracije cianobakterij in hkrati tudi pikocianobakterije. Za bolj trdne zaključke bi morali poskuse izvajati v boljši časovni in prostorski resoluciji (bolj pogosto vzorčenje na več lokacijah). Hipotezo lahko delno potrdimo, saj gre za variabilni biološki material, ki zahteva veliko molekularne optimizacije. Glede na disociacijsko krivuljo lahko zaključimo, da je bil izbrani začetni oligonukleotid *McyE*, ki naj bi pomnoževal gene za vse mikrocistine cianobakterij, za detekcijo le-teh samo pogojno primeren.

### **Hipoteza 2: Količina dednega materiala iz vzorca površinske vode je v povezavi s stopnjo evτροφnosti vodnega telesa.**

Na podlagi OECD kriterijev in vsebnosti fosforja uvrščamo Velenjsko jezero med evτροφna, Perniško pa med hiperevτροφna jezera. To pomeni, da na podlagi vsebnosti hranil predstavlja Perniško jezero boljše vodno okolje za rast fitoplanktona, kakor tudi za njihovo masovno pojavljanje. Naši molekularni pristopi, rezultati qPCR analiz, so pokazali, da je v Perniškem jezeru prisotne cca. 25-krat več eDNK. Preračunane relativne količine eDNK v Perniškem jezeru v primerjavi z Velenjskim jezerom so pokazale, da je v Perniškem jezeru več prokariotskih organizmov. Izstopa predvsem razlika v količini zaznane cianobakterijske DNK. Naši prvi preliminarni rezultati tako kažejo v smer, da je količina zaznanega dednega materiala v povezavi s stopnjo evτροφnosti vodnega telesa. A za bolj natančne ugotovitve bi bilo potrebno opraviti več analiz vzorcev vzetih v različnih limnoloških obdobjih, kakor tudi več primerjav z drugimi vodnimi telesi. Na podlagi naših rezultatov lahko hipotezo delno potrdimo.

## 7 POVZETEK

Za ljudi, živali in okolje predstavljajo cianobakterijska cvetenja potencialno nevarnost, saj cianobakterije lahko proizvajajo toksine. Ta pojav hkrati ogroža tudi površinske zaloge pitne vode povsod po svetu. Cvetenja cianobakterij so v tesni povezavi s preobremenjenostjo vodnega telesa s hranili (eutrofnost). Zaradi povečevanja eutrofikacije površinskih voda se vse pogosteje pojavlja tudi masovno cvetenje potencialno toksičnih cianobakterij, ki svoje metabolne produkte (toksine) ob razpadu cveta sproščajo v vodno okolje ter tako predstavljajo visoko tveganje za zdravje okolja in tudi ljudi. Toksine cianobakterij imenujemo cianotoksini in so zelo raznolika skupina naravnih biološko aktivnih snovi. Posledica cvetenj cianobakterij in sproščanja sekundarnih metabolitov v vodno telo je tudi zmanjšana biotska raznovrstnost in slabše ekološko stanje. Obstajajo številne metode, ki temeljijo na fluorescenci različnih fotosinteznih pigmentov in nam pomagajo zaznati cianobakterije, še preden pride do prekomerne namnožitve. Problematiko lahko v prihodnosti rešujemo tudi s pomočjo modernih visokozmogljivih in natančnih metod, kot je npr. kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) in z razvojem novih metod metabarkodiranja in metod sekveniranja nove generacije (NGS). Te metode so v molekularni biologiji izjemno pomembne, saj nam omogočajo nov temeljitejši in hitrejši način vpogleda v ekološko dinamiko. Uporaba teh metod nam pomaga zaznati in odkriti cianobakterije še pred njihovim masovnim pojavljanjem, hkrati bi lahko dopolnile oz. nadgradile tradicionalne morfo-taksonomske metode. Analize okoljske DNK (eDNA) namreč omogočajo identifikacijo toksičnih cianobakterij, zgodnje odkrivanje invazivnih vrst in omogočajo bolj zanesljivo identifikacijo rodov in vrst. Uporaba teh metod je koristna tudi za oceno ekološkega stanja vodnih virov, saj je hitrejša pri obdelavi velikega števila vzorcev in bolj specifična ter učinkovita kot dosedanje.

V diplomu je predstavljen molekularni pristop z metodo qPCR, ki nam lahko pomaga zaznati strupeni potencial cianobakterij še pred cvetenjem in nas tako opozori na možnost proizvodnje strupov in njihovega sproščanja v vodno okolje. Posledično nam omogoča boljše upravljanje in preventivno ravnanje z vodnim telesom. Želeli smo ugotoviti, ali so rezultati metode primerni kot zgodnje opozorilo na prisotnost toksičnih cianobakterij ter ali je količina dednega materiala, ki smo jo s pomočjo metode qPCR zaznali v vodnem telesu, v povezavi s stopnjo eutrofnosti, ki je v tesni povezavi z ekološkim stanjem vodnega telesa. Izbrali smo dve različni eutrofni vodni telesi, Velenjsko in Perniško jezero, in poskusili na podlagi eDNK pridobiti tudi informacijo o potencialno toksičnih cianobakterijah. Za qPCR analizo smo izbrali pet različnih začetnih oligonukleotidov: 18S rDNK, ki omogoča zaznavanje evkariontskih organizmov, 16S rDNK ki omogoča zaznavanje prokariontskih organizmov, 16S-ciano, ki omogoča zaznavanje cianobakterij v vzorcu, 16S-Pla, ki omogoča zaznavo predstavnikov rodu *Planktothrix*, ki imajo potencial za sintezo mikrocistinov in McyE, ki omogoča zaznavo mikrocistinskega potenciala.

Ugotovili smo, da zahteva uporaba molekularnih orodij veliko optimizacije. Preliminarni rezultati nakazujejo, da je molekularni pristop s qPCR hitrejši od klasičnih pristopov ter da je količina dednega materiala iz naših vzorcev v povezavi s stopnjo eutrofnosti vodnega telesa. Namreč, primerjava eDNK v naših vzorcih kaže na večji potencial masovnega razrasta fitoplanktona v Perniškem jezeru kot v Velenjskem (kar je v skladu s taksonomsko-morfološko analizo). Priporočimo lahko, da bodo lahko molekularna orodja na osnovi eDNK v prihodnosti uporabljena kot zgodnje opozorilo za ugotavljanje prisotnosti potencialno toksičnih cianobakterij. Inovativna molekularna orodja na osnovi eDNK imajo velik potencial za zgodnje opozarjanje, saj je v primerjavi z mikroskopijo lahko hitrejša in bolj specifična, poleg tega lahko zaznajo že majhne koncentracije cianobakterij in hkrati tudi pikocianobakterije. Za natančnejše zaključke bi morali izbrati in optimizirati nekatere začetne oligonukleotide in poskuse izvajati v boljši časovni ter prostorski resoluciji.

## 8 SUMMARY

For humans, animals and the environment, cyanobacterial blooms pose a potential threat because cyanobacteria can produce toxins. Among other issues, this phenomenon also threatens surface drinking water supplies all over the world. Blooming cyanobacteria are closely related to the overload of the water body with nutrients (eutrophication). Due to the increased eutrophication of surface waters, a phenomenon of mass cyanobacterial blooms is becoming more frequent. These blooms are, potentially toxic, as they can release metabolic products and toxins into the aquatic environment during their decomposition and therefore pose a high health risk to both the environment and humans. Cyanobacteria produce a very diverse group of natural toxins called cyanotoxins. Cyanobacterial blooming and the release of secondary metabolites into the body of water can also result in decreased biodiversity and poor ecological state. There are some sensory methods (based on the fluorescence of various photosynthetic pigments), which can help us detect cyanobacteria even before excessive reproduction occurs. In the future, problems can be solved with the help of modern high-performance and precise methods, such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR), development of new metabarcoding methods and new generation sequencing methods (NGS). These methods are extremely important in molecular biology since they allow us to find a new, more thorough and quicker way of gaining insight into ecological dynamics. Using these methods would help us detect cyanobacteria before their mass occurrence, and at the same time these methods could supplement and upgrade traditional morpho-taxonomic methods. Environmental DNA (eDNA) analysis enables identification of toxigenic cyanobacteria, early detection of invasive species, and more reliable identification of genus and species. These methods are also very useful for assessing the ecological status of water resources, since they are faster for a large number of samples and more specific and effective in comparison with current ones.

The diploma thesis presents a molecular approach using the qPCR method, which can help us to detect the toxic potential of cyanobacteria before blooming, thus alerting us to the possibility of producing toxins and releasing them into the aquatic environment. Consequentially, this allows us better management and preventive handling with the water body. Our goal was to determine whether the amount of genetic material, detected in the water body by the qPCR method, is in relation to the eutrophication level, which is closely related to the ecological state of the water body. We have selected two different eutrophic water bodies, the Velenje and Pernica lake, and have tried to obtain information on the basis of eDNA with an emphasis on the detection of potentially toxic cyanobacteria. For qPCR analysis, we selected five different oligonucleotides (18S rDNA for detection of eukaryotic organisms and 16S rDNA for detection of prokaryotic organisms, 16S-cyano for detection of all cyanobacteria in the sample, 16S-Pla for detection of potentially microcystin-producing representatives of the genus *Planktothrix* and McyE which enables detection of microcystin potential.

We have found out that the use of molecular tools requires a lot of optimization. The preliminary results nevertheless indicate that the molecular approach with qPCR is faster than the conventional approaches, and that the amount of genetic material from our samples is related to the eutrophication level of water body. Namely, the comparison of eDNA in our samples indicates a higher potential of mass growth of phytoplankton in the Pernica lake than in the Velenje lake (which is in accordance with taxonomic-morphological analysis). We can propose that the eDNA-based molecular tools can be used as an early warning for toxic cyanobacteria in the future. We concluded that innovative eDNA-based molecular tools have a high potential for early warning (in comparison with microscopy, they may be faster and more specific and, in addition, small concentrations of cyanobacteria and also picocyanobacteria can be detected). For more precise and reliable conclusions, we should select and optimize some of the primers and perform experiments in a better time and space resolution.

## 9 VIRI IN LITERATURA

1. Agencija Republike Slovenije za okolje. 2016. Rezultati monitoringa ekološkega stanja vodotokov v letu 2016. Medmrežje: [https://www.arso.gov.si/vode/reke/ocena%20stanja/Ekološko\\_stanje\\_reke\\_2016.pdf](https://www.arso.gov.si/vode/reke/ocena%20stanja/Ekološko_stanje_reke_2016.pdf) (28.4.2019).
2. Agencija Republike Slovenije za okolje. 2019. Program monitoringa kemijskega in ekološkega stanja jezer v letu 2010. Medmrežje: [http://www.arso.gov.si/vode/jezera/programi/Program\\_%20jezera\\_2010.pdf](http://www.arso.gov.si/vode/jezera/programi/Program_%20jezera_2010.pdf) (28. 4. 2019).
3. Al-Tebrineh. J., Mihali T. K., Pomati F., Neilan B. A. 2012. "Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* environmental water blooms by quantitative PCR." *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (1). št. 23. str. 7836–7842.
4. Al-Tebrineh. J., Mihali T. K., Pomati. F., Neilan. B. A. 2010. *Environmental Microbiology*. 78 (1). št. 1. str. 263-272.
5. Ambrožič. Š., Cvitanič. I., Dobnikar Tehovnik. M., Gacin. M., Grbovič. J., Jesenovec. B., Kozak Legiša. Š., Krajnc. M., Mihorko. P., Poje. M., Remec Rekar. Š., Rotar. B., Sodja. E. 2008. *Kakovost voda v Sloveniji*. Agencija Republike Slovenije za okolje. Ljubljana. str. 31.
6. Bellinger. G. E., Sigee. C. D. 2015. *Freshwater algae: Identification, Enumeration and use as bioindicators*. Wiley. Str. Ix-4.
7. Bergkvist. A., Burns. M., Sanders. R., Redshaw. N., Wilkes. T. 2013. *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*. National Mesasurment System. United Kingdom.
8. Bubik. A. 2012. *Ekološki, biološki in biokemični učinki nekaterih pogostih ne-hepatotoksičnih cikličnih cianopeptidov (n-hCCP)*. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Medicinska fakulteta. Ljubljana. str. 9-51.
9. Bush. A., Sollmann. R., Wilting. A., Bohmann. K., Cole. B., Balzter. H., Martius. C., Zlinszky. A., Calvignac-Spencer. S., Cobbold. C. A., Dawson. T. P., Emerson. B. C., Ferrier. S., Gilbert. M. T., Herold. M., Jones. L., Leendertz. F. H., Matthews. L., Millington. J. D. A., Olson. J. R., Ovaskainen. O., Raffaelli. D., Reeve. R., Rödel. M. O., Rodgers. T. W., Snape. S., Visseren-Hamakers. I., Vogler. A. P., White. P. C. L., Wooster. M. J., Yu. D. W. 2017. *Connecting Earth Observation to High-Throughput*. *Nature Ecology & Evolution* 1: 0176. 1-50.
10. Codd G., Bell S., Kaya K., Ward C., Beattie K., Metcalf J. 1999. *Cyanobacterial Toxins, Exposure Routes and Human Health*. *European Journal of Phycology* 34(4). str. 405-415.
11. Cvitanič. I., Jesenovec. B., Dobnikar Tehovnik. M., Dolinar. N., Rotar. N., Sever. M., Agencija RS za okolje. Urad za hidrologijo in stanje okolja. Sektor za kakovost voda. 2016. *Kazalci okolja v Sloveniji: Kemijsko in ekološko stanje površinskih voda*. medmrežje: [http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=775](http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=775) (17.11.2018).
12. Dolinar. N., Gabrijelčič. E., Jesenovec. B., Krivograd Klemenčič. A., Kuhar. U., Poje. M., Remec Rekar. Š., Rotar. B., Sever .M., Sodja. E., Štupnikar. N., Zimšek Muc. T. 2018. *Ekološko stanje površinskih voda v Sloveniji. Poročilo o monitoringu za leto 2016*. Agencija Republike Slovenije za okolje. Ljubljana. Medmrežje 3: [http://www.arso.gov.si/vode/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/publikacije%20in%20poro%C4%8Dila/Ekolo%C5%A1ko%20stanje%20voda%20v%20Sloveniji\\_letno%20poro%C4%8Dilo%202016\\_kon%C4%8Dno\\_29.8.2018.pdf](http://www.arso.gov.si/vode/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/publikacije%20in%20poro%C4%8Dila/Ekolo%C5%A1ko%20stanje%20voda%20v%20Sloveniji_letno%20poro%C4%8Dilo%202016_kon%C4%8Dno_29.8.2018.pdf) (9.6. 2019).
13. Eleršek. T. 2014. *Potencialno toksične cianobakterije v celinskih vodah Slovenije*. Ljubljana. Nacionalni inštitut za biologijo. Vse živo. str. 10-18.
14. Eleršek. T., Blaha. L., Mazur-Marzec. H., Schmidt. W., Carmeli. S. 2017. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Other Cyanobacterial Bioactive Substances*. Wiley. str. 179-190.

15. Eutrophication of waters. 1982. Monitoring. Assessment and Control Anon. OECD Paris.
16. Kakovost vode – Merjenje biokemijskih parametrov – Spektrofotometrično določevanje koncentracije klorofila (istoveten ISO 10260:1992).
17. Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Meissner, D., Mergen, P., Pawlowski, J., Jay Piggott, J., Rimet, F., Steinke, D., Taberlet, P., Weigand, A. M., Abarenkov, K., Beja, P., Bervoets, L., Björnsdóttir, S., Boets, P., Boggero, A., Magnar Bones, A., Borja, A., Bruce, K., Bursić, V., Carlsson, J., Čiampor, F., Čiamporová-Zatovičová, Z., Coissac, E., Costa, F., Costache, M., Creer, S., Csabai, Z., Deiner, K., DelValls, A., Drakare, S., Duarte, S., Eleršek, T., Fazi, S., Fišer, F., Flot, J. F., Fonseca, V., Fontaneto, D., Grabowski, M., Graf, W., Guðbrandsson, J., Hellström, M., Hershkovitz, Y., Hollingsworth, P., Japoshvili, B., Jones, J. I., Kahlert, M., Kalamujic Stroil, B., Kasapidis, P., Kelly, M. G., Kelly-Quinn, M., Keskin, E., Kõljalg, U., Ljubešić, Z., Maček, I., Mächler, E., Mahon, A., Marečková, M., Mejdandzic, M., Mircheva, G., Montagna, M., Moritz, C., Mulk, V., Naumoski, A., Navodaru, I., Padisák, J., Pálsson, S., Panksep, K., Penev, L., Petrussek, A., Pfannkuchen, M. A., Primmer, C. R., Rinkevich, B., Rotter, A., Schmidt-Kloiber, A., Segurado, P., Speksnijder, A., Stoev, P., Strand, M., Šulčius, S., Sundberg, P., Traugott, M., Tsigenopoulos, C., Turon, X., Valentini, A., Van der Hoorn, B., Várbió, G., Vasquez Hadjilyra, M. I., Viguri, J., Vitonytė, I., Vogler, A., Vrålstad, T., Wägele, W., Wenne, R., Winding, A., Woodward, G., Zegura, B., Zimmermann, J. 2016. DNKqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe., *Research Ideas and Outcomes* 2: e11321. str. 1-24.
18. Mahnič, M., Baebler, Š., Blejec, A., Jalen, Š., Gruden, K., Menart, V., Jevševar, S. 2012. Gene expression profiling of recombinant protein producing *E. coli* at suboptimal growth temperature. *Acta Chimica Slovenica*, 59 (1). str. 59-69.
19. Ostermaier, V., Kurmayer, R. 2009. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microbial Ecology*. 58. str. 323–333.
20. Perniško jezero. Medmrežje 1: <http://ar-tour.com/guides/po-poteh-pesniskih-voda-od-mita-do-arhitekture/pernisiko-jezero.aspx> (12.5.2019).
21. Pravilnik o monitoringu stanja površinskih voda (Uradni list RS, št. 10/09, 81/11 in 73/16).
22. Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *PNAS* 101 (2). str. 568–573.
23. Rantala, A., Rizzi, E., Castiglioni, B., De Bellis, G., Sivonen, K. 2008. Identification of hepatotoxin-producing cyanobacterium by DNK-chip. *Environmental Microbiology* 10(3). str. 653–664.
24. Rantala, A., Wacklin, P. R., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Boczek, J. M., Sivonen, K. 2006. "Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene *E* (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors." *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (1). št. 9. str. 6101-6110.
25. Remec Rekar, Š. 2015. Stanje jezer in zadrževalnikov v Sloveniji. Urad za hidrologijo in stanje okolja. Sektor za kakovost voda. Agencija republike Slovenije za okolje. Medmrežje 2: [http://www.arso.gov.si/novice/datoteke/035526-Spremljanje%20stanja%20jezer%20v%20Sloveniji%20\\_Sre%C4%8Danje%20objezerskih%20krajev.pdf](http://www.arso.gov.si/novice/datoteke/035526-Spremljanje%20stanja%20jezer%20v%20Sloveniji%20_Sre%C4%8Danje%20objezerskih%20krajev.pdf) (26. 5. 2019).
26. Sedmak, B. 2006. Toksične cianobakterije: Prebivalstvu proti vodi-medsebojna pretnja. Toxic cyanobacteria: Population against water-a mutual threat. *UJMA*. Št 20. str. 137-143.
27. Sedmak, B. 2011. Cianobakterije in njihovi toksini. Ljubljana. Nacionalni inštitut za biologijo. Vse živo. str. 51-55.
28. Slovenski standard SIST ISO 10260:2001 prva izdaja december 2001



29. Slovenski standard SIST ISO 10260:2001 prva izdaja december 2001, Kakovost vode – Merjenje biokemijskih parametrov – Spektrofotometrično določevanje koncentracije klorofila (istoveten ISO 10260:1992).
30. Šterbenk. E., Ževart. M., Ramšak. E. 2004. Jezera, o katerih bomo še slišali - Šaleška jezera. Geografski obzornik 1/2004. Zveza geografskih društev Slovenije. Ljubljana. str. 4 – 12.
31. Uredba o emisiji snovi pri odvajanju odpadne vode iz komunalnih čistilnih naprav. Uradni list RS. št. 45/07.
32. Uredba o stanju površinskih voda (Uradni list RS, št. 14/09, 98/10, 96/13 in 24/16)
33. Valentini. A., Taberlet. P., Miaud. C., Civade. R., Herder. J., Thomsen. F. P., Bellemain. E., Besnard. A., Coissanc. E., Boyer. F., Gaboriaud. C., Jean. P., Poulet. N., Roset. N., Copp. H. G., Geniez. P., Pont. D., Argillier. C., Baudoin. M. J., Peroux. T., Crivelli. J. A., Olivier. A., Acqueberge. M., Le Brun. M., Møller. R. P., Willerslev. E., Dejean. T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNK metabarcoding. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/mec.13428. str. 1-14.
34. Vasselon. V., Domaizon. I., Rimet. F., Kahlert. M., Bouchez. A, 2017. Freshwater Science: Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNK extraction methods matter?. *The Society for Freshwater Science*. 36(1). str. 162-177.
35. WFD - European Commission. 2000c. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23rd October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal 22 December L 327/1. European Commission: Brussels.
36. World Wildlife Fund (WWF). 2016. Living planet report 2016: Risk and Resilience in a New Era. ZSL; Let's work for wildlife. str. 1-74.
37. Xiao. X., Sogge. H., Lagesen. K., Tooming-Klunderud. A., Jakobsen. K., Rohrlack. T. 2014. Use of High Throughput Sequencing and Light Microscopy Show Contrasting Results in a Study of Phytoplankton Occurrence in a Freshwater Environment. *PLoS ONE*. 10 (8). str.1-10.

## 10 PRILOGE

Priloga 1: Rezultati qPCR analize za gen 18S z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.

Ime vzorca	Ct	Ct povprečje
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,237326	22,37
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,465282	
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,415910	
<b>Perniško jezero 100x</b>	22,117096	22,36
<b>Perniško jezero 100x</b>	22,473446	
<b>Perniško jezero 100x</b>	22,477734	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	21,38034	21,97
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	21,935566	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	22,023678	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	24,637478	24,71
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	24,736118	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	24,749619	
<b>Planktothrix 10x</b>	31,332949	31,13
<b>Planktothrix 10x</b>	30,934044	
<b>blank</b>	40,402348	39,44
<b>blank</b>	38,451397	
<b>blank</b>	39,460003	
<b>NTC1</b>	41,998253	42,00
<b>NTC2</b>	Undetermined	

Priloga 2: Rezultati qPCR analize za gen 16S z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.

Ime vzorca	Ct	Ct povprečje
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,701480	22,64
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,641048	
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,564224	
<b>Perniško jezero 100x</b>	25,743970	25,84
<b>Perniško jezero 100x</b>	25,849073	
<b>Perniško jezero 100x</b>	25,931639	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	19,735409	19,76
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	19,845867	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	19,710388	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	23,052397	23,10
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	23,162321	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	23,094750	
<b>Planktothrix 10x</b>	25,902077	25,87
<b>Planktothrix 10x</b>	25,840088	
<b>blank</b>	36,944622	37,15
<b>blank</b>	36,786663	
<b>blank</b>	37,712580	
<b>NTC1</b>	36,443550	36,54
<b>NTC2</b>	36,637714	

Priloga 3: Rezultati qPCR analize za gen 16S-ciano z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.

Ime vzorca	Ct	Ct povprečje	Tm vrednost	Tm povprečje
<b>Perniško jezero 10x</b>	21,935947	22,00	81,2	81,23
<b>Perniško jezero 10x</b>	21,808641		81,4	
<b>Perniško jezero 10x</b>	22,248838		81,1	
<b>Perniško jezero 100x</b>	20,681091	20,71	81,4	81,40
<b>Perniško jezero 100x</b>	20,718922		81,4	
<b>Perniško jezero 100x</b>	20,733677		81,4	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	20,776066	20,92	81,4	81,50
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	20,987299		81,4	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	20,998842		81,7	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	22,952084	23,11	81,7	81,70
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	23,081250		81,7	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	23,300112		81,7	
<b>Planktothrix 10x</b>	13,606848	13,76	81,7	81,55
<b>Planktothrix 10x</b>	13,910488		81,4	
<b>blank</b>	34,370064	34,88	81,7	75,13
<b>blank</b>	35,381550		81,7	
<b>blank</b>	Undetermined		62,0	
<b>NTC1</b>	39,475803	39,48	75,0	68,50
<b>NTC2</b>	Undetermined		62,0	

Priloga 4: Rezultati qPCR analize za gen 16S-Pla z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.

Ime vzorca	Ct	Ct povprečje	Tm vrednost	Tm povprečje
<b>Perniško jezero 10x</b>	28,962784	28,86	77,4	77,40
<b>Perniško jezero 10x</b>	28,808146		77,4	
<b>Perniško jezero 10x</b>	28,804396		77,4	
<b>Perniško jezero 100x</b>	25,391588	25,55	76,6	76,50
<b>Perniško jezero 100x</b>	25,594925		76,3	
<b>Perniško jezero 100x</b>	25,673946		76,6	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	22,863323	22,99	77,7	77,70
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	22,997720		77,7	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	23,094680		77,7	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	25,974947	26,40	77,7	77,60
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	26,986982		77,4	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	26,246206		77,7	
<b>Planktothrix 10x</b>	12,769984	13,02	77,9	77,90
<b>Planktothrix 10x</b>	13,278248		77,9	
<b>blank</b>	Undetermined	Undetermined	63,5	62,53
<b>blank</b>	Undetermined		62,2	
<b>blank</b>	Undetermined		61,9	
<b>NTC1</b>	Undetermined	Undetermined	62,0	61,95
<b>NTC2</b>	Undetermined		61,9	

Priloga 5: Rezultati qPCR analize za gen *mcy* z 10- in 100-kratnimi redčitvami vzorcev.

Ime vzorca	Ct	Ct povprečje	Tm vrednost	Tm povprečje
<b>Perniško jezero 10x</b>	41,964990	41,96	72,3	66,40
<b>Perniško jezero 10x</b>	Undetermined		61,9	
<b>Perniško jezero 10x</b>	Undetermined		65	
<b>Perniško jezero 100x</b>	34,938427	34,68	81,4	81,63
<b>Perniško jezero 100x</b>	34,535122		84,6	
<b>Perniško jezero 100x</b>	34,563564		78,9	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	33,709015	34,89	76,8	78,77
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	36,199276		81,9	
<b>Velenjsko jezero 10x</b>	34,764430		77,6	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	33,223045	33,46	81,7	81,30
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	33,890373		79,8	
<b>Velenjsko jezero 100x</b>	33,258476		82,4	
<b>Planktothrix 10x</b>	34,315410	34,24	81,4	80,30
<b>Planktothrix 10x</b>	34,173584		79,2	
<b>blank</b>	Undetermined	Undetermined	63,7	63,33
<b>blank</b>	Undetermined		63,4	
<b>blank</b>	Undetermined		62,9	
<b>NTC1</b>	Undetermined	Undetermined	61,9	61,90
<b>NTC2</b>	Undetermined		61,9	