

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja PECMAN

**IZOLACIJA IN ELEKTROKEMIČNA RAZGRADNJA
MIKROCISTINA TER UGOTAVLJANJE
TOKSIČNOSTI PRODUKTOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja PECMAN

**IZOLACIJA IN ELEKTROKEMIČNA RAZGRADNJA
MIKROCISTINA TER UGOTAVLJANJE TOKSIČNOSTI
PRODUKTOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**MICROCYSTIN ISOLATION, ELECTROCHEMICAL
DEGRADATION AND TOXICITY TEST OF BYPRODUCTS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije.
Delo je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo, Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Domna Leštana, za somentorja dr. Andreja Megliča in za recenzenta izr. prof. dr. Bojana Sedmaka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Domen LEŠTAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: dr. Andrej MEGLIČ
Arhel d. o. o., Ljubljana

Član: izr. prof. dr. Bojan SEDMAK
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anja Pecman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 579.68:582:232:615.372:544.642(043.2)
KG cianobakterije/toksini/mikrocistini/mikrocistin-RR/elektrokemična razgradnja/
z borom dopirana diamantna anoda/BDDA/ toksičnost/inhibicija PP1
AV PECMAN, Anja
SA LEŠTAN, Domen (mentor)/MEGLIČ, Andrej (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN IZOLACIJA IN ELEKTROKEMIČNA RAZGRADNJA MIKROCISTINA TER
UGOTAVLJANJE TOKSIČNOSTI PRODUKTOV
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XIII, 55 str., 7 pregl., 19 sl., 116 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Mikrocistini so najpogostejši toksini cianobakterij. Prisotnost mikrocistinov v vodi negativno vpliva na kopenske in vodne organizme ter na zdravje ljudi. V magistrskem delu smo izvedli elektrokemijsko razgradnjo mikrocistina [D-Asp³] MC-RR v Jaworski mediju z uporabo z borom dopirane diamantne elektrode (BDDA) ter preverili biološko aktivnost produktov razgradnje s testom inhibicije proteinske fosfataze 1 (PP1). Elektrokemijsko razgradnjo smo izvedli na dva načina: šaržno pretočno učinkovanje in kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem. Pri obeh načinih smo razgrajevali 10 µM mikrocistina v 10 ml vzorca pri 80 mA toka in pretoku 10 ml/min. Razgradnjo in nastajanje produktov razgradnje mikrocistina smo spremljali s HPLC / PDA (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti / fotodiodni detektor). Po 50 minutah učinkovanja BDDA na način šaržnega pretočnega učinkovanja se je razgradilo 67 % mikrocistina. Veliko bolj učinkovita je bila razgradnja po 50 minutah kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem, saj se je razgradilo 91 % mikrocistina. S časom učinkovanja se je biološka aktivnost mikrocistina in produktov razgradnje zmanjševala. Po 50 minutah kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem ima mikrocistin zmanjšano inhibitorno aktivnost v primerjavi z mikrocistinom pred tretiranjem. Po dobljenih rezultatih je BDDA tehnologija uspešna metoda razgrajevanja mikrocistina raztopljenega v Jaworski mediju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.68:582:232:615.372:544.642(043.2)
CX cyanobacteria/toxins/microcystins/microcystin-RR/electrochemical degradation/
boron doped diamond anode/BDDA/ toxicity/inhibition of PP1
AU PECMAN, Anja
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)/MEGLIČ, Andrej (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programmes in
Biotechnology
PY 2015
TY MICROCYSTIN ISOLATION, ELECTROCHEMICAL DEGRADATION AND
TOXICITY TEST OF BYPRODUCTS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIII, 55 p., 7 tab., 19 fig., 116 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Microcystins are the most common cyanobacterial toxins. The presence of microcystins in water has a negative impact on terrestrial and aquatic organisms and human health. In this thesis, we carried out the electrochemical degradation of microcystins [D-Asp³] MC-RR in Jaworski medium using the electrodes with boron-doped diamond anode (BDDA) and tested the biological activity of degradation products with protein phosphatase 1 (PP1) inhibition assay. Electrochemical degradation was performed in two ways: continuous flow mode with stirring and batch flow mode. In both modes we degraded 10 µM of microcystins dissolved in 10 ml sample at 80 mA and at current flow 10 ml/min for 50 minutes. Degradation and the formation of microcystin degradation products was monitored by HPLC / PDA (high performance liquid chromatography / photo diode array). The biological activities of microcystin and the degradation products were decreased by both methods. However, continuous flow mode with stirring was the more effective method for degrading microcystin, degrading 91 % of microcystins compared to 67 % of microcystin degraded using the batch flow mode. After 50 minutes of continuous flow mode with stirring the microcystin reduced inhibitory activity in comparison with microcystin before treatment. According to the obtained results BDDA technology is an effective method for the decomposition of microcystins dissolved in Jaworski medium.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNO O CIANOBAKTERIJAH	3
2.2 MASOVNO POJAVLJANJE CIANOBAKTERIJ - CVETENJE	4
2.2.1 Cvetenje cianobakterij v Sloveniji	5
2.2.1.1 Blejsko jezero	5
2.3 CIANOTOKSINI	6
2.3.1 Mikrocistini	7
2.3.1.1 Toksičnost mikrocistinov	9
2.3.1.2 Zastrupitve z mikrocistini	10
2.4 METODE ZA ODSTRANJEVANJE CIANOTOKSINOV	11
2.4.1 Metode odstranjevanja znotrajceličnih toksinov	11
2.4.2 Elektrokemijska razgradnja mikrocistina z z borom dopirano diamantno anodo (BDDA)	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 EKSTRAKCIJA MIKROCISTINA IN PRIPRAVA VZORCA ZA HPLC	16
3.1.1 Priprava vzorca za analitsko HPLC	16
3.1.2 Priprava vzorca za preparativno HPLC	16
3.2 ANALIZA VZORCA S HPLC	17
3.3 IZOLACIJA MIKROCISTINA	17
3.4 ELEKTROLITSKA CELICA Z Z BOROM DOPIRANO DIAMANTNO ANODO (BDDA)	18
3.4.1 Razgradnja raztopine mikrocistina z BDDA v mediju Jaworski	18
3.4.1.1 Šaržno pretočno učinkovanje	20
3.4.1.2 Kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem	21
3.5 ANALIZA VZORCEV PO UČINKOVANJU Z BDDA	22
3.5.1 Ugotavljanje inhibitornega delovanja mikrocistina in produktov elektrokemične razgradnje	22
4 REZULTATI	24
4.1 IZOLACIJA MIKROCISTINA	24

4.1.1	Ekstrakcija mikrocistina	24
4.1.2	Izolacija čistega mikrocistina MC-RR	25
4.2	ELEKTROKEMIČNA RAZGRADNJA MIKROCISTINA Z BDDA	25
4.2.1	Šaržno pretočno učinkovanje	26
4.2.2	Kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem	31
4.3	INHIBICIJA PP1 Z MIKROCISTINOM IN PRODUKTI RAZGRADNJE MIKROCISTINA	36
5	RAZPRAVA	39
5.1	ELEKTOKEMIČNA RAZGRADNJE MIKROCISTINA Z BDDA	39
5.1.1	Vpliv elektrolitov na razgradnjo mikrocistina	39
5.1.2	Vpliv načina izvedbe BDDA elektrokemijske oksidacije na razgradnjo mikrocistina	40
5.1.3	Vpliv časa učinkovanja BDDA na razgradnjo mikrocistina	40
5.1.4	Vpliv časa učinkovanja BDDA na spremenjanje mikrocistina in nastajanje produktov razgradnje	42
5.2	INHIBICIJA PP1 S PRODUKTI RAZGRADNJE	43
6	SKLEPI	45
7	POVZETEK	46
8	VIRI	47
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Cvetenje <i>Planktothrix (Oscillatoria) rubescens</i> na Blejskem jezeru (Sedmak, 2012: 16, 28). A) Površinsko cvetenje cianobakterije <i>P. rubescens</i> . B) Mikroskopska slika <i>P. rubescens</i>	6
Slika 2: Splošna struktura mikrocistina (po Sedmak, 2012: 45).	8
Slika 3: Shema elektrolitske celice.	18
Slika 4: Shema šaržnega pretočnega učinkovanja.	20
Slika 5: Shema kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem.	21
Slika 6: Določitev površine vrhov na elucijskem diagramu.....	22
Slika 7: Elucijski diagram ekstrakta cianobakterij vrste <i>Planktothrix rubescens</i> iz Blejskega jezera..	24
Slika 8: Elucijski diagram izoliranega MC-RR.....	25
Slika 9: Elucijski diagram MC-RR redčenega do končne koncentracije 10 μM v Jaworskem mediju in vzorcev po različnih časih učinkovanja z BDDA na šaržno pretočni način.....	26
Slika 10: Zmanjševanje površine vrhov zaradi učinkovanja BDDA na šaržno pretočni način.....	28
Slika 11: Spreminjanje spektra mikrocistina MC-RR po učinkovanju z BDDA na šaržno pretočni način..	29
Slika 12: Spektri produktov razgradnje (II) po učinkovanju z BDDA na šaržno pretočni način.....	30
Slika 13: Elucijski diagram MC-RR redčenega do končne koncentracije 10 μM v Jaworskem mediju in vzorcev po različnih časih učinkovanja z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem..	31
Slika 14: Zmanjševanje površine vrhov zaradi učinkovanja BDDA na kontrinuirano pretočni način z mešanjem.	33

Slika 15: Spektri MC-RR po učinkovanju z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem.....34

Slika 16: Spektri produktov razgradnje (II) po učinkovanja z BDDA na kontinuiran pretočni način z mešanjem..35

Slika 17 Hitrost encimske reakcije $[v_i/v_0]$ pri kontrolah. K_N (vzorec brez inhibitorja, negativna kontrola inhibicije), K_{N+JM} (vzorec brez inhibitorja z medijem Jaworski), $K-E$ (kontrola brez encima) in $K-S$ (kontrola brez substrata).....36

Slika 18: Inhibicija PP1 z MC-RR.....37

Slika 19: Koncentracija MC-RR [nM] ter inhibicija PP1 [$1-v_i/v_0$] v vzorcih pred in po učinkovanju z BDDA na kontinuiran pretočni način z mešanjem..38

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Toksini cianobakterij, proizvajalke ter tarčni organi (prirejeno po Sedmak, 2012: 34; Yadav in sod., 2011: 147).....	7
Preglednica 2: Strukturne variacije najpogostejših mikrocistinov (prirejeno po Sedmak, 2012: 46; Sarma, 2012: 519)	8
Preglednica 3: Nabor metod odstranjevanja znotrajceličnih in zunajceličnih cianotoksinov.	13
Preglednica 4: Jaworski medij za gojenje fitoplanktonskih organizmov (Thompson, 1988).	19
Preglednica 5: Retenzijski časi in površine vrhov vzorcev pred in po tretiranju MC-RR z BDDA na šaržno pretočni način.	27
Preglednica 6: Retenzijski časi in površine vrhov vzorcev pred in po tretiranju MC-RR z BDDA na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem.	32
Preglednica 7: Koncentracije MC-RR pred in po BDDA učinkovanju na kontinuirano pretočni način z mešanjem v koncentracijskem območju 10 in 20 nM skupne koncentracije MC-RR in PR (II).	38

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Abs.	absorbanca
a. e.	arbitrarne enote
Ala	alanin
ANTX-a	anatoksin A
Arg	arginin
Asp	asparaginska kislina
BDDA	z borom dopirana diamantna anoda (ang. boron doped diamond anode)
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovin serum albumin)
B1	tiamin
B12	kobalamin
CYL	cilindrospermopsin
Cys	cistein
Da	dalton
DAF	flotacije z raztopljenim zrakom (ang. dissolved air flotation)
D-Asp	desnosučna asparaginska kislina
DTT	ditiotreitol
e ⁻	elektron
EDTA	etildiaminetetraocetna kislina
EDTAFeNa	raztopina EDTA z železom (Fe) in natrijem (Na)
EDTANa	raztopina EDTA z natrijem (Na).
GAC	aktivni ogljik v granulah (ang. granulated activated carbon)
H ⁺	vodikov proton
HPLC / PDA	tekočinska kromatografija visoke ločljivost (ang. high performance liquid chromatography) / fotodiodni detektor (ang. photo diode array)

IARC	Mednarodna agencija za raziskave o raku (ang. International Agency for Research on Cancer)
IC_{50}	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico
k	naklon premice
K_0	negativna kontrola: izoliran mikrocistin redčen v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 μM ; negativna kontrola ni bila voden skozi BDDA elektrolitsko celico
K	kontrola: izoliran mikrocistin redčen v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 μM ter enkrat voden skozi neaktivno BDDA elektrolitsko celico; s tem se je določilo, koliko mikrocistina se izgubi zaradi samega pretoka (vezanje na stene elektrolitske celice) in ne zaradi elektrokemične razgradnje
K_N	negativna kontrola inhibicije: encimska aktivnost proteinske fosfataze 1 brez mikrocistina
λ	valovna dolžina
LD_{50}	letalna doza 50 (ang. lethal dose 50) je smrtni odmerek, pri katerem pogine 50 % poskusnih osebkov
Leu	levcin
MC-LR	mikrocistin s spremenljivima aminokislinama L-levcinom in L-argininom
MC-RR	mikrocistin z L-argininom na obeh spremenljivih mestih
MC-YR	mikrocistin z zamenljivima aminokislinama L-tirozinom in L-argininom
Met	metionin
min	minuta
μS	električna prevodnost v mikro siemensih
NOD	nodularin
OH^*	hidroksilni radikal
PAC	aktivni ogljik v prahu (ang. powdered activated carbon)
Phe	fenilalanin

PK	pozitivna kontrola inhibicije: encimska aktivnost proteinske fosfataze 1 in izoliranega mikrocistina v različnih koncentracijskih območjih
p-NPP	p-nitrofenilfosfat
PP1	proteinska fosfataza 1
PP2	proteinska fosfataza 2
PP2A	proteinska fosfataza 2, podenota A
PP2B	proteinska fosfataza 2, podenota B
PP2C	proteinska fosfataza 2, podenota C
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina (ang. rRNA: ribosomal Ribonucleic Acid)
s	sekunda
TDI	dopustni dnevni vnos (ang. tolerable daily intake)
Tris-HCl	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol – vodikov klorid
Tyr	tirozin
U	enota encima, ki katalizira pretvorbo 1 µM substrata/min
UV	ultravijolično valovanje
UVB	ultravijolično valovanje z valovno dolžino od 290 do 320 nm
V	volt
V _K	vzorec z redčenim mikrocistinom v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 µM in voden skozi BDDA elektrolitsko celico na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem
V _{K10}	vzorec kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem po 10 minutah
V _{K20}	vzorec kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem po 20 minutah
V _{K30}	vzorec kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem po 30 minutah
V _{K40}	vzorec kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem po 40 minutah
V _{K50}	vzorec kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem po 50 minutah

Vš	vzorec z redčenim mikrocistinom v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 µM in voden skozi BDDA elektrolitsko celico na način šaržnega pretočnega učinkovanja
Vš1	vzorci šaržno pretočnega učinkovanja po 1 minutu
Vš10	vzorci šaržno pretočnega učinkovanja po 10 minutah
Vš20	vzorci šaržno pretočnega učinkovanja po 20 minutah
Vš30	vzorci šaržno pretočnega učinkovanja po 30 minutah
Vš40	vzorci šaržno pretočnega učinkovanja po 40 minutah
Vš50	vzorci šaržno pretočnega učinkovanja po 50 minutah

1 UVOD

Cianobakterije so organizmi, ki jih uvrščamo med najstarejše prokarionte in izmed prvih, ki so sposobni opravljati oksigeno fotosintezo (Yadav in sod., 2011). V razred *Cyanophyceae* spada po klasifikaciji mednarodnega pravilnika za botanično nomenklaturo 150 rodov, v katerih je 2000 vrst (Van den Hoek, 1995). Cianobakterije za rast potrebujejo enostavna hranila, kot so soli in organske snovi (Sedmak, 2012), glavni način pridobivanja energije je fotosinteza (Schopf, 1993, 2000). Nezahtevnost cianobakterij je razlog za njihov razmah v 50 % evtrofnih jezer po vsem svetu (Sedmak, 2012). Med rastjo cianobakterije proizvajajo različne sekundarne metabolite, med njimi tudi za druga živa bitja zelo strupene cianotoksine (Yadav in sod., 2011). Slednje je sposobno izdelovati okoli 40 od 150-ih rodov (Van Apeldoorn in sod., 2007). Toksična cvetenja cianobakterij so zabeležena v kar 29 državah na petih celinah (Sarma, 2012). Imajo negativen ekološki, biogeokemični, zdravstveni in ekonomski vpliv (Pearl in sod., 2011). Prvi zapis o potencialno toksičnem cianobakterijskem cvetenju v Sloveniji je iz leta 1991 (Sedmak in Kosi, 1991). Cvetenja cianobakterij so značilna predvsem za SV del Slovenije. Med vodnimi telesi, v katerih nastopajo vsakoletna cvetenja, je tudi Blejsko jezero (Sedmak in Kosi, 1997).

Mikrocistini so najpogosteji cianotoksini v cianobakterijskih cvetenjih. So znotrajcelični hepatotoksini. Glavni producenti mikrocistinov so cianobakterije iz rodov: *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena* in *Planktothrix*. Pri vrsti *Planktothrix rubescens* je tudi v Sloveniji izrazito prisoten [D-Asp³] mikrocistin-RR z variabilnimi aminokislinsimi Asp² in Asp⁴ (Grach-Pogrebinsky in sod., 2004). Mikrocistini delujejo inhibitorno na proteinske serin / treonin fosfataze tipa 1 in 2A, kar povzroči reorganizacijo skeletnih elementov in posledično deformacijo celic (Rao in sod., 2002). Dovoljena koncentracija mikrocistina v pitni vodi je 1 µg/l skupnega MC-LR oziroma, dopustni dnevni vnos (TDI) je 0,04 µg/kg telesne teže (Cyanobacterial ..., 2003).

Poznamo različne metode priprave pitne vode, ki naj bi uporabnike zaščitile pred izpostavljenostjo cianotoksinom. Delimo jih na tiste, ki onesnažilo odstranijo, in tiste, ki ga razgradijo. Izbira postopka je odvisna od kakovosti vodnega vira in od zakonodaje posameznih držav (Merel in sod., 2013).

V zadnjih letih se je razvila metoda elektrokemijske oksidacije (Zhang in sod., 2009), ki je okolju prijazna metoda čiščenja vode, saj lahko razgradi različna biološka onesnaževala. Kot odličen material se je izkazala z borom dopirana diamantna anoda (BDDA). Le-ta ima visoko anodno stabilnost in visok nad-potencial. Visok nad-potencial (+3,55 V) omogoča generiranje intermediata razgradnje vode - hidroksilnih radikalov (OH^\cdot), ki reagirajo z organskimi onesnažili in jih popolnoma mineralizirajo (Panizza in Cerisola, 2005).

1.1 CILJI NALOGE

1. Izolirati mikrocistin iz naravne kulture *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera.
2. Razgraditi mikrocistin z borom dopirano diamantno anodo (BDDA).
3. S spremenjanjem parametrov (pretok skozi elektrolitsko celico, tok, napetost) ugotoviti proces razgradnje mikrocistina.
4. Ugotoviti produkte razgradnje (HPLC / PDA).
5. Ugotavljanje toksičnosti produktov razgradnje (inhibicija PP1).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo postavili naslednji hipotezi.

1. Z BDDA lahko uspešno razgradimo mikrocistin pridobljen iz kulture cianobakterij.
2. Produkti razgradnje mikrocistina ne bodo izkazovali toksičnih učinkov, oziroma bo prišlo do popolne mineralizacije toksina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O CIANOBAKTERIJAH

Cianobakterije so ena najstarejših skupin organizmov na Zemlji, stare vsaj 3,5 milijarde let. S svojim množičnim pojavljanjem so oblikovale oksično atmosfero našega planeta in s tem omogočile razvoj življenja, kakršnega poznamo danes (Schopf, 1993; Catling in Claire, 2005). Cianobakterije so pomembni primarni producentje, skupaj z algami opravljajo več kot polovico fotosinteze na planetu. Tudi zaradi sposobnosti fiksacije dušika imajo pomembno vlogo pri biogeokemijskem kroženju snovi v naravi (Rai, 1990).

Cianobakterije, kot jih poznamo danes, so aerobne fotoavtotrofne bakterije. Njihov glavni način pridobivanja energije je fotosinteza. Njihovo razmnoževanje poteka s cepitvijo. V literaturi pogosto navajajo, da so cianobakterije po Gramu negativne bakterije, vendar v zadnjem času znanstveniki ugotavljajo, da imajo značilnosti tako po Gramu negativnih kot pozitivnih bakterij (Schopf, 1993, 2000). Cianobakterije, ali kot je ponekod še vedno v uporabi izraz modrozelene cepljivke, so prokarionti. Nimajo jasno razmejenega jedra, niti ostalih organelov in imajo precej manjše celice kot alge. Obsežen del notranjosti cianobakterijske celice zapolnjujejo tilakoide, kjer so nameščeni fotosintezni pigmenti. Zeleni klorofil *a* lahko prekrivajo karotenoidi in različni pomožni pigmenti: fikocianini, alofikocianini in fikoeritrini. Zaradi prisotnosti različnih barvil ima barva celic in posledično cianobakterijskega cveta razpon od modrozelene do vijolične. Tako lahko tudi na podlagi barve ločimo cianobakterijski cvet od ostalih fitoplanktonskih cvetenj. Pomožni pigmenti omogočajo zajemanje svetlobe v širšem delu spektra kot ostali fitoplankonti (od 600 – 650 nm) in zaradi tega lahko uspešno preživijo tudi pri nizkih intenzitetah svetlobe, saj uspešno izrabljajo tiste dele svetlobnega spektra, ki jih drugi fitoplanktonski organizmi ne morejo (Cohen-Bazire in Bryant, 1982). Ekološko prednost predstavljajo tudi plinski mehurčki, ki so pomembna značilnost nekaterih vrst cianobakterij. Z njihovo pomočjo uravnavaajo svoj položaj v vodnem stolpcu in tako najbolje izkoriščajo fizikalne (svetlobo) in kemijske (hrano) dejavnike okolja (Walsby, 1978).

Cianobakterije taksonomsko razvrščamo z uporabo številnih genetskih analiz in kemotaksonomskeh metod (analiza 16S in 23S rRNK, uporaba označevalcev, prisotnost specifičnih poliaminov, pigmentov itd.), vendar se za hitro določanje toksičnih cianobakterij še vedno uporablja tudi klasična taksonomija, ki temelji na morfoloških, ekoloških in razvojnih značilnostih posamezne vrste (Anagnostidis in Komarek, 1985, cit. po Sedmak, 2012; Komarek in Anagnostidis, 1986, cit. po Sedmak, 2012; Staley in sod., 1989, cit. po Sedmak, 2012). Glede na osnovno morfologijo cianobakterije razdelimo na krogličaste enocelične ali kolonijske ter na mnogocelične nitaste, ki so lahko razvezjane ali ne razvezjane (Sedmak, 2012). Cianobakterije razvrščamo tudi glede na ekotipe: na planktonske cianobakterije, ki živijo v vodnem stolpcu, in na bentonske cianobakterije, ki živijo pritrjeno na dnu vodnega telesa in se le občasno pojavit na vodni površini (Mur in sod., 1993; The molecular ..., 1994).

2.2 MASOVNO POJAVLJANJE CIANOBAKTERIJ - CVETENJE

Naraščanje prebivalstva in posledično industrijske ter kmetijske proizvodnje pomeni povečevanje ne le potreb po pitni vodi, ampak tudi njeno onesnaževanje. Evtrofikacija voda, ki je sicer naravni pojav, je močno povezana s človeško aktivnostjo. Povečuje se vnašanje hranil antropogenega izvora iz komunalnih voda ter izpiranje gnojil iz agrarnih površin, s čimer se ustvarijo razmere za prekomeren razmah številnih organizmov, med njimi tudi strupenih cianobakterij. Hranila, ki jih za svojo rast potrebujejo cianobakterije, so lahko že preproste soli in organske snovi. Ravno ta nezahtevnost in možnost prilagajanja jim omogoča popolno prevlado v evtrofnih vodah in ustvarjanje velike biomase. V povprečju naj bi bilo 50 % vseh jezer evtrofnih. Evtrofikacija ne prizadene le jezer ampak tudi počasi tekoče reke (Sedmak, 2012).

Pojav cianobakterijskega cveta nima mednarodne definicije niti kvantifikacije. V splošnem gre za povečano produkcijo cianobakterijske biomase v kratkem časovnem intervalu z majhno fitoplanktonsko diverziteto znotraj cveta (Merel in sod., 2013). Kolaps cianobakterij, ki so sposobne tvoriti toksine, lahko privede do sprostiteve velike količine le-teh v vodo (Blom in sod., 2001). Do razpada cveta lahko pride zaradi uvajanja kemikalij, kot sta bakrov sulfat (Sedmak, 2012) in klor (Azevedo in sod., 2002), oziroma je razpad cveta posledica staranja le-tega (Sedmak, 2012). Cianobakterije, ki so sposobne tvoriti toksična cvetenja, pripadajo rodovom *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Nodularia* in *Nostoc* (Pearl in sod., 2011).

Do cvetenj prihaja predvsem v poletnih in jesenskih mesecih, vendar so vse bolj pogosta tudi zimska cvetenja, saj cianobakterije lahko preživijo pod ledom (Sedmak, 2006). Cvetenje cianobakterij ima negativen vpliv ne le na živali in ljudi, temveč tudi na vodno okolje in življenje v njem, saj se zaradi cianobakterijskega cvetenja zmanjšuje biodiverziteta. Cianobakterije imajo namreč hitrejšo rast kot večina fitoplanktonskih organizmov, zato jih lahko izrinejo (Sedmak in Kosi, 1998). Zaradi cvetenja pa obstaja tudi nevarnost anoksije. Velika biomasa cianobakterij lahko v nočnih urah, ko je dihanje intenzivno in ni fotosinteze, porabi ves razpoložljiv kisik v vodnem telesu, kar lahko privede k pогину vseh na pomankanje kisika občutljivih živilih bitij v vodi (Sedmak, 2012).

Negativni vplivi so ekološki, biogeokemični, zdravstveni ter tudi ekonomski. Ogrožena je ekološka integriteta in trajnostna uporaba številnih vodnih teles po vsem svetu (Pearl in sod., 2011). Sarma (2012) navaja kar 29 držav na petih celinah, kjer so opazili toksično cvetenje cianobakterij. Na pogosteje pojavljanje toksičnih sojev cianobakterij lahko vpliva tudi povečano UVB sevanje, ki spremišča globalne spremembe klime (Yi in sod., 2013).

2.2.1 Cvetenje cianobakterij v Sloveniji

Jezera v Sloveniji načeloma niso vir pitne vode, uporabljamo jih za različne rekreativne dejavnosti, ribolov in napajanje živine (Remec-Rekar in Bat, 2003). Cvetenja cianobakterij znižuje estetsko vrednost, rekreacijsko uporabnost, uporabnost v kmetijstvu ter predstavljajo resno tveganje za ljudi, živino, divjad ter vodne organizme (Sedmak in sod., 2008).

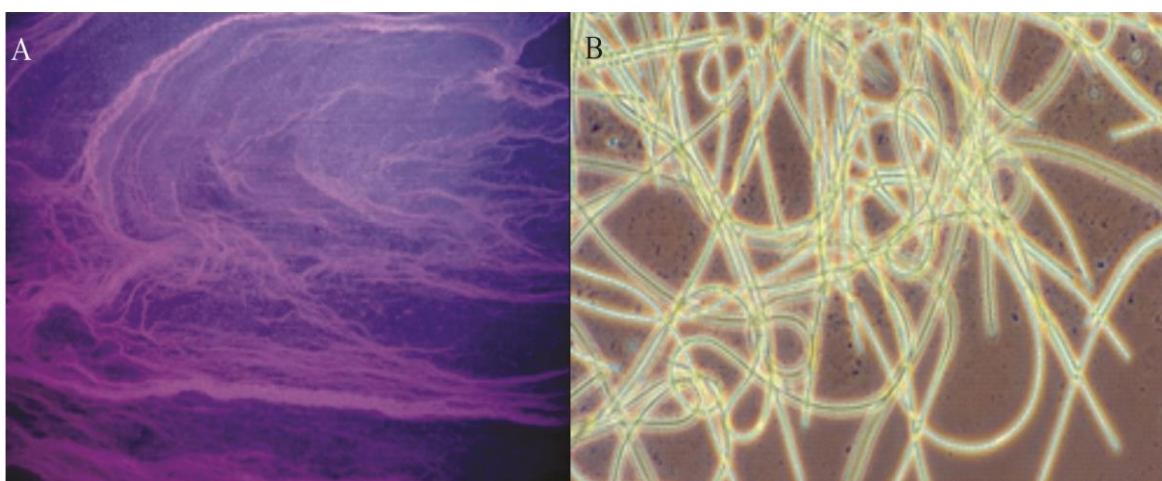
Prvo poročilo o potencialni toksičnosti cvetenj cianobakterij v Sloveniji je iz leta 1991 (Sedmak in Kosi, 1991). V Sloveniji je cianobakterijsko cvetenje značilno predvsem za SV države. Na tem območju je razširjeno kmetijstvo, kar je eden od razlogov za evtrofikacijo vodnih teles. Cvetenja se tu pojavljajo redno in so masovnih razsežnosti. Na S in SZ je Alpski svet z visokogorskimi jezeri, kjer cvetenj ni, z izjemo Blejskega jezera (Sedmak in Kosi, 1997).

2.2.1.1 Blejsko jezero

Blejsko jezero je poleg Bohinjskega edino večje naravno stalno jezero v Republiki Sloveniji. Zaradi turistične tradicije in naravnih lepot je najbolj znano slovensko jezero. Jezero je studenčnega tipa, napaja ga 12 studencev, zaradi majhne pretočnosti je ekološko zelo ranljivo, zaradi zatišne lege pa je mirovanje vode še izrazitejše. Temperaturna plastovitost je izrazita že v aprilu, obdobje spomladanske in jesenske homotermije, ko se voda premeša v različnih globinah in se temperatura izenači, je zelo kratko. Območje okoli jezera je relativno gosto poseljeno, promet, turizem in kmetijstvo pa dodatno bremenijo pojezerje (Remec-Rekar in Bat, 2003).

Prvi zapisi o onesnaževanju so z začetka dvajsetega stoletja (Gradnik, 1946; Rismal in Kompare 1993, cit. po Remec-Rekar in Bat, 2003). Kakovost jezera se je občutno poslabšala v 50-ih letih 20. stoletja, saj zaradi razmaha turizma pomanjkljiva kanalizacija ni več zadoščala potrebam. Vdor hraničnih snovi je začel spodbujati rast rastlinskega planktona in cianobakterij (*Planktothrix rubescens*), kar je negativno vplivalo tako na videz jezera kot na pomanjkanje kisika v vodi. V nadaljnjih letih so povečali vtok (1964) in izztok (1980/81) ter popravili kanalizacijo (1982 - 1985). Jezero, ki je pred posegi veljalo za evtrofno, ga od leta 1983 uvrščamo med mezotrofna (Remec-Rekar in Bat, 2003).

Kljub sanaciji Blejsko jezero zaradi porušenega ravnotežja v preteklosti še vedno ni stabilno, saj je prilaganje življenske združbe na nove razmere izredno zapleten in dolgotrajen proces, razen tega je vnos hraničnih snovi iz pojezerja občasno še vedno prevelik, na kar nas opozarjajo občasnna cvetenja (Remec-Rekar in Bat, 2003). Vrsta, ki se množično pojavlja, je filamentozna cianobakterija *Planktothrix rubescens*. *P. rubescens* je oligotrofna do mezotrofna cianobakterija, ki naseljuje globlja jezera. Lahko cveti skozi vse leto, saj stratificira v metalimični plasti. Vsebuje rdeč pigment fikoeritrin. Soji te vrste lahko proizvajajo mikrocistine (Sedmak in sod., 2008).



Slika 1: Cvetenje *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* v Blejskem jezeru (Sedmak, 2012: 16, 28). A) Površinsko cvetenje cianobakterije *P. rubescens*. B) Mikroskopska slika *P. rubescens*.

2.3 CIANOTOKSINI

Pomembna lastnost cianobakterij je sposobnost tvorbe biološko aktivnih snovi cianopeptidov in ostalih nevarnih cianotoksinov. Cianotoksine najdemo v cianobakterijskih celicah, v večjih koncentracijah tudi v okoljskih vodah, zato se pri analizi vode upošteva tako koncentracijo cianobakterij kot tudi skupna količina cianotoksinov (Sedmak, 2012).

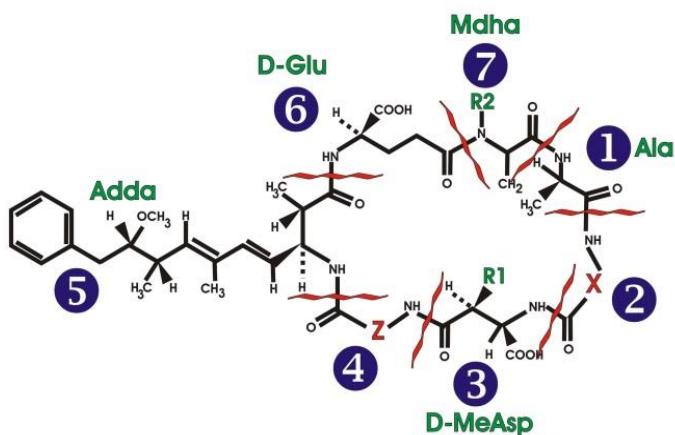
Toksi cianobakterij ali cianotoksi so zelo raznolika skupina naravnih strupenih snovi, ki z vidika strupenosti predstavljajo večjo grožnjo za kopenske organizme kot za vodne. Na višje organizme delujejo hepatotoksično, nevrotoksično, dermatotoksično, genotoksično ter kot splošni inhibitorji proteinske sinteze (Sedmak, 2012). Primeri različnih toksinov cianobakterij, našteti v Preglednici 1, so le nekateri reprezentativni predstavniki številnih različic (Sedmak, 2006).

Preglednica 1: Toksini cianobakterij, proizvajalke ter tarčni organi (prirejeno po Sedmak, 2012: 34; Yadav in sod., 2011: 147).

Skupina toksinov	Tarčni organi (sesalci)	LD ₅₀	Proizvajalke: Cianobakterijski rodovi
CIKLIČNI PEPTIDI – HEPATOTOKSINI			
Mikrocistin (MC)	jetra	50 - 160 µg/kg	<i>Mycrocystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc</i>
Nodularini (NOD)	jetra	50 µg/kg	<i>Nodularia</i>
ALKALOIDI - NEVROTOKSINI			
Anatoksin-a (ANTX-a)	periferno živčevje	375 µg/kg	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
Anatoksin-a(s) (ANTX-a(S))	periferno živčevje	200 - 250 µg/kg	<i>Anabaena</i>
Aplisiatoksin	koža	300 µg/kg	<i>Lyngbya, Schizotrich, Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Lingbiatoksin-a	koža, prebavni trakt	-	<i>Lyngbya</i>
Saksitoksin	periferno živčevje	10 µg/kg	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
CITOTOKSINI			
Cilindrospermopsin	jetra	2,1 mg/kg	<i>Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Umezakia</i>
NEVROTOKSISČNE AMINOKISLINE			
L-BMAA	motorni nevroni	-	vsi rodovi
ENDOTOKSINI			
Lipopolisaharidi (LPS)	dražijo vse izpostavljenje dele telesa	45 - 490 mg/kg	vsi rodovi

2.3.1 Mikrocistini

Mikrocistini so znotrajcelični hepatotoksini. Ime so dobili po cianobakteriji *Microcystis aeruginosa* in so najpogosteji toksini v cianobakterijskih cvetenjih. Glavni producenti mikrocistinov so cianobakterije iz rodov *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena* in *Planktothrix*. Pri vrsti *Planktothrix rubescens* je v Sloveniji najbolj zastopan [D-Asp³] mikrocistin-RR z variabilnimi aminokislinsimi Asp² in Asp⁴ (Grach-Pogrebinsky in sod., 2004). Heptatoksini so sestavljeni iz sedmih aminokislín povezanih v obroč s splošno strukturo: Ciklo-(D-alanin¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamat⁶-Mdha⁷), (Slika 2). Mikrocistini se zaradi različnih variant aminokislín in modifikacij pojavljajo v več kot 80 različicah (Feurstein, 2009). Imena so določena glede na zamenljive aminokisline na mestih X in Z (Preglednica 2).



Slika 2: Splošna struktura mikrocistina: Ciklo-(D-alanin¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamat⁶-Mdha⁷. S številkami so označene aminokisline (po Sedmak, 2012: 45).

Preglednica 2: Strukturne variacije najpogostejših mikrocistinov (prirejeno po Sedmak, 2012: 46; Sarma, 2012: 519).

Mikrocstin (MC)	X	Z	LD ₅₀ (µg/kg)
MC-LR	Leu	Arg	50
MC-RR	Arg	Arg	600
MC-LA	Leu	Ala	50
MC-YR	Tyr	Arg	70
MC-YM	Tyr	Met	50
MC-AR	Ala	Arg	250
MC-FR	Phe	Arg	250
MC-LY	Leu	Tyr	120

Večina danes znanih mikrocistinov ima molekulsko maso med 900 - 1100 Da. Mikrocistini so topni v vodi, etanolu in metanolu. Večurno prekuhavanje jih ne poškoduje, saj so odporni na visoke temperature. Pri ekstremnih pH počasi hidrolizirajo, izpostavitev UV svetlobi povzroči njihovo razgradnjo (Van Apeldoorn in sod., 2007). Mikrocistini so zelo obstojne molekule, dokler so znotraj cianobakterjskih celic. Njihova razgradnja se začne z lizo cveta in s sprostitevijo v okolje, saj je razpolovna doba v njihovem naravnem okolju relativno kratka (Van Apeldoorn in sod., 2007). Proizvodnja mikrocistinov je odvisna od stopnje rasti cianobakterij. V manjši meri se sproščajo v okolje v vseh stopnjah rasti, najvišje vrednosti dosežejo, ko se populacija stara in propada. Ob lizi cveta se namreč celotna vsebina cianobakterije sprosti v okolje (Sedmak, 2012).

2.3.1.1 Toksičnost mikrocistinov

Akutno toksičnost mikrocistinov pripisujemo njihovemu inhibitornemu delovanju na proteinske serin / treonin fosfataze tipa 1 in 2A (Rao in sod., 2002). Delovanje proteinske serin / treonin fosfataze tipa 1 in 2A ima v fiziologiji celice zelo pomembno vlogo. Fosfataze cepijo fosfatne skupine (Cohen, 2002) pri več kot polovici človeških proteinov (Hornbeck in sod., 2011), glavne fosforilacije pa se zgodijo na serinskih ali treoninskih ostankih (Cohen, 2002; Shi, 2009). Glede na encimsko aktivnost ločimo PP1 in PP2, ki jo sestavljajo PP2A, PP2B in PP2C (Ingebritsen in Cohen, 1983). PP1 je serin treonin fosfataza. Prisotna je v vseh celicah, kjer regulira velik nabor celičnih funkcij vključno z metabolizmom glikogena, celičnim ciklom in mišično relaksacijo (Gregorio in sod., 2014). PP2A je ubikvitorna serin treonin fosfataza. Ima pomembno vlogo v celičnih procesih proliferacije, signalne transdukcije in apoptoze (Seshacharyulu in sod., 2013). Vezava mikrocistina na proteinsko fosfatazo poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je nekovalentna interakcija med hidrofobno stransko verigo Adda in glutamil karboksilnim ostankom mikrocistina. Veriga Adda se usede v hidrofobni žep katalitičnega centra proteinske fosfataze in zasidra molekulo na encimu. Naslednji korak je kovalentna povezava med Mdha ostankom mikrocistina in cisteinom-273 pri PP1 oziroma cisteinom-266 pri PP2A. Mikrocistin ima veliko afiniteto do PP1 (MacKintosh in sod. 1995; Runnegar in sod. 1995) in PP2A, toda zelo malo vpliva na PP2B (Yoshizawa in sod., 1990; Honkanen in sod., 1990).

Mikrocistini so akutno toksični pri oralnem, intraperitonealnem in intravenoznem vnosu (Sedmak, 2012). Ker so to hidrofilne molekule, ne morejo neposredno vstopati v celice vretenčarjev in zato izkoriščajo transportne sisteme celic in organov (Rao in sod., 2002). V hepatocitih irreverzibilno inhibirajo PP1 in PP2A, kar strukturno in funkcionalno okvari jetra ter povzroči krvavitve (Codd, 2000). Poškodujejo tudi ledvice (Milutinović in sod., 2002) in druge organe (Filipič in sod., 2007). Znaki akutne zastrupitve so slabost, bledica, težko dihanje, bruhanje, driska, krvavitve v jetrih in smrt zaradi zastoja dihanja (Codd, 2000).

Mikrocistini učinkujejo tudi na genetski material, tako mutageno kot genotoksično (Žegura in sod., 2003 in Filipič in sod., 2007). Z inhibicijo PP1 in PP2A mikrocistin vpliva na delovanje proteinskih kinaz, posledično na aktivnost fosfoproteinov in DNK popravljalnega mehanizma ter ekspresije genov (Campos in Vasconcelos, 2010). Uvrščeni so v IARC skupino 2B kot možni rakotvorni dejavniki (Ingested ..., 2010). Ciklični peptidi lahko reagirajo z mitohondriji živalskih celic in tako v celici pospešujejo oksidativni stres ter s tem tudi apoptizo (Campos in Vasconcelos, 2010).

V organizmih se mikrocistini bioakumulirajo. Bioakumulacija se začne v prehranski verigi pri zooplanktonu, nadaljuje pri ličinkah različnih rakov vse do rib in školjk. Mikrocistini se kopijo predvsem v drobovju, hepatopankreasu in jetrih. Izredno nevarno je v vodnem

okolju, kjer je prisotno cianobakterijsko cvetenje, komercialno gojiti organizme za prehrano. Takšen vodni vir ni primeren niti za namakanje in zalivanje rastlin, saj nekatere rastline kopičijo mikrocistine v različnih rastlinskih delih, kar poleg nevarnosti zastrupitve zmanjšuje pridelok kulturnih rastlin (McElhiney in sod., 2001). Dovoljena koncentracija mikrocistina v pitni vodi je 1 µg/l skupnega MC-LR, dopustni dnevni vnos oziroma TDI (tolerable daily intake) je 0,04 µg/kg telesne teže (Cyanobacterial ..., 2003).

2.3.1.2 Zastrupitve z mikrocistini

Prva zastrupitev, povezana s cianobakterijami, je bila zabeležena leta 1878 v avstralskem jezeru Alexandrina, kjer je zaradi zastrupitve poginilo govedo, konji, ovce, prašiči in psi (Francis, 1878). Avtor navaja cvetenje cianobakterijske vrste *Nodularia spumigena*. *N. spumigena* sicer proizvaja hepatotoksin noduarin, vendar obdukcija ni pokazala abnormalnosti jeter, zato še danes ni znano, kateri toksin je povzročil pogin živali (Francis, 1878). Od takrat do danes so bila toksična cvetenja cianobakterij zabeležena po vsem svetu. Temu posledično so sledile zastrupitve divjih in domačih živali. Starejše objave temeljijo predvsem na opazovanju zastrupljene živali pri obdukijskem pregledu, novejše raziskave pa vključujejo izolacijo toksina, karakterizacijo ter analizo toksičnosti (Ressom in sod., 1994). Dandanes več avtorjev navaja zastrupitve živali z mikrocistinom. Hendeland s sodelavci navaja zastrupitev srne na Norveškem jeseni leta 2000. V njenih jetrih so našli visoko koncentracijo mikrocistina -YR, -LR in -RR (Hendeland in Østensvik, 2010). Na Novi Zelandiji je jeseni leta 2008 poginil pes. Poznejše analize so pokazale, da se je zastrupil zaradi uživanja vode iz reke Waitaki, v kateri je bilo prisotno cianobakterijsko cvetenje. Identificirali so različne variante MC-LR (Wood in sod., 2010). Podobna je bila zgodba na Nizozemskem, kjer so zgodaj jeseni leta 2011 pogini trije psi zaradi zastrupitve z vodo iz jezera Amstelmeer. V jezeru je bilo prisotno cianobakterijsko cvetenje *M. aeruginosa*. Analiza vode iz jezera in izbljuvkov psov je pokazala visoke koncentracije mikrocistina LR (Lürling in Faassen, 2013). Prva dokumentirana zastrupitev ljudi s cianobakterijskimi hepatotoksini je bila leta 1996 zaradi intarvenozne izpostavljenosti v dializni kliniki v Caruaru v Braziliji. Februarja leta 1996 je 116 od 131 pacientov kazalo znake zastrupitve, kot so motnje vida, slabost, bruhanje in mišična slabost. 100 bolnikov je razvilo akutno odpoved jeter, do decembra leta 1996 pa jih je zaradi tako imenovanega Caruaru sindroma 52 umrlo. Analiza čistilne naprave klinike ter serumata in jeter žrtev je pokazala na prisotnost dveh hepatotoksinov: mikrocistina in cilindrospermopsina. Glede na simptome in patološke znake umrlih pacientov je bila zastrupitev in smrtnost posledica zastrupitve z mikrocistinom -YR, -LR in -RR (Azevedo in sod., 2002). Kjer so ljudje kronično izpostavljeni nižjim koncentracijam mikrocistina, raziskave navajajo povezano med izpostavljenostjo mikrocistinu z rakavimi obolenji jeter (Codd, 2000; Ueno in sod., 1996) in okvaro jeter (Chen in sod., 2009).

2.4 METODE ZA ODSTRANJEVANJE CIANOTOKSINOV

Različne metode priprave pitne vode naj bi uporabnike zaščitile tudi pred izpostavljenostjo cianotoksinom. Izbira postopka je odvisna od kakovosti vodnega vira in od zakonodaje posameznih držav. V grobem se delijo na tiste, ki toksine le odstranijo, ter tiste, ki jih razgradijo (Merel in sod., 2013). Toksini cianobakterij so v večini znotrajcelični, vendar se zaradi različnih okoljskih pogojev ali lize celic lahko sprostijo v okolje (Hitzfeld in sod., 2000).

2.4.1 Metode odstranjevanja znotrajceličnih toksinov

Cianobakterije lahko odstranimo s peščeno filtracijo oziroma z metodo koagulacije-flokulacije-sedimentacije. Z dodajanjem koagulantov (aluminijeve ali železove soli) se izniči negativni naboj med celicami. Sledi združevanje večjih delcev (flokulov), ki se usedajo (sedimentirajo) in jih nato odstranimo. Za uspešno koagulacijo je pomembno poznavanje koncentracije cianobakterij in celotne organske snovi ter starost celic (Merel in sod., 2013). Pri cianobakterijah, ki vsebujejo plinske mehurčke, je sedimentacija neprimeren način obdelave (Pieterse in Cloot, 1997). Bolj primerna je uporaba DAF (dissolved air flotation) – flotacije z raztopljenim zrakom (Teixeira in Rosa, 2006a; Teixeira in sod., 2010). Koagulacija – flokulacija – sedimentacija in metoda DAF uspešno odstranita cianobakterije (Hall in sod., 2000) in z njimi znotrajcelične toksine, vendar nimata nobenega vpliva na zunajcelične toksine (Merel in sod., 2013).

Izraz membranska filtracija zajema mikrofiltracijo (premer por 0,1 - 10 µm), ultrafiltracijo (premer por 1 - 100 nm), nanofiltracijo (premer por 1 nm) in reverzno osmozo (premer por 0,1 nm) (Merel in sod., 2013). Z mikrofiltracijo in ultrafiltracijo lahko uspešno odstranimo cianobakterije (Chow in sod., 1997). S pomočjo ultrafiltracije lahko odstranimo tudi zunajcelični mikrocistin (Lee in Walker, 2008), ne pa tudi toksinov manjše molekulske mase. Toksine manjše molekulske mase lahko odstranimo tako, da jih najprej vežemo na aktivno oglje, šele nato izvedemo mikrofiltracijo oziroma ultrafiltracijo (Campinas in Rosa, 2010).

Zunajcelične toksine lahko odstranjujemo tudi z razgrajevanjem. Za to obstaja več metod, ki se delijo na fizikalne, kemijske in biološke. K fizikalnim metodam razgrajevanja zunajceličnih toksinov uvrščamo: razgradnjo z UV svetlobo (fotoliza / fotokataliza), razgradnjo z ultrazvokom ter elektrokemijsko razgradnjo. Kemijske metode temeljijo na molekularni oksidaciji z uvajanjem klora, vodikovega peroksida, permanganata in ozona. Poznamo tudi biološke metode, ki temeljijo na razgradnji toksinov z bakterijami.

Nanofiltracija in reverzna osmoza zaradi majhnih por uspešno odstranita zunajcelični mikrocistin, anatoksin a (ANTX-a) (Teixeira in Rosa, 2006b) in cilindrospermopsine (CYL) (Dixon in sod., 2010, 2011). Reverzna osmoza naj bi uspešno odstranila tudi nodularine (NOD) (Vuori in sod., 1997). Kljub temu, da so metode uspešne, so energetsko

potratne in predrage, da bi si jih lahko privoščili na manjših vodnih zajetjih. Aktivni ogljik se uporablja kot absorbent pri pripravi pitne vode v obliki prahu (PAC) oz. granul (GAC). Na aktivni ogljik se vežejo le ekstracelularni toksini ne pa tudi cianobakterije. Absorpcija je odvisna od onesnaženosti vode, ki jo tretiramo, in od vrste aktivnega ogljika, zato takšna metoda čiščenja vode ni primerna kot individualna, temveč le kot del večstopenjskega procesa (Merel in sod., 2013).

Razgradnjo organske snovi s svetlobo imenujemo fotoliza, pri uporabi katalizatorja pa fotokataliza. Razgradnja onesnažil je ob dodatku katalizatorja (na primer TiO_2) bistveno hitrejša (Senogles in sod., 2001). Z UV sevanjem generiramo hidroksilne radikale, ki so zelo reaktivni oksidanti organskih onesnažil (Merel in sod., 2013). Mikrocistin razgrajuje tudi ultrazvok visokih frekvenc (640 kHz) (Song in sod., 2005). Elektrokemijska razgradnja temelji na električni sintezi hidroksilnih radikalov (Feng in sod., 2005).

Zelo pogosto uporabljeni oksidanti so klor, vodikov peroksid in ozon. Klor je bolj uporaben za dezinfekcijo vode od ozona, saj je bolj obstojen in preprečuje naknadno kontaminacijo (Merel in sod., 2013). Samostojna uporaba vodikovega peroksida ni učinkovita, deluje le ob dodatku ozona (Rositano in sod., 1998). Permanganat veže funkcionalne skupine z več vezmi, zato je primeren za odstranjevanje MC, saj se veže z nenasičenimi vezmi v ADDA-i. Rositano s sodelavci (1998) poroča o razgradnji 95 % MC-LR v 30 minutah. Oksidacijski potencial je primerljiv s klorom. Potrebne so dodatne raziskave o optimizaciji procesa in toksičnosti produktov razgradnje (Sarma, 2012).

Uporabo bakterij *Sphingomonas* za razgradnjo mikrocistina so proučevali v jezeru v Novi Zelandiji. V vodi s koncentracijo 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($[\text{Dha}^7]$ MC-LR in MC-LR) je pri 30° C razgradnja potekala s hitrostjo 8,33 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{dan}$ (Somdee in sod., 2013).

V preglednici 3 so prikazane različne metode odstranjevanja cianotoksinov in cianobakterij. Metode so razvrščene v več skupin glede na to, ali odstranjujejo znotrajcelične ali zunajcelične cianotoksiné, ali metoda temelji na fizikalnih, kemijskih ali bioloških principih delovanja ter ali odstranjevanje poteka tako, da se onesnaževalo razgradi ali odstrani.

Preglednica 3: Nabor metod odstranjevanja znotrajceličnih in zunajceličnih cianotoksinov.

Nahajanje toksina	Metoda	Način odstranjevanja	Vir
Znotrajcelični toksini	Peščena filtracija	Vezanje, zadrževanje cianobakterij, toksina	Chorus in Bartram, 1999; Grützmacher, 2002
	Membranska filtracija (mikrofiltracija in ultrafiltracija)		Chow in sod., 1997; Gijsbertsen-Abrahamse in sod., 2006
	Koagulacija / flokulacija / bistrenje		Mouchet in Bonnelye, 1998
	Flotacija z raztopljenim zrakom (DAF)		Teixeira in Rosa, 2006a; Teixeira in Rosa, 2007; Teixeira in sod., 2010
Zunajcelični toksini	Fizikalne metode	Aktivno oglje: pac / gac	Donati in sod., 1994; Lambert in sod., 1996; Mohamed, 1998
		Membranska filtracija (nanofiltracija in reverzna osmoza)	Teixeira in Rosa, 2006b; Gijsbertsen-Abrahamse in sod., 2006
		Fotoliza in UV sevanje (ozon in vodikov peroksid)	Qiao in sod., 2005; Afzal in sod., 2010; He in sod., 2012; Kaya in Sano, 1998; Tsuji in sod., 1995
		Fotokataliza in UV sevanje (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , WO_3 in $CdSe$)	Senogles in sod., 2001; Lawton in sod., 1999; Liu in sod., 2009
		Ultrasonikacija	Ma in sod., 2005; Song in sod., 2005
		Elektrokemijska razgradnja	Feng in sod., 2005; Zhang in sod., 2009; Tran in Dogui, 2013; Liao in sod., 2014
	Kemijske metode	Kloriranje	Acero in sod., 2005; Newcombe in Nicholson, 2004; Nicholson in sod., 1994; Merel in sod., 2009; Merel in sod., 2010; Rodríguez in sod., 2008; Tsuji in sod., 1997
		Vodikov peroksid	Rositano in sod., 1998
		Permanganat	Rositano in sod., 1998
		Ozon	Brooke in sod., 2006; Newcombe in Nicholson, 2004; Al Momani in Jarrah, 2010; Miao in sod., 2010
	Biološke metode	Bakterijska razgradnja	Somdee in sod., 2013
	Razgradnja toksina		

Metode odtsranjevanja cianobakterij in z njimi znotrajceličnih cianotoksinov imajo le omejeno učinkovitost in so neučinkovite pri odstranjevanju samega mikrocistina (Donati in

sod., 1994; Tran in Dogui, 2013). Poleg tega je pri odstranjevanju cianobakterij pomembna pazljivost, saj lahko odstranjene cianobakterije lizirajo in tako sprostijo toksine nazaj v okolje (Merel in sod., 2013). Ključna problematika metod, ki razgrajujejo zunajcelične cianotoksine, je uporaba kemikalij in posledično nastajanje neznanih produktov razgradnje, neučinkovitost metod ter visoki stroški tretiranja (Martínez Huitle in Ferro, 2006; Merel in sod., 2013). V zadnjih letih je postala elektrokemijska oksidacija popularen proces tretiranja vode, saj je okolju prijazna metoda z učinkovito sposobnostjo razgradnje različnih onesnažil (Panizza in Cerisola, 2005).

2.4.2 Elektrokemijska razgradnja mikrocistina z z borom dopirano diamantno anodo (BDDA)

Elektrokemijska oksidacija je okolju prijazna metoda čiščenja vode, ki lahko razgradi različna biološka onesnaževala. Odvisna je od številnih dejavnikov - med drugim od izbire elektrode, ki vpliva na selektivnost in učinkovitost procesa. Kot anodo so testirali številne materiale. Željeni lastnosti sta kemijska stabilnost in visoka aktivnost. Nekatere elektrode so hitro izgubile aktivnost, druge so imele omejeno življenjsko dobo, oziroma so selektivno oksidirale ter omogočile nastajanje še vedno toksičnih spojin. Kot odličen material se je izkazala z borom dopirana diamantna anoda (BDDA), ki ima visoko anodno stabilnost in visok nad-potencial nastajanja hidroksilnih radikalov pred nastanjem molekularnega kisika (Panizza in Cerisola, 2005).

Elektrokemijske študije tankih diamantnih plasti so se začele v sredini 80-ih let (Panizza in Cerisola, 2005). Z namenom, da bi postal diamantni film prevoden, so ga dopirali z borovimi atomi: 10^{20} - 10^{21} B/cm³. Rezultat je upornost zmanjšana do 10^{-3} Ω, lastnost, ki jo imajo tudi polkovine (Pleskov, 1999; Pleskov, 2002). V notranji sferi na površini BDDA so reakcije nastajanja in cepljenja medatomskih vezi (nastajanje vodika in kisika) zelo ovirane. V zunanji sferi BDDA pa prihaja do zelo malih sprememb glede nastajanja in cepljenja novih kemijskih vezi, oziroma sploh ne prihaja (Alehashem in sod., 1995, Modestov in sod., 1997). Vodikovi ioni začnejo nastajati že pri – 1,25 V, kisikovi pa šele pri + 2,3 V. Visok nad-potencial (+3,55 V) omogoči generiranje intermediata razgradnje vode - hidroksilnih radikalov (OH^{\cdot}), ki oksidirajo organska onesnažila (Panizza in Cerisola, 2005).

Številne tehnološke prednosti BDDA razlikujejo od konvencionalnih metod (Panizza in Cerisola, 2005):

- visok nad-potencial v vodnih in nevodnih elektrolitih (Swain in sod., 1998; Martin in sod., 1996),
- odpornost materiala na korozijo tudi v zelo agresivnih medijih (Swain, 1994a in Ramesham in Rose, 1997),
- površina ni adsorptivna in je odporna proti deaktivaciji (Swain, 1994b).

Kemijska reakcija: $\text{BDDA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{BDD(OH}^{\cdot}\text{)} + \text{H}^+ + \text{e}^-$ prikazuje nastanek radikalov OH^{\cdot} , kateri reagirajo z organskimi onesnažili in jih mineralizirajo (Panizza in Cerisola, 2005).

Raziskave razgradnje mikrocistina z BDDA navajajo različne ugotovitve. S časom tretiranja se razgradnja mikrocistina povečuje (Zhang in sod., 2009; Tran in Dogui, 2013; in Liao in sod., 2014). Najhitrejša je v prvih 30 minutah delovanja, vendar do popolne razgradnje pride šele po dveh urah (Zhang in sod., 2009 in Tran in Dogui, 2013). Hitrost razgradnje narašča z gostoto toka (Zhang in sod., 2009 in Tran in Dogui, 2013). Potrebe po energiji lahko znižujemo z dodajanjem elektrolitov za večjo prevodnost (Tran in sod., 2009) ter sintezo oksidacijskih kemijskih zvrsti (Tran in Dogui, 2013). Med elektroliti so bili najboljši rezultati razgradnje mikrocistina-RR ob uporabi NaCl (Zhang in sod., 2009). Z večanjem koncentracije NaCl se je hitrost razgradnje povečevala. Več NaCl je pomenila več nastalega Cl_2 in HClO , ki sta močni oksidacijski kemijski zvrsti (Hongxing in sod., 2005). Pri pH vode nad 8 zaradi nastalega Cl nastanejo v vodi rakotvorni produkti (Zhang in sod., 2009). Morebitnim toksičnim produktom zaradi izbranega elektrolita se izognemo, če uporabimo Na_2SO_4 . Iz Na_2SO_4 nastane sicer 10-krat manj oksidantov, vendar le-ti zelo uspešno oksidirajo mikrocistin, saj je učinkovitost oksidacije odvisna tudi od afinitete med oksidantom in onesnažilom (Tran in Dogui, 2013).

Tran in Dogui (2013) sta raziskala uporabo BDDA za čiščenje okoljskih vod, ki vsebujejo raztopljeni organski snovi. Kot simulacijo raztopljeni organske snovi so v raztopino dodali huminsko kislino ter potrdili uporabo BDDA elektrode za oksidacijo MC-LR, kljub prisotnosti drugih organskih snovi v vodi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 EKSTRAKCIJA MIKROCISTINA IN PRIPRAVA VZORCA ZA HPLC

Vzorec cianobakterij vrste *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera smo razdelili v 50 mililitrske okrogle steklene bučke in vsebino zmrznili s tekočim dušikom. Vzorec smo nato liofilizirali (Christ, Nemčija). Mikrocistin smo iz cianobakterij izolirali po ustaljenem postopku (Sedmak in sod., 1998), sestavljenim iz več korakov. Za izolacijo smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – HPLC.

3.1.1 Priprava vzorca za analitsko HPLC

Posušenemu vzorcu (50 mg) cianobakterijske kulture smo dodali 2 ml 5 % ocetne kisline in mešali na magnetnem mešalu (Tehtnica, Slovenija) 30 min. Vzorec smo nato centrifugirali 10 minut pri 4000 obratih/min (Tehtnica, Slovenija). Supernatant smo odpipetirali in shranili, usedlino pa ponovno resuspendirali z 2 ml 5 % ocetne kisline. Postopek ekstrakcije z mešanjem in s centrifugiranjem smo ponovili 3-krat. Supernatante smo združili in zamrznili, da so se viskozne komponente in nečistoče pri naslednjem centrifugiraju boljše ločile. Naslednji dan smo jih odmrznili in centrifugirali ter tako očistili vzorec usedlin.

Kolono LiChrolut RP-18 (100 mg) (Merck, Nemčija) smo pred nanosom vzorca aktivirali z 1,5 ml čistega metanola (Merck, Nemčija) ter z 1,5 ml bidestilirane vode. Po aktivaciji smo nanesli 5,5 ml vzorca in spirali pigmente z 1 ml 10 % metanola. Mikrocistin smo sprali s kolone z 2-krat po 0,5 ml čistega metanola in shranili skupaj 1 ml vzorca. Le-tega smo nato posušili s prepohovanjem s čistim dušikom in shranili na -20 °C.

3.1.2 Priprava vzorca za preparativno HPLC

Priprava je bila podobna, kot je opisano v poglavju 3.1.1, le da so bile količine večje.

Liofiliziranemu vzorcu cianobakterij (1000 mg) smo dodali 20 ml 5 % ocetne kisline in mešali na magnetnem mešalu 30 min. Vzorec smo nato 10 minut centrifugirali pri 4000 obratih/min (Tehtnica, Slovenija), supernatant odpipetirali in shranili. Usedlino smo resuspendirali z 20 ml 5 % ocetne kisline, mešali 30 minut na magnetnem mešalu in ponovno centrifugirali. Supernatant iz prve in druge ponovitve smo združili in zamrznili (12 ur). Preostali usedlini smo dodali še zadnjič 20 ml 5 % ocetne kisline, mešali smo jo na magnetnem mešalu 30 minut, nato pa vse skupaj zmrznili na -20 °C. Zaradi zmrzovanja so celice popokale, ekstrakcija mikrocistina je bila večja. Naslednji dan smo odmrznili tretjo ponovitev ekstrakcije in jo centrifugirali. Pridobljen supernatant smo dodali odmrznjenim združenim supernatantom iz prve in druge ponovitve ekstrakcije ter vse še enkrat centrifugirali in tako odpravili motnost. Vzorec je bil pripravljen za nanos na aktivirano (500 mg) LiChrolut RP-18 (Merck, Nemčija) kolono.

Kolono smo aktivirali z 10 ml čistega metanola (LiChrosolv, Merck, Nemčija) ter z 10 ml bidestilirane vode. Nanesli smo vzorec in spirali pigmente z 10 ml 10 % metanola. Kolono smo dvakrat eluirali z 2 ml čistega metanola in eluata združili ter shranili na -20 °C.

3.2 ANALIZA VZORCA S HPLC

Posušen pripravljen vzorec za analitsko kolono smo raztopili v 100 µl metanola (LiChrosolv, Merck, Nemčija). Za ugotavljanje prisotnosti in koncentracije mikrocistina smo uporabili sistem HPLC z analitsko kolono LiCrospher 100 RP-18 (Merck, Nemčija), na katero smo nanašali vzorce (5 µl). Pretok je bil 1 ml/min; spirali smo z izokratsko elucijo z raztopino metanol (LiChrosolv, Merck, Nemčija) : fosfatni pufer (0,05 M, pH 3) v razmerju 58 : 42. Uporabili smo opremo HPLC / PDA (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti / fotodiodni detektor) (Waters, ZDA). Za zagon strojne opreme in procesiranje podatkov smo uporabili programsko opremo Millennium³². Glede na karakteristične absorbcijske spektre in zadrževalne čase smo določili prisotnost in koncentracijo mikrocistina (Sedmak in sod., 1998).

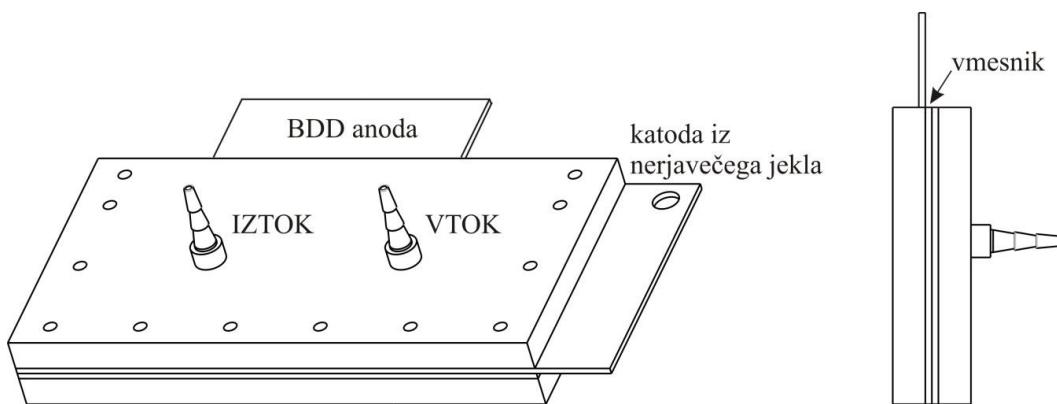
3.3 IZOLACIJA MIKROCISTINA

S preparativno HPLC kolono smo ločili eluat na štiri frakcije. Zbiranje frakcij je potekalo ročno: ločevali smo glede na značilne zadrževalne čase in absorbcijske spektre, pri čemer nam je za orientacijo služil kromatogram istega vzorca, ki je bil izведен na analitski HPLC. Frakcije smo zbrali pri zadrževalnih časih: 4,5 min, 5,8 min, 10,7 min in 24,8 min. Za ločevanje smo uporabili PhaseSep HPLC Column (Waters Spherisorb Columns, ZDA), na katero smo nanašali vzorec (1 ml), pretok je bil 10 ml/min. Spirali smo z načinom izokratske elucije z raztopino metanol (LiChrosolv, Merck, Nemčija) : fosfatni pufer (0,05 M, pH 3) v razmerju 50 : 50, saj smo s tem dosegli boljšo ločitev. Uporabili smo strojno opremo HPLC / PDA (Waters, ZDA). Za nadzor strojne opreme in procesiranje podatkov smo uporabili programsko opremo Millennium³².

Združeno četrto frakcijo (70 ml) smo posušili na rotavaporju do 1,5 ml in dodali 2 ml 5 % ocetne kisline. Tako pripravljen vzorec smo nanesli na predhodno aktivirane LiChrolut RP-18 kolone (do 100 mg) (Merck, Nemčija). Kolono smo sprali z 2 ml 5 % ocetne kisline, zaradi katere se je mikrocistin še bolj vezal na kolono, nato smo nadaljevali s spiranjem pigmentov z 1 ml 10 % metanola. Na koncu smo eluirali mikrocistin z 2 ml čistega metanola (LiChrosolv, Merck, Nemčija). Prisotnost in koncentracijo izoliranega čistega mikrocistina smo preverili z analitsko HPLC LiCrospher 100 RP-18 kolono (Merck, Nemčija) in nato eluat shranili v stekleni epruveti na -20 °C.

3.4 ELEKTROLITSKA CELICA Z Z BOROM DOPIRANO DIAMANTNO ANODO (BDDA)

Elektrolitsko celico sestavlja BDDA (Condias, Germany) in katoda iz nerjavečega jekla (Slika 3). Z vmesnim distančnikom smo dosegli razmik med elektrodama 1,96 mm in delavni volumen 1,5 ml. Aktivna površina posamezne elektrode je bila 8 cm^2 . BDDA smo priklopili na pozitivni izhod laboratorijskega napajalnika GPS – 4303 (Gwinstex, Kitajska), katodo iz nerjavečega jekla pa na negativni izhod. Delali smo pri konstantni gostoti toka 10 mA/cm^2 .



Slika 3: Shema elektrolitske celice.

3.4.1 Razgradnja raztopine mikrocistina z BDDA v mediju Jaworski

Pri izvedbi elektrokemične razgradnje mikrocistina smo uporabili elektrolitsko celico, opremljeno BDDA in katodo iz nerjavečega jekla. Izoliran mikrocistin smo redčili v Jaworskem mediju (Preglednica 4) do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$ ($\mu\text{g/ml}$). Poskus smo izvedli tako, da smo imeli negativno kontrolo (K_0), kontrola (K) in vzorca (V_S in V_K), ki smo ju tretirali 50 minut na način: šaržnega pretočnega učinkovanja in kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem.

Pomen oznak:

- Negativna kontrola (K_0): izoliran mikrocistin smo redčili v Jaworskem mediju do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$, vendar ga nismo vodili skozi elektrolitsko celico.
- Kontrola (K): izoliran mikrocistin smo redčili v Jaworskem mediju do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$ ter ga enkrat vodili skozi neaktivno elektrolitsko celico. S tem smo določili, koliko mikrocistina se izgubi zaradi samega pretoka (vezanje na stene elektrolitske celice) in ne zaradi elektrokemične razgradnje.

- Vzorec (V_S): izoliran mikrocistin smo razredčili v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 µM in ga vodili skozi aktivno elektrolitsko celico na način šaržno pretočnega učinkovanja.
- Vzorec (V_K): izoliran mikrocistin smo razredčili v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 µM in ga vodili skozi aktivno elektrolitsko celico na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem.

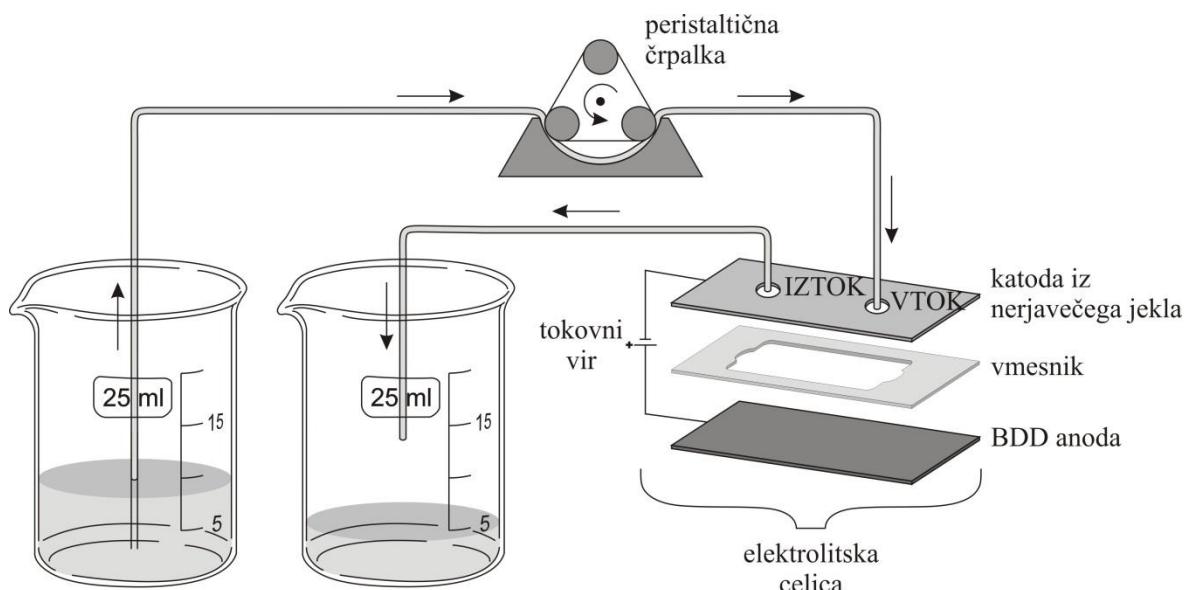
Po protokolu smo pripravili Jaworski medij, ki smo ga uporabili za redčitev mikrocistina (Preglednica 4).

Preglednica 4: Jaworski medij za gojenje fitoplanktonskih organizmov (Thompson, 1988).

Sestavine	g/100 ml	ml/l
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	3,6	1
NaNO ₃	8,0	1
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	2,0	1
KH ₂ PO ₄	1,24	1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,5	2
NaHCO ₃	1,59	1
EDTA Fe Na	0,225	1
EDTA Na	0,225	
H ₃ BO ₃	0,248	
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,139	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,1	
B12 (vitamin kobalamin)	0,004	
B1 (vitamin tiamin)	0,004	1
Biotin	0,004	

3.4.1.1 Šaržno pretočno učinkovanje

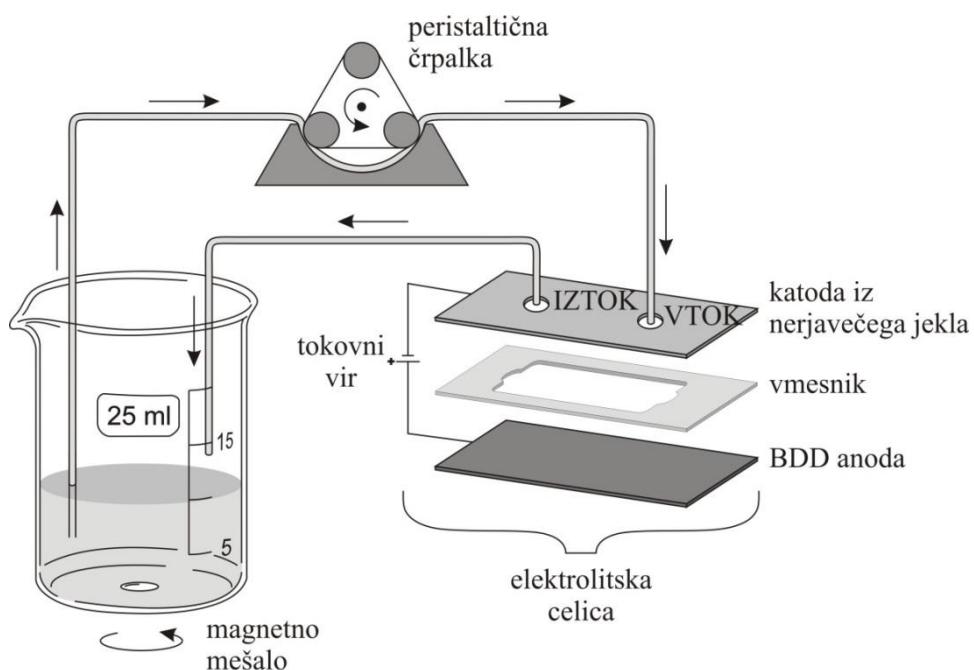
Metodo smo izvedli pri sobni temperaturi. Skozi delujočo elektrolitsko celico smo prečrpavali 10 ml vzorca, v katerem je bil redčen mikrocistin v Jaworskem mediju s končno koncentracijo $10 \mu\text{M}$. Za izvedbo smo uporabili dve posodi, peristaltično črpalko in elektrolitsko celico. V prvi posodi, ki se je nahajala pred peristaltično črpalko, je bilo 10 ml vzorca. S peristaltično črpalko smo uravnavali pretok skozi elektrolitsko celico na 10 ml/min, kar pomeni, da smo vsako minuto zamenjali prvo in drugo posodo ter tako zagotovili kontinuiran pretok. S spremembo napetosti elektrolitske celice smo ohranjali tok 80 mA. Pri teh pogojih je potekala elektrokemična razgradnja mikrocistina 50 minut. Vsakih deset minut smo vzeli 200 μl vzorca (V\$) ter ga shranili na -20°C (Slika 4).



Slika 4: Shema šaržnega pretočnega učinkovanja.

3.4.1.2 Kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem

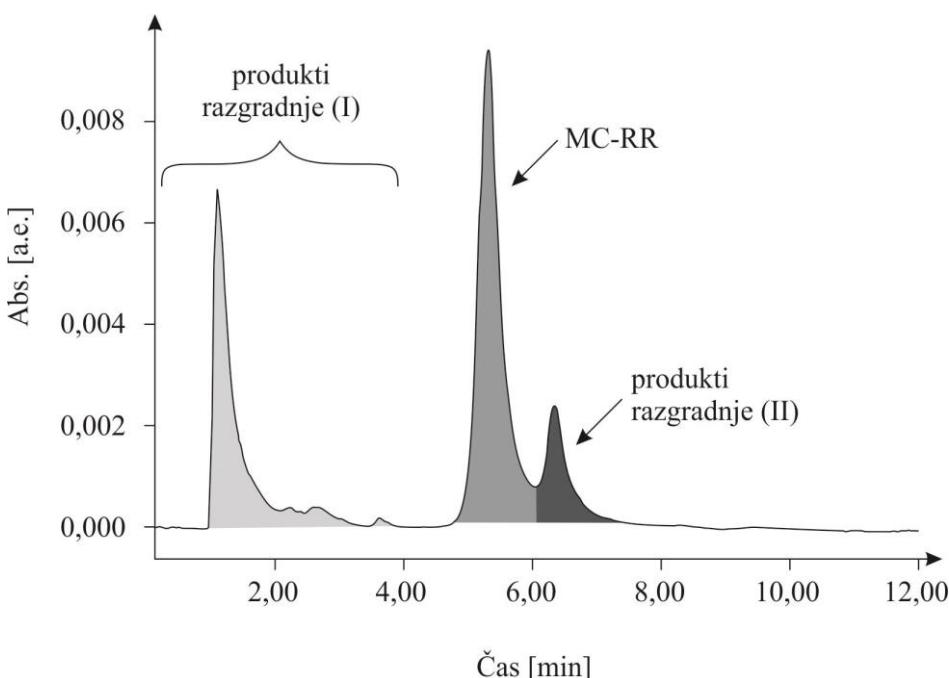
Pri izvedbi smo uporabili posodo, peristaltično črpalko in elektrolitsko celico. Celoten vzorec, 10 ml redčenega mikrocistina v Jaworskem mediju s končno koncentracijo $10 \mu\text{M}$, je bil ves čas v isti posodi, saj je bil iz njega voden tako vtok v elektrolitsko celico kot izztok iz nje. Vzorec smo mešali z magnetnim mešalom (Tehnica, Slovenija) s hitrostjo 300 obratov/min. Pretok skozi elektrolitsko celico je bil 10 ml/min. Izvedba je potekala pri sobni temperaturi. S spremenjanjem napetosti smo ohranjali tok 80 mA. Tako je potekala elektrokemična razgradnja mikrocistina 50 minut. Vzorčili smo vsakih deset minut po 200 μl vzorca (V_K) in ga shranili na -20°C (Slika 5).



Slika 5: Shema kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem.

3.5 ANALIZA VZORCEV PO UČINKOVANJU Z BDDA

Po končani elektrokemijski razgradnji mikrocistina na način šaržno pretočnega učinkovanja in kontinuirnega pretočnega učinkovanja z mešanjem smo preverili produkte razgradnje z analitsko HPLC. Uporabili smo LiCrospher 100 RP-18 kolono (Merck), v katero smo injicirali K_0 in K ter V_K in $V_{\$}$, vzorčene v 10 minutnih časovnih intervalih. Vzorce smo analizirali, kot je opisano pod točko 3.2. Na Sliki 6 je prikazan primer določitve površine vrhov na HPLC elucijskem diagramu. Določili smo seštevek površine vrhov v prvih 4-ih minutah elucijskega diagrama – produkti razgradnje (I), površino vrha mikrocistina in površino vrha produktov razgradnje (II).



Slika 6: Določitev površine vrhov na elucijskem diagramu. a. e. – arbitrarne enote.

3.5.1 Ugotavljanje inhibitornega delovanja mikrocistina in produktov elektrokemične razgradnje

Ugotavljali smo inhibitorno aktivnost produktov razgradnje mikrocistina z BDDA po metodi kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem in primerjali z inhibitorno aktivnostjo izoliranega čistega mikrocistina. Pri izvedbi encimskega testa smo sledili protokolu (Bubik, 2012).

Uporabili smo sintetični kromogen substrat p-nitrofenilfosfat (p-NPP) (Sigma, N7653), komercialno dostopen encim PP1 (zajčja rekombinantna izoblika PP-1 katalitične podenote), (Sigma, P7937), pufer 1 (50 mM Tris-HCl, 1 g/l BSA, 1 mM MnCl₂, 2 mM

DTT, pH 7,4), v katerem smo redčili encim in pufer 2 (50 mM Tris-HCl, 0,5 g/l BSA, 0,2 mM MnCl₂, 20 mM MgCl₂, pH 8,1), v katerem smo redčili inhibitor.

PP1 deluje tako, da defosforilira brezbarvni substrat p-NPP v rumen produkt p-NP. Le-tega zaznamo z merjenjem absorbance pri 405 nm. V prisotnosti mikrocistina je defosforilacija inhibirana, kar pomeni upočasnitev produkcije p-NP in zmanjšanje hitrosti encimske reakcije (k) (Sassolas in sod., 2011).

Test smo izvajali v mikrotiterskih ploščah s 96 luknjicami. Inhibitor - mikrocistin in produkte razgradnje (PR) v vzorcih (V_S po 1 minuti in V_K po 10-ih, 30-ih in 50-ih minutah) smo redčili do različnih končnih koncentracij. Izoliran mikrocistin, kot pozitivno kontrolo (PK) inhibicije, smo testirali v koncentacijskem območju 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM in 20 nM. Vzorce (V_S, V_K) v koncentacijskem območju 1 nM, 10 nM, 20 nM in 50 nM. PP-1 smo redčili do končne koncentracije 1 U/luknjico (U je enota encima, ki katalizira pretvorbo 1 μM substrata/min).

V test smo vključili tudi naslednje kontrole: K_N (vzorec brez inhibitorja, negativna kontrola inhibicije), K_N+JM (negativna kontrola inhibicije z Jaworski medijem), K-E (kontrola brez encima) in K-S (kontrola brez substrata). Dodatek Jaworski medija je redčen v pufru 2 tako, da ga je 6,3 μl v končnem volumenu 200 μl.

Najprej smo zmešali pufer 1, inhibitor redčen v pufru 2 in encim redčen v pufru 1, to inkubirali na sobni temperaturi 5 minut, nato dodali substrat (10 μl v končni volumen 200 μl). Meritev aktivnosti encima je potekala 1 uro pri 37° C s spektrofotometrom (Synergy™ Mx) pri valovni dolžini 405 nm. Vse meritve smo izvedli v triplikatih.

Iz dobljenih časovnih potekov absorbanc smo izračunali naklone krivulj (aktivnost encima linearno narašča) ter izračunali razmerje v_i/v_0 , kjer je v_i K_V (naklon vzorca), v_0 pa K_N (naklon negativne kontrole). Kot negativno kontrolo smo uporabili encim s substratom brez inhibitorja. Razmerje, ki opisuje hitrost encimske reakcije, je podano z enačbo:

$$v_i/v_0 = K_V/K_N \quad \dots(1)$$

V programu GraphPad Prism (GraphPad Software, ZDA) smo za odvisnost v_i/v_0 od koncentracije MC-RR uporabili nelinearno regresijo, opisano z enačbo:

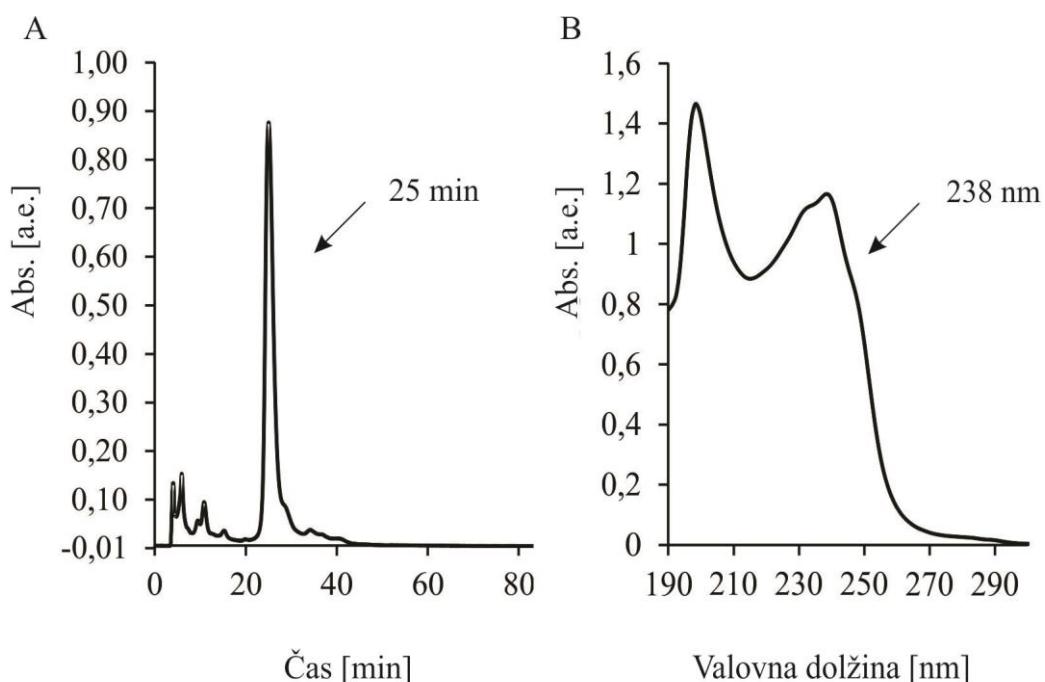
$$Y = Y_{(\text{najmanjša vrednost})} + (Y_{(\text{največja vrednost})} - Y_{(\text{najmanjša vrednost})}) / (1 + 10^{((X - \text{LogIC}_{50}))}) \quad \dots(2)$$

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA MIKROCISTINA

4.1.1 Ekstrakcija mikrocistina

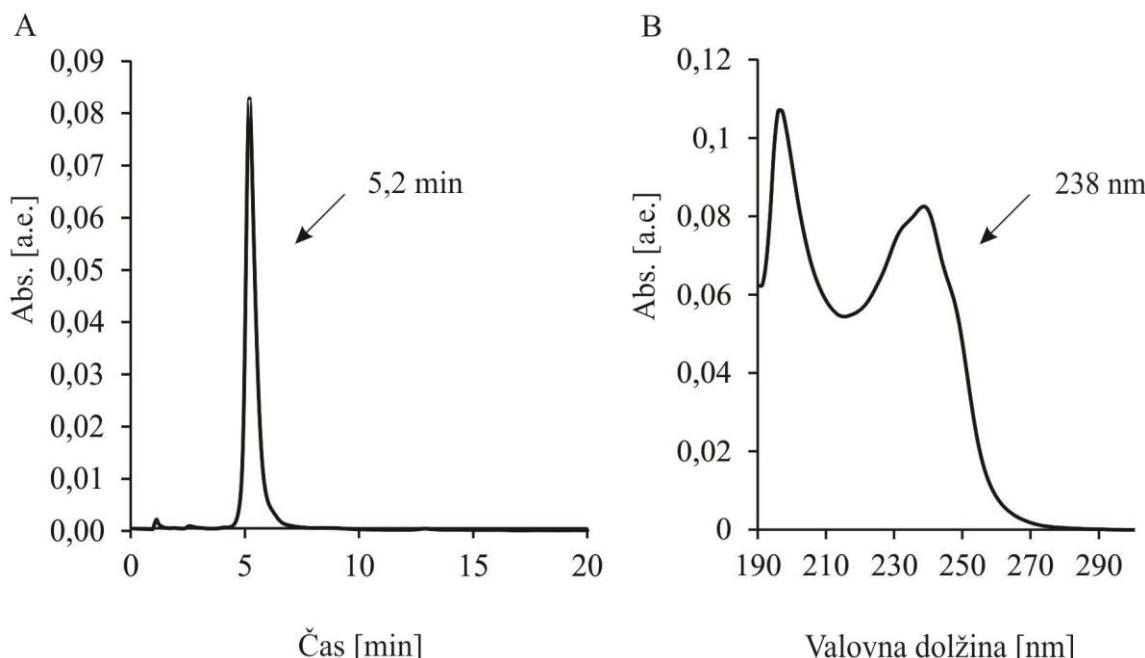
Iz 1 g liofiliziranega vzorca cianobakterij vrste *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera smo po ustaljeni metodi (Sedmak in sod., 2008) ekstrahirali mikrocistin ([D-Asp³] MC-RR označen kot MC-RR). Na HPLC elucijskem diagramu smo zaznali številne manjše vrhove, ki nakazujejo na prisotnost ostalih sestavin ekstrakta. Prvi trije vrhovi so bili anabenopeptidi, četrти vrh je bil mikrocistin. Prisotnost in koncentracijo slednjega smo določili na preparativni koloni. Na HPLC elucijskem diagramu pri 238 nm valovne dolžine (Slika 7A) smo namreč zaznali vrh s specifičnim retenzijskim časom 25 minut in karakterističnim UV spektrom (Slika 7B). Določili smo prisotnost mikrocistina v koncentraciji 2152 µM (µg/ml), preračunano na ekvivalent mikrocistina-LR. Učinkovitost ekstrakcije je bila 8,6 mg mikrocistina/1g liofilizirane cianobakterijske kulture.



Slika 7: Elucijski diagram ekstrakta cianobakterij vrste *Planktothrix rubescens* iz Blejskega jezera. Elucija na preparativni koloni PhaseSep HPLC Column, mobilna faza metanol : 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) = 50 : 50 (v/v), pretok 10 ml/min. A) MC-RR z retenzijskim časom 25 min je izrazito viden pri karakteristični valovni dolžini $\lambda = 238$ nm. B) Spekter MC-RR pri $\lambda = 190\text{--}300$ nm s karakterističnim vrhom pri 238 nm. a. e. – arbitrarne enote.

4.1.2 Izolacija čistega mikrocistina MC-RR

Iz ekstrakta cianobakterij smo izolirali čist mikrocistin MC-RR. Na analitski koloni HPLC je imel specifični retenzijski čas 5,2 minute (Slika 8A) in specifični spekter (Slika 8B). Koncentracija izolata je bila v povprečju 467 μM , kar pomeni 21,7 % učinkovitost izolacije. Končni izplen izolacije je bil 0,9 mg MC-RR/1g liofilizirane cianobakterijske kulture.



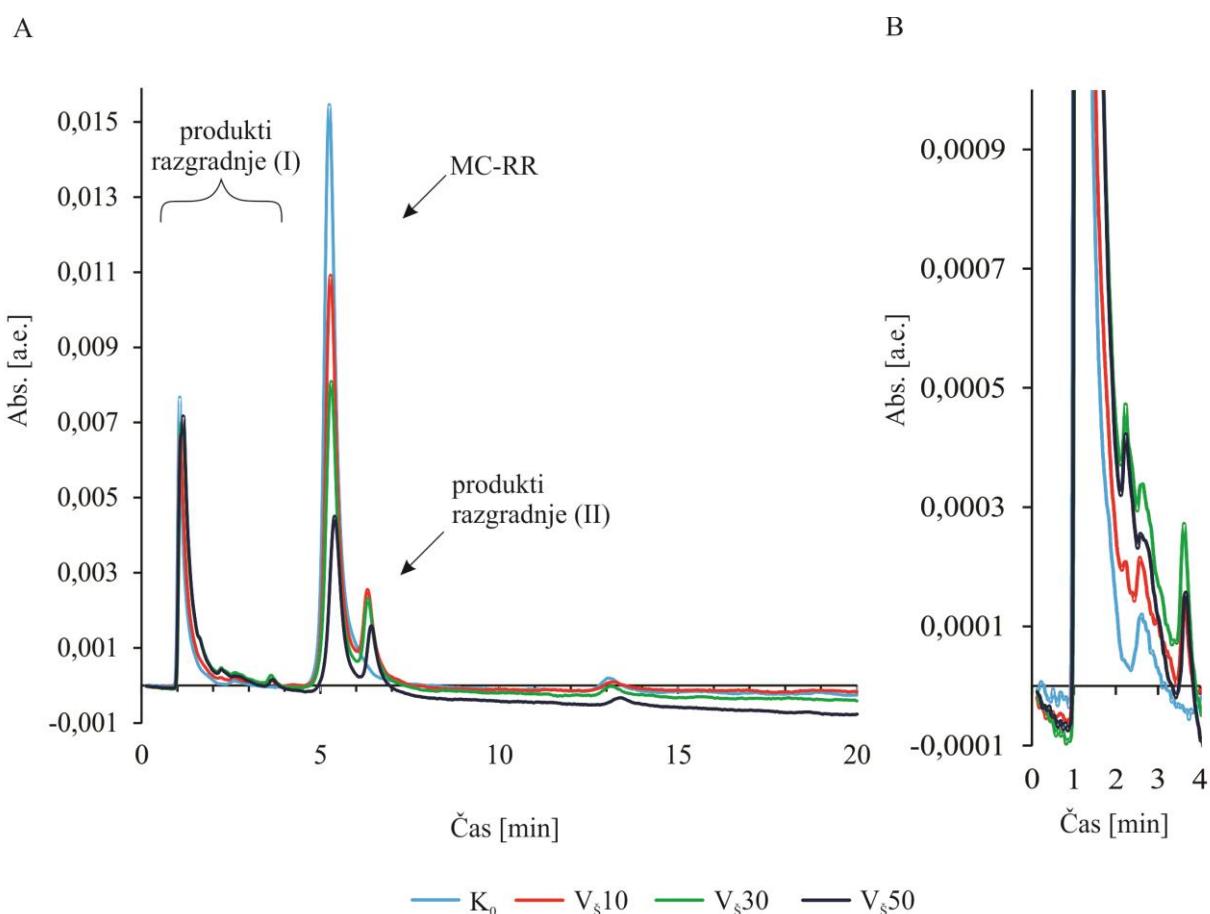
Slika 8: Elucijski diagram izoliranega MC-RR. Elucija na analitski koloni LiChrospher® RP-18, mobilna faza metanol : 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) = 52 : 48 (v/v), pretok 1 ml/min. A) MC-RR z retenzijskim časom 5,2 min je izrazito viden pri $\lambda = 238 \text{ nm}$. B) Spekter izoliranega MC-RR pri $\lambda = 190\text{-}300 \text{ nm}$ s karakterističnim vrhom 238 nm. a. e. – arbitrarne enote.

4.2 ELEKTROKEMIČNA RAZGRADNJA MIKROCISTINA Z BDDA

Izoliran mikrocistin smo redčili v Jaworskem mediju do končne koncentracije 10 μM . K_0 predstavlja v Jaworskem mediju redčen netretirani MC-RR, K predstavlja vzorec, ki je prešel neaktivno BDDA celico. Z V_s in V_K so označeni vzorci in način učinkovanja, številka za tem pomeni čas tretiranja. Vsakih 10 minut smo vzeli vzorec in ga preverili na HPLC analitski koloni.

4.2.1 Šaržno pretočno učinkovanje

Rezultati razgradnje mikrocistina z BDDA na način šaržnega pretočnega učinkovanja so prikazani na Sliki 9. K_0 je redčen MC-RR do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$ v Jaworskem mediju. Vzorci po 10-ih, 30-ih in 50-ih minutah tertiranja so označeni z $V_{\$10}$, $V_{\$30}$ in $V_{\$50}$ (Slika 9). S časom izpostavitve BDDA se vrh MC-RR znižuje. Po 10-ih minutah učinkovanja se pojavi nov vrh pri 6,32 minutah (produkti razgradnje (II)). Z nadaljnjjim učinkovanjem poteka razgradnja MC-RR in novo nastalih produktov z vrhovi med 6,32 in 6,56 minuto (produkti razgradnje (II)) (Slika 9A). Sklop vrhov v prvih 4-ih minutah elucijskega diagrama (produkti razgradnje (I)) se povečuje (Slika 9A in 9B).



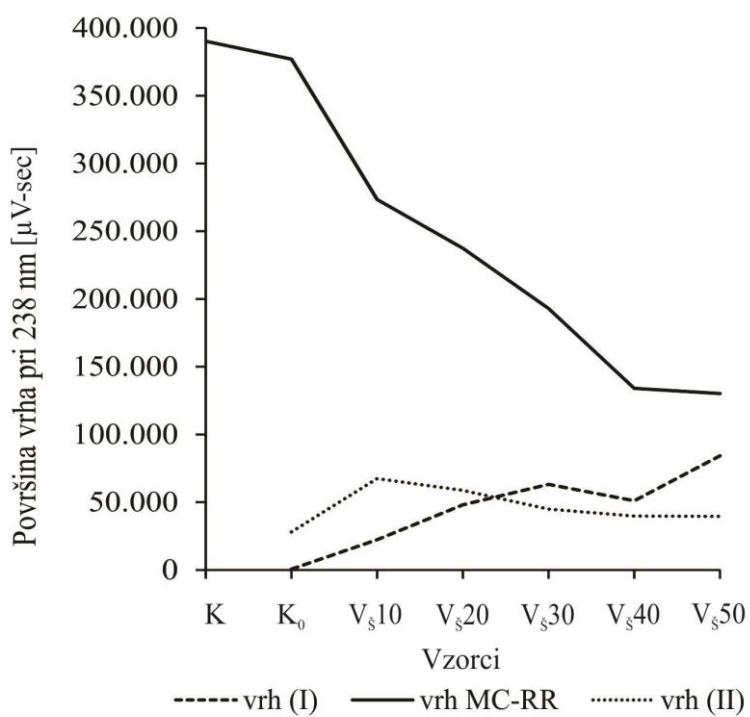
Slika 9: Elucijski diagram MC-RR redčenega do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$ v Jaworskem mediju in vzorcev po različnih časih učinkovanja z BDDA na šaržno pretočni način. Analitska kolona LiChroshper® RP-18, mobilna faza v razmerju metanol : 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) 52 : 48 (v/v), pretok 1 ml/min pri valovni dolžini 238 nm. A) Spreminjanje koncentracije MC-RR in produktov razgradnje (I) in (II) glede na čas učinkovanja na šaržno pretočni način. B) Povečan izsek prvih štirih minut elucijskega diagrama pri valovni dolžini 238 nm. S časom tretiranja se povečuje koncentracija produktov razgradnje (I). K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja (svetlo modra), $V_{\$}$ – vzorec tretiran na šaržno pretočni način, številka pomeni čas učinkovanja v minutah. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min. a. e. – arbitrarne enote.

Retenzijski časi in površine vrhov vseh eksperimentalnih rezultatov tretiranja MC-RR s šaržnim pretočnim učinkovanjem so predstavljeni v Preglednici 5. Prikazani so: produkti razgradnje (I) – združen sklop vrhov v prvih štirih minutah elucijskega diagrama, MC-RR in produkti razgradnje (II). Retenzijski čas se pri vseh vrhovih podaljšuje. Pri površini vrhov sta od produktov razgradnje odšteta vrha, ki se pojavita že pri K_0 . Na ta način smo odsteli vse, kar ni produkt razgradnje zaradi učinkovanja BDDA. Koncentracija MC-RR se je zaradi razgrajevanja zmanjšala za 67 %. Produkte razgradnje smo zaznali kot novo nastale vrhove (II) in povečanje sklopa vrhov (I).

Preglednica 5: Retenzijski časi in površine vrhov vzorcev pred in po tretiranju MC-RR z BDDA na šaržno pretočni način. K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja, K-kontrola z neaktivno BDDA, V_S – vzorec tretiran na šaržno pretočni način, številka pomeni čas učinkovanja v minutah.

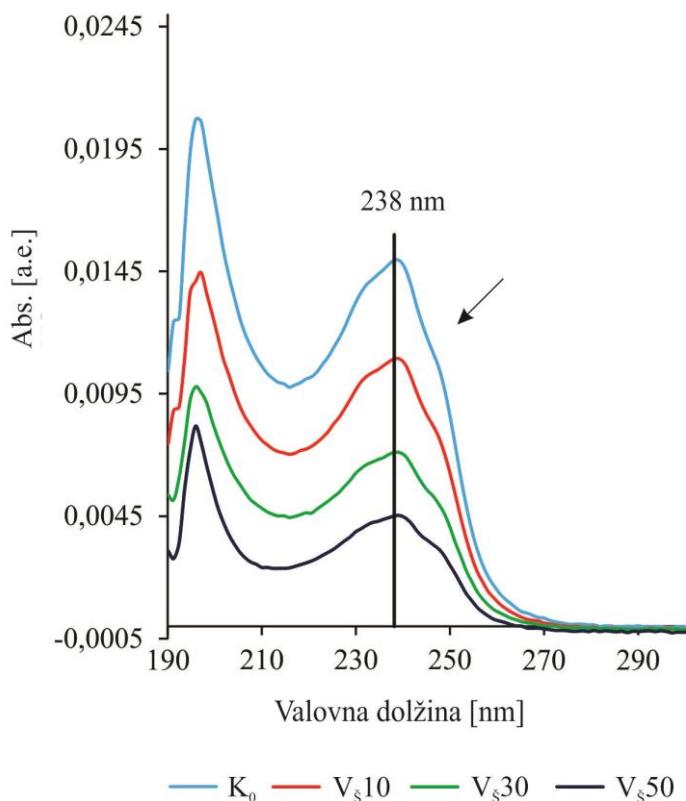
REtenzijski čas (min.)				POVRŠINA POSAMEZNIH VRHOV pri 238 nm (μ V·sec) – odšteto K_0		
HPLC VRH	(I) (Pojavljanje prvega vrha v sklopu vrhov v prvih 4-ih min)	MC-RR	(II)	(I) (Seštevek sklopa vrhov v prvih 4-ih min)	MC-RR	(II)
K_0	1,07	5,25			390,218	
K	1,12	5,30	6,32	654	377,158	28,195
V_S10	1,09	5,28	6,32	22,398	273,543	67,415
V_S20	1,10	5,31	6,34	48,077	237,384	58,737
V_S30	1,12	5,30	6,33	63,233	192,936	44,979
V_S40	1,12	5,30	6,33	51,079	133,994	39,790
V_S50	1,19	5,54	6,56	84,217	130,161	39,595

Rezultati spremenjanja površin vrhov prikazani v Preglednici 5 so grafično predstavljeni na Sliki 10. S časom tretiranja se površina vrha (I) povečuje, površina vrha MC-RR znižuje in površina vrha (II) najprej povečuje, po 10-ih min tretiranja pa se znižuje.



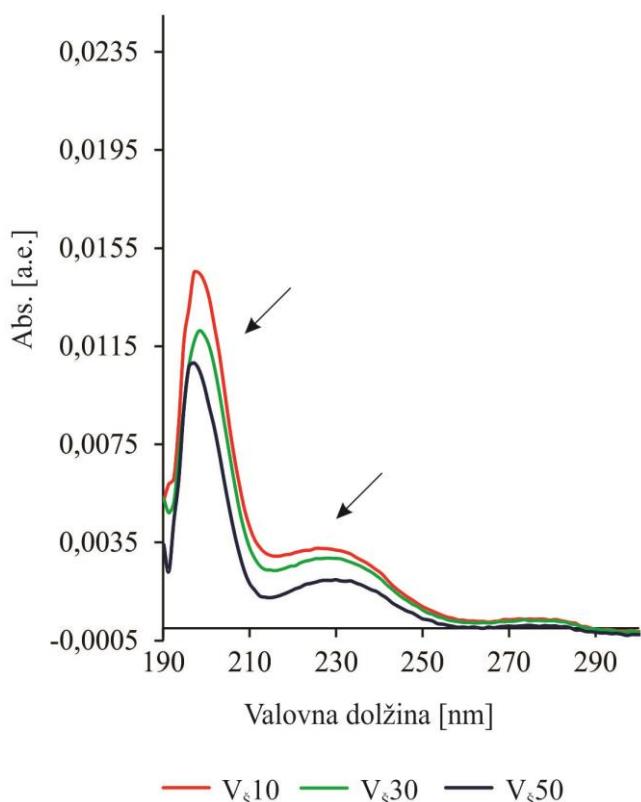
Slika 10: Zmanjševanje površine vrhov zaradi učinkovanja BDDA na šaržno pretočni način. K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja, K – kontrola z neaktivno BDDA, V_s – vzorec tretiran na šaržno pretočni način, številka pomeni čas učinkovanja v minutah.

Slika 11 prikazuje spremenjanje UV spektra ($\lambda=190\text{-}300\text{ nm}$) vrha MC-RR po učinkovanju z BDDA na šaržno pretočni način. Vrh MC-RR ima na HPLC elucijskem diagramu retenzijski čas od 5,2 do 5,5 min.



Slika 11: Spreminjanje spektra mikrocistina MC-RR po učinkovanju z BDDA na šaržno pretočni način. Puščica označuje spremenjanje UV spektra ($\lambda = 190\text{-}300\text{ nm}$) vrha MC-RR z retenzijskim časom 5,2–5,5 minute na HPLC elucijskem diagramu (Analitska kolona LiChroshper® RP-18, mobilna faza metanol : 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) = 52 : 48 (v/v) in pretok 1 ml/min.). K₀ – kontrola brez BDDA učinkovanja (svetlo modra), V_s – vzorec tretiran na šaržno pretočni način, številka pomeni čas učinkovanja v minutah. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min. a. e. – arbitrarne enote.

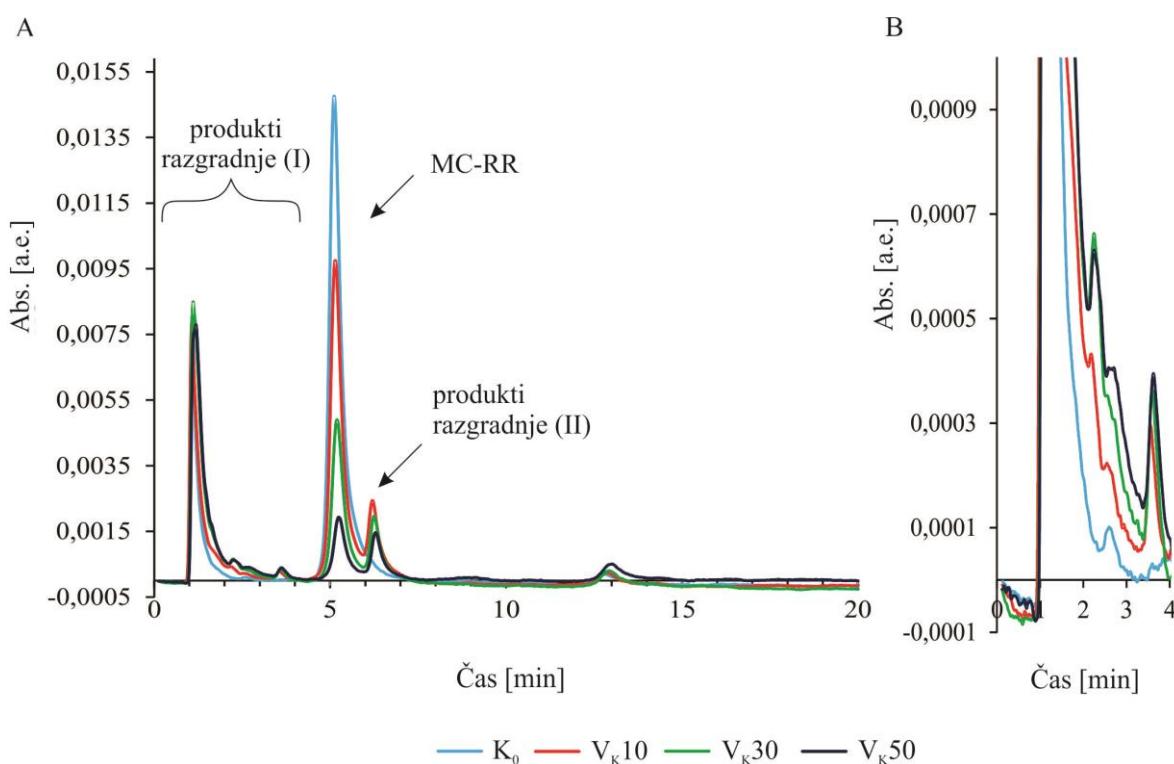
Slika 12 prikazuje spreminjanje UV spektra ($\lambda = 190\text{-}300\text{ nm}$) vrha produkti razgradnje (II) po učinkovanju z BDDA na šaržno pretočni način. Vrh produkti razgradnje (II) ima na HPLC elucijskem diagramu retenzijski čas od 6,3 do 6,6 min.



Slika 12: Spektri produktov razgradnje (II) po učinkovanju z BDDA na šaržno pretočni način. Puščica označuje spreminjanje UV spektra ($\lambda = 190\text{-}300\text{ nm}$) vrha produkti razgradnje (II) z retenzijskim časom 6,3-6,6 minute na HPLC elucijskem diagramu (Analitska kolona LiChroshper® RP-18, mobilna faza metanol : 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) = 52 : 48 (v/v) in pretok 1 ml/min.). V_s – vzorec tretiran na šaržno pretočni način, številka pomeni čas učinkovanja v minutah. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min. a. e. – arbitrarne enote.

4.2.2 Kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem

Rezultati razgradnje mikrocistina z BDDA na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem. K_0 je redčen MC-RR do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$ v Jaworskem mediju. Vzorci po 10-ih, 30-ih in 50-ih minutah tertiranja so V_{K10} , V_{K30} , V_{K50} (Slika 13). S tretiranjem se vrh MC-RR znižuje. Po 10-ih minutah učinkovanja z BDDA se pojavi novi vrh pri 6,2 minutah (produkti razgradnje (II)). Z nadaljnjjim učinkovanjem poteka razgradnja MC-RR in novo nastalih produktov z vrhovi med 6,2 in 6,3 minuto (produkti razgradnje (II)) (Slika 13A). Sklop vrhov v prvih 4-ih minutah elucijskega diagrama (produkti razgradnje (I)) (Slika 13A in 13B) se povečuje.



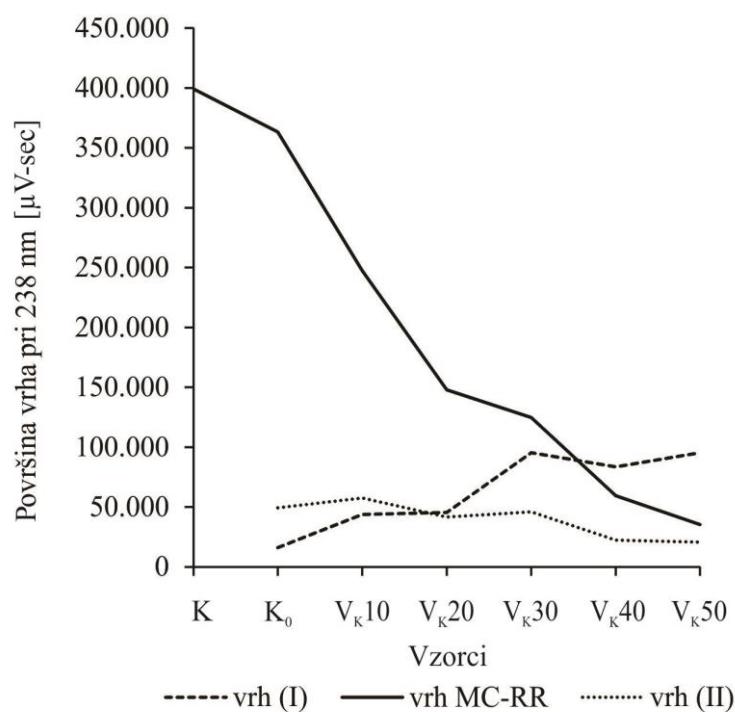
Slika 13: Elucijski diagram MC-RR redčenega do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$ v Jaworskem mediju in vzorcev po različnih časih učinkovanja z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem. Analitska kolona LiChroshper® RP-18, mobilna faza metanol : $0,05 \text{ M}$ fosfatni pufer ($\text{pH } 3$) = $52 : 48$ (v/v), pretok 1 ml/min pri $\lambda = 238 \text{ nm}$. A) Spreminjanja koncentracije produktov razgradnje (I), MC-RR in produktov razgradnje (II) glede na čas tretiranja z BDDA na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem. B) Povečan izsek prvih štirih minut elucijskega diagrama pri valovni dolžini 238 nm . S časom tretiranja se povečuje koncentracija produktov razgradnje (I). K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja (svetlo modra), V_K – vzorec tretiran na kontinuiran pretočni način z mešanjem, številka za tem pomeni čas učinkovanja v minutah. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min. a. e. – arbitrarne enote.

Preglednica 6 prikazuje retenzijske čase in površine vrhov vseh eksperimentalnih rezultatov BDDA tretiranja MC-RR na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem. Prikazani so: združen sklop vrhov v prvih štirih minutah HPLC elucijskega diagrama – produkti razgradnje (I), MC-RR in produkti razgradnje (II). Retenzijski čas se pri vseh vrhovih podaljšuje. Pri površini vrhov sta od produktov razgradnje odšteta vrha, ki se pojavita že pri vzorcu K_0 , saj smo na ta način odšteli vse, kar ni produkt razgradnje zaradi BDDA učinkovanja. Koncentracija MC-RR se je zaradi razgrajevanja znižala za 91 %. Produkte razgradnje smo zaznali kot novo nastale vrhove (II) in povečanje sklopa vrhov (I).

Preglednica 6: Retenzijski časi in površine vrhov vzorcev pred in po tretiranju MC-RR z BDDA na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem. K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja, K – kontrola z neaktivno BDDA, V_K – vzorec tretiran na kontinuirano pretočni način z mešanjem, številka za tem pomeni čas učinkovanja v minutah.

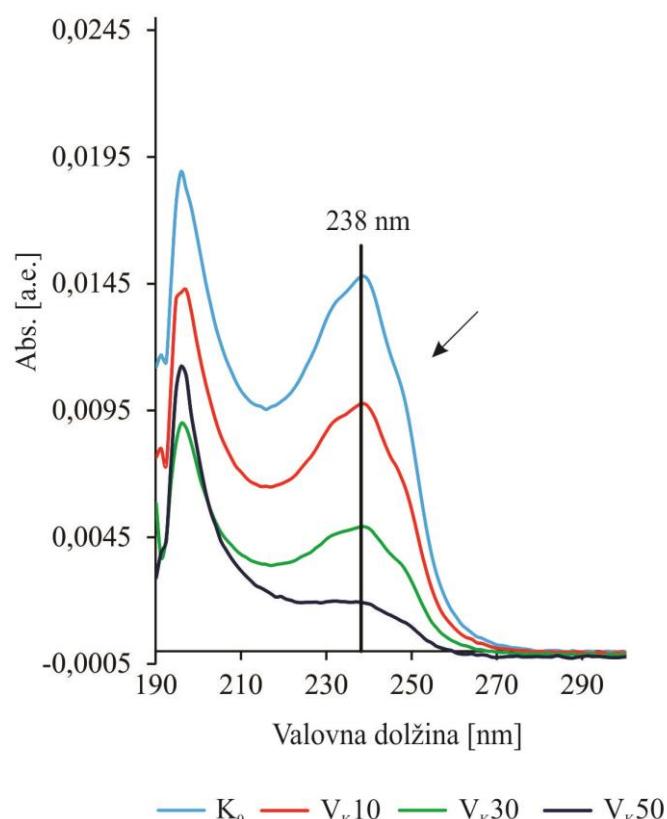
RETENZIJSKI ČAS (min.)				POVRŠINA POSAMEZNIH VRHOV pri 238 nm(μ V·sec) – odšteto od K_0		
HPLC VRH	(I) (Pojavljanje prvega vrha v sklopu vrhov v prvih 4-ih min)	MC-RR	(II)	(I) (Seštevek sklopa vrhov v prvih 4-ih min)	MC-RR	(II)
K_0	1,08	5,11			399,110	
K	1,09	5,16	6,20	16,144	363,303	49,282
V_K10	1,07	5,15	6,20	43,841	247,359	57,610
V_K20	1,08	5,13	6,19	45,485	147,963	41,576
V_K30	1,11	5,20	6,25	95,451	124,734	45,875
V_K40	1,13	5,21	6,27	83,489	59,427	22,287
V_K50	1,18	5,25	6,29	95,254	35,470	20,730

Rezultati spremenjanja površin vrhov, prikazani v Preglednici 6, so grafično predstavljeni na Sliki 14. S časom tretiranja se površina vrha (I) povečuje, površina vrha MC-RR znižuje in površina vrha (II) najprej povečuje, po 10-ih min tretiranja pa znižuje.



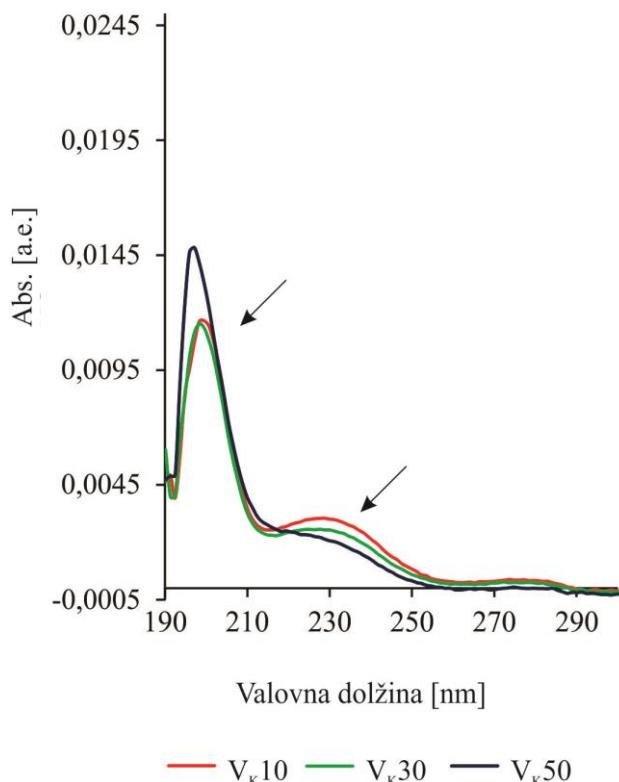
Slika 14: Zmanjševanje površine vrhov zaradi učinkovanja BDDA na kontrinuirano pretočni način z mešanjem. K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja, K – kontrola z neaktivno BDDA, V_k – vzorec tretiran na kontinuiran pretočni način z mešanjem, številka za tem pomeni čas učinkovanja v minutah.

Slika 15 prikazuje spremenjanje UV spektra ($\lambda = 190\text{-}300\text{ nm}$) vrha MC-RR po učinkovanju z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem. Vrh MC-RR ima na HPLC elucijskem diagramu retenzijski čas med 5,1 in 5,2 minute.



Slika 15: Spektri MC-RR po učinkovanju z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem. Puščica označuje spremenjanje UV spektra vrha MC-RR z retenzijskim časom med 5,1 in 5,2 minute na HPLC elucijskem diagramu (Analitska kolona LiChroshper® RP-18, mobilna faza metanol : 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) = 52 : 48 (v/v) in pretok 1 ml/min.). K₀ – kontrola brez BDDA učinkovanja (svetlo modra), V_K – vzorec tretiran na kontinuiran pretočni način z mešanjem, številka za tem pomeni čas učinkovanja v minutah. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min. a. e. – arbitrarne enote.

Slika 16 prikazuje spreminjanje UV spektra ($\lambda = 190\text{-}300 \text{ nm}$) vrha produktov razgradnje (II) po učinkovanju z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem. Vrh produktov razgradnje (II) ima na HPLC elucijskem diagramu retenzijski čas med 6,2 in 6,3 min.

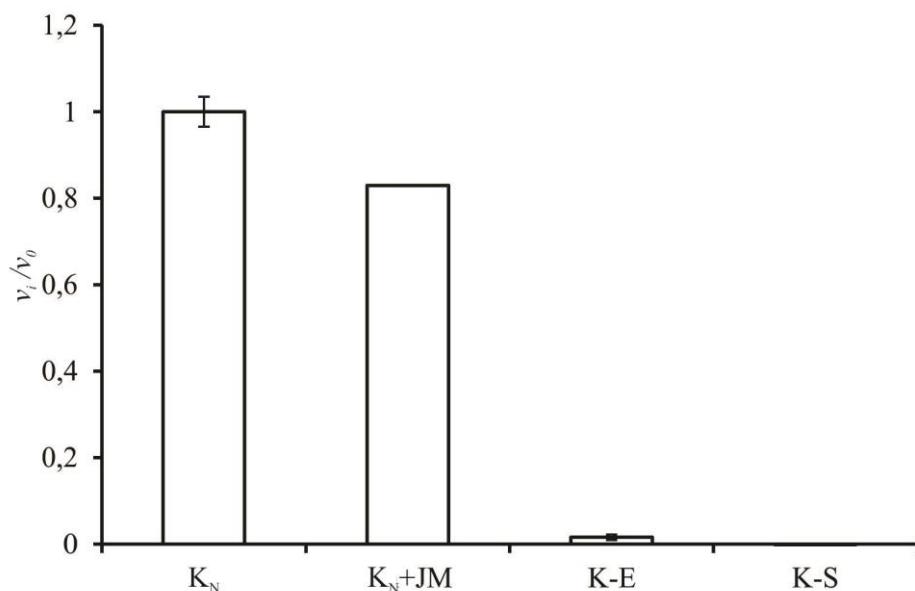


Slika 16: Spektri produktov razgradnje (II) po učinkovanju z BDDA na kontinuiran pretočni način z mešanjem. Puščica označuje spreminjanje UV spektra vrha produktov razgradnje (II) z retenzijskim časom 6,2-6,3 min. na HPLC elucijskem diagramu (Analitska kolona LiChroshper® RP-18, mobilna faza metanol: 0,05 M fosfatni pufer (pH 3) = 52 : 48 (v/v) in pretok 1 ml/min.). V_K – vzorec tretitan na kontinuiran pretočni način z mešanjem, številka za tem pomeni čas učinkovanja v minutah. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min. a. e. – arbitrarne enote.

4.3 INHIBICIJA PP1 Z MIKROCISTINOM IN PRODUKTI RAZGRADNJE MIKROCISTINA

Uspešnost razgradnje in zniževanje biološke aktivnosti MC-RR z BDDA učinkovanjem na kontinuirano pretočni način z mešanjem smo preverili s testom inhibicije proteinske fosfataze 1 (PP1). Pri encimskem testu smo spremljali absorbcojo pri valovni dolžini 405 nm in preko nje izračunali naklon krivulj (k), ki prikazuje hitrost encimske aktivnost v odvisnosti od časa. Kot negativno kontrolo inhibicije (K_N) smo testirali PP1 brez MC-RR. Iz naklona krivulj smo nato izračunali hitrost encimske reakcije podano kot v_i/v_0 , kjer v_i pomeni (k) v prisotnosti MC-RR, v_0 pa (k) v odsotnosti MC-RR (Enačba 1).

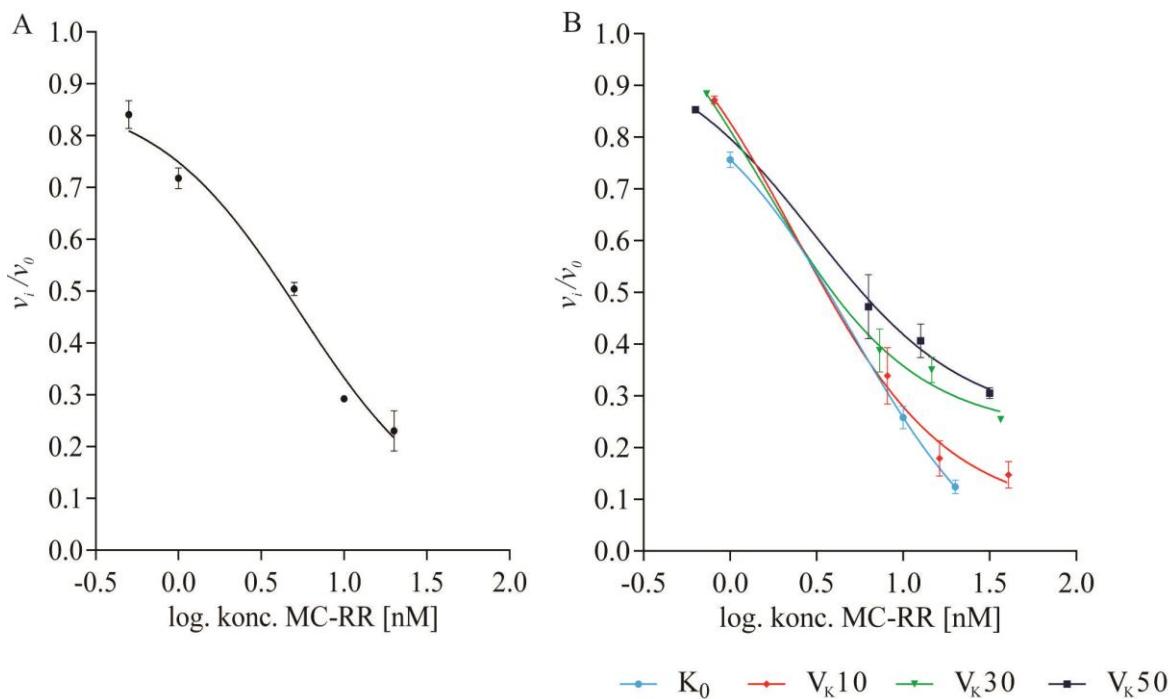
Pri testu inhibicije PP1 smo preverili vpliv Jaworski medija na aktivnost PP1. Iz rezultatov razberemo, da je v vzorcu z dodanim Jaworski medijem znižana aktivnost encima v primerjavi z K_N . Testirali smo tudi vzorce, kjer ni bil prisoten ali encim PP1 ali substrat p-NPP (Slika 17).



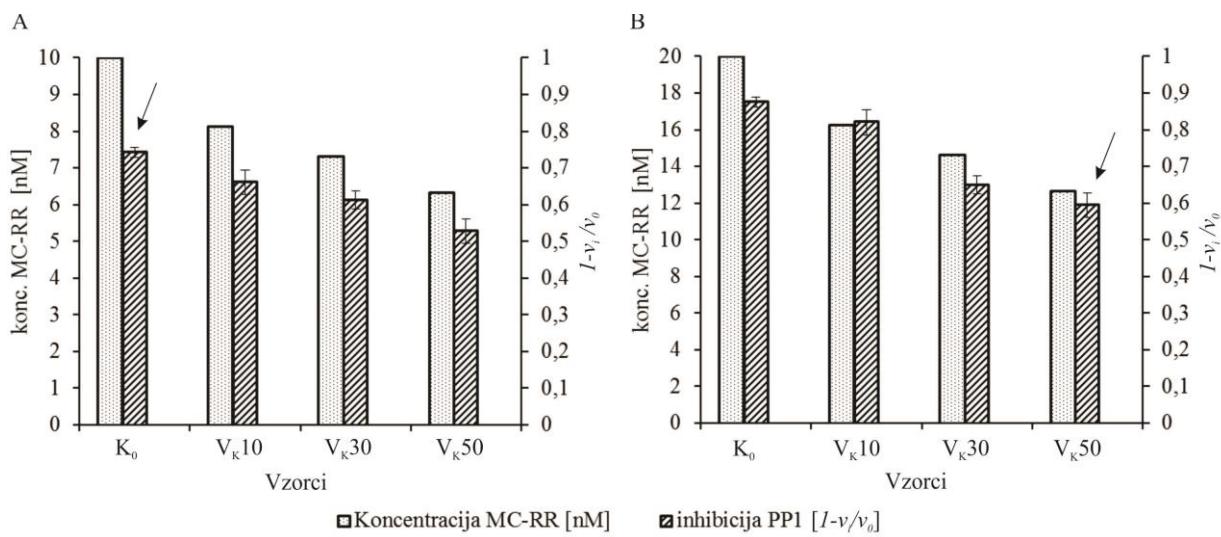
Slika 17 Hitrost encimske reakcije [v_i/v_0] pri kontrolah. K_N (vzorec brez inhibitorja, negativna kontrola inhibicije), K_N+JM (vzorec brez inhibitorja z medijem Jaworski), K_E (kontrola brez encima) in K_S (kontrola brez substrata).

Učinkovitost inhibitornega delovanja MC-RR na PP1 smo testirali z izoliranim MC-RR v metanolu. Test inhibicije PP1 smo izvedli v koncentracijskem območju 0,5 nM, 1 nM, 10 nM in 20 nM MC-RR. Ti vzorci so pozitivna kontrola (PK) delovanja MC-RR. Z višanjem koncentracije MC-RR se je aktivnost PP1 zmanjševala (Slika 18A). Vse koncentracije MC-RR, ki so podane, so izračunane glede na HPLC elucijske diagrame in preračunane na ekvivalent mikrocistina-LR. Nato smo testirali inhibitorno učinkovitost vzorcev. Vzorec pred učinkovanjem z BDDA celico je K_0 (kontrola nič). Vzorci po 10-ih, 30-ih in 50-ih

minutah delovanja BDDA celice so: V_{K10} , V_{K30} , V_{K50} . Vsi vzorci so testirani v koncentracijskem območju 1 nM, 10 nM, 20 nM in 50 nM končne koncentracije MC-RR in produktov razgradnje (II) skupaj. Vse koncentracije MC-RR, ki so podane, so izračunane glede na HPLC elucijske diagrame in preračunane na ekvivalent mikrocistina-LR. Trend nakazuje, da se v istem koncentracijskemu območju hitrost encimske reakcije (v_i/v_0) s tretiranjem viša v primerjavi z vzorcem pred tretiranjem (K_0) (Slika 18B).



Slika 18: Inhibicija PP1 z MC-RR. Inhibicijo PP1 smo merili spektrofotometrično pri 405 nm z uporabo substrata p-NPP. A) Na grafu je prikazana hitrost encimske reakcije kot v_i/v_0 v odvisnosti od koncentracije MC-RR za pozitivno kontrolo (PK). V_i pomeni v prisotnosti, v_0 pa v odsotnosti MC-RR. Prikazana so povprečja \pm SD (število vzorcev je med 2 in 4 B). Na grafu je prikazana hitrost encimske reakcije kot v_i/v_0 v odvisnosti od koncentracije MC-RR, za vzorec pred tretiranjem z BDDA celico K_0 (kontrola nič) ter vzorcev po 10-ih, 30-ih in 50-ih minutah delovanja BDDA celice: V_{K10} , V_{K30} in V_{K50} . V_i pomeni v prisotnosti, v_0 pa v odsotnosti MC-RR. Prikazana so povprečja \pm SD (število vzorcev je med 2 in 4). K_0 – kontrola brez BDDA učinkovanja (svetlo modra), V_K – vzorec tretiran na kontinuiran pretočni način z mešanjem, številka za tem pomeni čas učinkovanja. Vzorec tretiran z BDDA 10 min. je izrisan z rdečo, z zeleno je izrisan vzorec tretiran z BDDA 30 min. in s temno modro vzorec, ki je bil tretiran z BDDA 50 min.



Slika 19: Koncentracija MC-RR [nM] ter inhibicija PP1 [$I - v_i/v_0$] v vzorcih pred in po učinkovanju z BDDA na kontinuiran pretočni način z mešanjem. Inhibicija je podana kot nasprotna vrednost hitrosti encimske reakcije. K₀ – kontrola pred BDDA učinkovanjem, V_K – vzorec, način tretiranja, številka za tem pomeni čas učinkovanja. A) Koncentracija MC-RR v koncentračijskem območju 10 nM skupne koncentracije MC-RR in PR (II). Puščica označuje inhibicijo PP1 pri K₀. B) Koncentracija MC-RR v koncentračijskem območju 20 nM skupne koncentracije MC-RR in PR (II). Puščica označuje inhibicijo PP1 pri V_K50.

Rezultati na sliki 19A in 19B ter v Preglednici 7 prikazujejo vzorce pred (K₀) in po (V_K10, V_K30, V_K50) učinkovanju z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem pri 10 nM in 20 nM skupne koncentracije MC-RR in PR (II). Koncentracija mikrocistina v vzorcih se s časom učinkovanja znižuje, obenem pa se zmanjšuje tudi biološka aktivnost teh vzorcev, saj pada z zniževanjem koncentracije mikrocistina.

Preglednica 7: Koncentracije MC-RR pred in po BDDA učinkovanju na kontinuirano pretočni način z mešanjem v koncentračijskem območju 10 in 20 nM skupne koncentracije MC-RR in PR (II). Pri vsaki koncentraciji je podana inhibicija PP1 za pripadajočo koncentracijo MC-RR. Inhibicija je podana kot nasprotna vrednost hitrosti encimske reakcije.

Vzorec	MC-RR in PR (II) 10 nM		MC-RR in PR (II) 20 nM	
	MC-RR [nM]	inhibicija PP1 [$I - v_i/v_0$]	MC-RR [nM]	inhibicija PP1 [$I - v_i/v_0$]
K ₀	10,00	0,74	20,00	0,88
V _K 10	8,11	0,66	16,22	0,82
V _K 30	7,31	0,61	14,62	0,65
V _K 50	6,31	0,53	12,62	0,59

5 RAZPRAVA

5.1 ELEKTROKEMIČNA RAZGRADNJA MIKROCISTINA Z BDPA

5.1.1 Vpliv elektrolitov na razgradnjo mikrocistina

Razgrajevanje mikrocistina v vodnih raztopinah z BDPA učinkovanjem je bilo že testirano v prisotnosti različnih elektrolitov pri različnih koncentracijah (Zhang in sod., 2009; Tran in Drogui, 2013; Zhang in sod., 2013; Liao in sod., 2014). Elektroliti pozitivno vplivajo na prevodnost, ker olajšajo prenos električnega toka, s tem se znižujejo potrebe po električni energiji za dosego istega učinka (Tran in sod., 2009).

Zhang in sod. (2009) so testirali učinkovitost razgradnje mikrocistina-RR iz vodne raztopine ob dodatku 20 mM: NaCl ali KCl ali K₂SO₄ ali Na₂CO₃ ali KNO₃. Tran in Drogui (2013) pa so pri raziskavi razgradnje mikrocistina-LR iz vodne raztopine uporabili kot podporne elektrolite: NaCl ali NaBr ali Na₂SO₄ ali NaNO₃ v koncentraciji 200 mg/l. Razgradnja je bila najbolj učinkovita pri uporabi NaCl (Zhang in sod., 2009; Tran in Drogui, 2013).

V magistrskem delu smo kot raztopino za razredčevanje mikrocistina in nadaljnje BDPA učinkovanje uporabili medij Jaworski. Medij Jaworski je gojišče za rast fitoplanktonskih organizmov. Uporabili smo ga zaradi primerjave učinkovanja BDPA elektrolitske celice na razgradnjo cianobakterijskih celic v kulturi. V njem so raztopljeni različni soli. Medij Jaworski vsebuje sestavine, med katerimi so v večji koncentraciji: NaNO₃ (941 µM), MgSO₄ * 7H₂O (246 µM), Na₂HPO₄ * 12H₂O (358 µM), Ca(NO₃)₂ * 4H₂O (236 µM), NaHCO₃ (189 µM) in KH₂PO₄ (911 µM). Prisotni so še EDTA, kovine v sledovih in vitamini (Preglednica 4). Molarnost sestavin v raztopini medija Jaworski je manjša, kot so jo uporabili v predhodnih raziskavah (Zhang in sod., 2009; Tran in Drogui, 2013). Prevodnost raztopine Jaworski medija je 230 µS/cm, kar je tudi manj od prevodnosti raztopine po Tran in Drogui (2013), ki je znašala 350 µS/cm. V raztopini Jaworski medija so nitratni, sulfatni, fosfatni in karbonatni ioni. Nitratni ioni naj ne bi vplivali na posredno oksidacijo organskih snovi v raztopini, saj iz njih ne nastajajo reaktivne oksidacijske zvrsti (Zhang in sod., 2009; Tran in Drogui, 2013). Delujejo kot podporni elektrolit, ki so jih tudi Liao in sod. (2014) v koncentraciji 10 µM uporabili v svoji raziskavi. Karbonatni in sulfatni ioni se oksidirajo in pri tem nastanejo reaktivni intermediati oksidacije, vendar so Zhang in sod. (2009) potrdili boljšo razgradnjo mikrocistina ob prisotnosti nitratnih ionov, kot če so uporabili sulfatne ali karbonatne ione. Vpliv fosfatnih ionov, kot elektrolitov pri elektrokemični razgradnji mikrocistina z BDPA ni znani. V raztopini medija Jaworski je prisoten tudi klor v obliki MnCl₂. Ker gre za sestavino v sledovih, je vpliv samega klora na razgradnjo mikrocistina iz medija Jaworski težko ovrednotiti. V magistrskem delu smo potrdili uspešno razgradnjo mikrocistina v raztopini medija Jaworski. Prisotnost vseh ionov najverjetneje pozitivno vpliva na razgradnjo mikrocistina iz medija Jaworski, bodisi zaradi olajšanega električnega pretoka, bodisi zaradi možnih nastalih reaktivnih

intermediatov oksidacije, ki tudi reagirajo z mikrocistinom in vplivajo na učinkovitejšo razgradnjo.

5.1.2 Vpliv načina izvedbe BDDA elektrokemijske oksidacije na razgradnjo mikrocistina

Uporabili smo dva različna načina izvedbe elektrokemijske oksidacije: šaržno pretočno učinkovanje in kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem, ki je bilo pri razgradnji mikrocistina uspešnejše za 24 %.

Pri načinu šaržnega pretočnega učinkovanja je bil celoten volumen raztopine mikrocistina 50-krat izpostavljen elektrolizi z BDDA (Slika 4). Pri načinu kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem pa je bil celoten volumen vzorca v eni posodi, iz katere je bil izpeljan vtok in izztok iz elektrolitske celice. Raztopino smo mešali s pomočjo magnetnega mešala; vtok in izztok je imel hitrost 10 ml/min. Pri tem načinu je raztopina naključno prehajala skozi celico (Slika 5).

Liao in sod., 2014 navajajo, da pri BDDA 75 % razgradnje organskega materiala lahko pripišemo radikalni oksidaciji z OH[·], medtem ko k preostalih 25 % oksidacije prispevajo elektroni (e⁻). Povprečni življenjski čas radikala OH[·] je $4 * 10^{-9}$ s, difuzijska pot le-tega v vodi pa 6 nm. Oksidacije zaradi OH[·] radikalov se zgodijo le zelo blizu BDDA elektrode, medtem ko nadaljnje reakcije molekularne oksidacije in razgradnje potekajo spontano naprej v mediju.

Glede na dobljene rezultate in zgornje ugotovitve lahko predvidevamo, da je bila uspešnost razgradnje pri šaržnem pretočnem načinu manjša zaradi samega načina izvedbe poskusa. Vsaka zamenjava posodic z vzorcem in nato ponovno vzpostavljanje optimalnih pogojev elektrolize (hitrost pretoka in napetost celice) je porabila določen čas, ko vzorec ni bil optimalno tretiran. Po vzpostavljivosti optimalnih pogojev je sicer prišlo do reakcij med molekulami mikrocistina z OH[·], reaktivnimi oksidiranimi kemijskimi zvrstmi in e⁻, vendar je ustavljanje pretoka ter ponovno vzpostavljanje v optimalne pogoje negativno vplivalo na reakcije razgradnje. Nasprotno lahko trdimo za način kontinuiranega pretočnega razgrajevanja z mešanjem. Molekule mikrocistina so bile konstantno in z enakimi pogoji ves čas tretiranja v kontaktu z BDDA in nastalimi OH[·] ter e⁻, zato je iz dobljenih rezultatov razvidno, da je bil ta način razgradnje zaradi same izvedbe uspešnejši.

5.1.3 Vpliv časa učinkovanja BDDA na razgradnjo mikrocistina

Mikrocistin se s časom učinkovanja razgradi (Zhang in sod., 2009; Tran in Drogui, 2013; in Liao in sod., 2014). Razgradnja je največja v prvih 30-ih minutah delovanja. V tem času se razgradi 86,8 % MC-RR, po 60-ih minutah se razgradi 98,5 % MC-RR, vendar do popolne mineralizacije pride šele po 2-h urah. Hitrost razgradnje je največja na začetku, dokler je koncentracija mikrocistina visoka; ko se ta razgradi, se hitrost zmanjša (Zhang in sod., 2009).

Iz rezultatov učinkovanja BDDA na način šaržnega pretočnega učinkovanja in kontinuiranega učinkovanja z mešanjem vidimo, da se s časom elektolize vrh mikrocistina na HPLC elucijskem diagramu znižuje. Nastajajo novi vrhovi: produkti razgradnje (II) in sklop vrhov produktov razgradnje (I) (Slika 9A, 13A).

Med elektrolizo z BDDA ne poteka le razgradnja mikrocistina. Po 10-ih minutah se začne zmanjševati tudi vrh (II). Produkte razgradnje zaznamo kot povečevanje sklopa vrhov I (produkti razgradnje I) (Slika 9A, 9B, 13A, 13B) (Preglednica 5, 6).

Pri načinu šaržnega pretočnega učinkovanja prikazuje krivulja hitro zmanjšanje koncentracije mikrocistina v prvih 40-ih minutah (66 %), nato pa preide v položen položaj, v naslednjih 10-ih minutah učinkovanja se razgradi le še 1 % mikrocistina. Po 50-ih minutah je razgrajenega 67 % mikrocistina (Slika 10, Preglednica 5). Popolnoma drugačne rezultate smo dobili po razgradnji mikrocistina na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem. Krivulja, ki prikazuje zmanjševanje koncentracije mikrocistina, se skozi celoten čas učinkovanja strmo znižuje, po 50-ih minutah se razgradi 91 % mikrocistina (Slika 14, Preglednica 6). Učinkovitost razgradnje mikrocistina na ta način se zaradi zmanjšanja koncentracije ni bistveno spremenila.

Pri obeh načinih smo v prvih desetih minutah zaznali povečanje koncentracije produktov razgradnje (II), ki se nato nadaljnje razgrajujejo. Koncentracija produktov razgradnje (I) se skozi celoten proces povečuje (Slika 10, 14; Preglednica 5, 6).

Po petdeset minutnem učinkovanju na način šaržnega pretočnega učinkovanja se spremeni površina vrhov (navedeno kot enota: $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$). V raztopini ostane 61.819 enot več razpadnih produktov (I), 260.057 manj enot mikrocistina in 27.820 manj enot razpadnih produktov (II), merjeno pri 238 nm (Preglednica 5).

Po koncu kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem ostane v raztopini 51,413 enot več razpadnih produktov (I), 363,640 manj enot mikrocistina in 36,880 manj enot razpadnih produktov (II) merjeno pri 238 nm (Preglednica 6).

Pri obeh načinih zaznamo veliko manj razpadnih produktov, kot se razgradi molekul mikrocistina. Merjenje je bilo izvedeno pri 238 nm, kjer imajo značilen vrh številni mikrocistini. Z razgrajevanjem se je porušila njihova značilna kemijska struktura in s tem tudi zmanjšala absorpcija. V primerjavi z načinom šaržnega pretočnega učinkovanja se je pri načinu kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem razgradilo več molekul mikrocistina in produktov razgradnje (II), manj pa smo zaznali produktov razgradnje (I). Rezultati nakazujejo, da je bil način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem pri razgradnji mikrocistinov učinkovitejši kot šaržno pretočni način (Preglednica 5, 6).

5.1.4 Vpliv časa učinkovanja BDDA na spreminjanje mikrocistina in nastajanje produktov razgradnje

Liao in sod., (2014) navajajo, da je z razgradnjo mikrocistina po 55-ih minutah elektrolize z BDDA nastalo 16 različnih produktov razgradnje. Vsi produkti razgradnje razen enega imajo krajši retenzijski čas, kot ga ima prvoten MC-LR (27,1 minute). Mehanizem delovanja OH radikalov je hidroksilacija s substitucijo, adicija z izomerizacijo ter oksidacija in cepitev vezi. Glede na rezultate LC-MS/MS so predlagane različne poti razgradnje. V grobem jih lahko združimo v dva sklopa poti razgradnje mikrocistina.

Prvi sklop opisuje mehanizem razgradnje kot OH[·] napad na ADDA skupino. ADDA je nepolaren del molekule mikrocistina (Song in sod., 2005), ko se ta odcepi, postanejo produkti razgradnje bolj polarni. Drugi sklop razgradnje mikrocistina je OH[·] napad na Mdha skupino v cikličnem obroču mikrocistina, kar povzroči odprtje obroča. Sledi OH[·] napad na verigo ADDA, ki se odcepi od sedmega ogljikovega atoma skupine. V tem primeru lahko nastajajo nepolarni produkti razgradnje z daljšim retenzijskim časom kot pri prvotnem MC-LR (Liao in sod., 2014).

Na osnovi naših rezultatov lahko potrdimo, da z BDDA razgradnjo nastajajo nepolarne molekule. Novonastali vrh produkta razgradnje (II) ima na HPLC elucijskem diagramu daljši retenzijski čas kot vrh mikrocistina. Molekule, ki tvorijo vrh (II), so bolj nepolarne, saj se vežejo na kolono z reverzno fazo z večjo afiniteto (Slika 9A in 13A). Poleg tega se vsem vrhovom na HPLC elucijskem diagramu podaljšujejo retenzijski časi, kar pomeni, da molekule mikrocistina in razpadnih produktov postajajo s časom elektrolize z BDDA bolj nepolarne (Slika 9A, 13A; Preglednica 5, 6).

Spreminjanje retenzijskega časa lahko torej pomeni spremembe strukture molekul, kar iz UV spektrov mikrocistina in produktov razgradnje (II) na način šaržnega pretočnega učinkovanja sprememb ne opazimo; znižuje se le koncentracija (Slika 11, Slika 12). Iz UV spektrov vrhov produktov razgradnje (II) razberemo, da nimajo specifičnega vrha pri 238 nm (Slika 12, 16). Vrh pri 238 nm v UV spektru ima molekula mikrocistina, saj je značilen za aromatske skupine, ki jo nosi ADDA.

Iz UV spektrov mikrocistina po razgrajevanju na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem sprva opazimo le zniževanje koncentracije. Spremembo v UV spektru zaznamo šele po 50-i minuti elektrolize z BDDA. Značilen vrh pri 238 nm izgine, sam spekter pa je podoben spektrom produktov razgradnje (II) (Slika 15). Po Liao in sod., 2014 se od mikrocistina v določeni stopnji razgradnje odcepi ADDA. S tem mikrocistini izgubijo aromatsko skupino, kar na HPLC elucijskem diagramu pri 238 nm zaznamo kot zmanjšanje koncentracije mikrocistina (Slika 9A, 13A).

S časom razgrajevanja z BDDA po načinu kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem se retenzijski čas vrhov manj nspremeni, razgradnja pa je večja. Molekule se torej učinkoviteje in hitreje razgrajujejo in pri tem ne postajajo toliko nepolarne kot molekule po elektrolizi z BDDA na način šaržnega pretočnega učinkovanja (Preglednica 5, 6).

5.2 INHIBICIJA PP1 S PRODUKTI RAZGRADNJE

Testirali smo inhibitorno aktivnost mikrocistina v pozitivni kontroli ter inhibitorno aktivnost mikrocistina v vzorcih, ki smo jih vzorčili v procesu BDDA elektrolitske razgradnje na način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem. Koncentracijsko območje, ki smo ga uporabili (od 0,5 nM do 50 nM), pokriva linearen del sicer sigmoidne krivulje (Bubik, 2012).

Preverili smo tudi vpliv Jaworski medija na delovanje reakcije med PP1 in p-NPP ter kontrole brez encima oziroma brez substrata. Rezultati so pokazali, da je aktivnost PP1 ob dodatku Jaworski medija zmanjšana (Slika 17). S primerjavo krivulje pozitivne kontrole na sliki 18A ter krivulje K_0 na sliki 18B, vidimo da je v_i/v_0 pri isti koncentraciji MC-RR nižja pri K_0 . Pri vzorcih pozitivne kontrole je bil izoliran mikrocistin hranjen v metanolu ter nato redčen do končne koncentracije za posamezno reakcijo s pufrom 1. Pri vzorcih K_0 pa smo imeli mikrocistin redčen v Jaworski mediju, ki smo ga šele nato s pomočjo pufra 1 redčili do različnih končnih koncentracij za posamezno reakcijo. Iz tega sklepamo, da je Jaworski medij, ki vsebuje veliko število različnih ionov, vplival na zmanjšano hitrost encimske reakcije med PP1 in p-NPP pri vseh vzorcih redčenih v Jaworski mediju (Slika 18B).

V pozitivni kontroli se z večanjem koncentracije mikrocistina hitrost encimske reakcije med proteinsko fosfatazo 1 (PP1) in p-NPP substratom zmanjšuje, saj mikrocistin v reakcijski mešanici inhibira PP1 (Slika 18A). Zmanjševanje koncentracije mikrocistina in posledično njegove inhibitorne aktivnosti smo nato preverili v vzorcih pred (K_0) in po (V_{K10} , V_{K30} , V_{K50}) BDDA elektrolizi v koncentracijskem območju 1 nM, 10 nM, 20 nM in 50 nM končne koncentracije mikrocistina in produktov razgradnje (II) skupaj. Rezultati prikazujejo, da se je s časom BDDA elektrolize inhibitorna aktivnost mikrocistina zmanjšala (Slika 18B). Molekule so se namreč zaradi elektrokemične oksidacije spreminjače, po 50-ih minutah elektrolize z BDDA ni bilo več intaktnega mikrocistina (sprememba v retenzijskem času in spektru) (Preglednica 6, Slika 15). S časom tretiranja lahko pri višjih koncentracijskih območjih vidimo (višja koncentracija molekul, večje tekmovanje za vezavo na PP1), da krivulja nima več linearnega poteka v primerjavi s K_0 . Slednje pomeni, da se z višanjem koncentracije mikrocistina hitrost encimske reakcije ne zmanjšuje več linearно. Preostanek mikrocistina še vedno deluje inhibitorno na PP1, vendar je ta vezava spremenjena in ni več kovalentna, kot je pri intaktnemu mikrocistinu (Slika 18B).

Koncentracija mikrocistina (navedena kot površina vrhov na elucijskem diagramu) se je med BDDA razgradnjo zmanjševala, spremenjalo se je tudi razmerje med koncentracijo mikrocistina in koncentracijo produktov razgradnje (II). Iz začetne vsebnosti mikrocistina v vzorcu K_0 se je delež mikrocistina zmanjševal, pri tem je nastajal in se spremenjal tudi delež PR (II). Po 50-ih min. elektrolize z BDDA je ostalo 63 % MC-RR in 37 % PR (II) (Preglednica 6). Z zmanjševanjem deleža mikrocistina se je vzporedno zniževala inhibicija PP1. Pomemben je rezultat primerjave v inhibiciji med 10 nM MC-RR (K_0), ki je 0,74 (Slika 19A (puščica), Preglednica 7), ter inhibicijo pri 12 nM MC-RR (V_{K50}), ki je 0,59 (Slika 19B (puščica), Preglednica 7). Primerjava teh dveh podobnih koncentracij, pri kateri je v K_0 intakten MC-RR pri V_{K50} pa preostanek tretiranega mikrocistina pokaže, da se je inhibitorna aktivnost tretiranega preostalega mikrocistina zmanjšala.

Po 50-ih min. elektrolize z BDDA na kontinuirano pretočni način z mešanjem se je razgradilo 91 % mikrocistina. Preostalih 9 % (predstavlja 63 % delež mikrocistina v mešanici s produkti razgradnje (II)) je sicer še vedno delovalo inhibitorno, vendar z zmanjšano inhibicijsko aktivnostjo (Preglednica 6, Slika 19).

6 SKLEPI

- Mikrocistin smo izolirali iz cianobakterijske kulture *P. rubescens* z 21,7 % izkoristkom pri čiščenju.
- Mikrocistin in produkti razgradnje so se po učinkovanju z BDDA razgrajevali. To smo ugotavljali: s spremeljanjem višine vrhov na HPLC elucijskem diagramu, s spremeljanjem sprememb UV spektra in s spremeljanjem retenzijskih časov na HPLC elucijskem diagramu.
- Uspešnost razgradnje izoliranega mikrocistina z BDDA je bila pri šaržnem pretočnem učinkovanju 67 %, pri kontinuiranem pretočnem učinkovanju z mešanjem pa 91 %. Mikrocistina nismo popolnoma mineralizirali, za kar bi bil potreben daljši čas učinkovanja.
- Nastale produkte razgradnje smo zaznali s HPLC/PAD.
- Rezultati testa inhibicije PP1 z MC-RR pred in po BDDA učinkovanju na kontinuirano pretočni način z mešanjem prikazujejo, da se s časom BDDA učinkovanja zmanjšuje koncentracije mikrocistina, s tem pa se paralelno znižuje inhibicija PP1. Preostanek spremenjenega mikrocistina ima zmanjšano inhibitorno aktivnost v primerjavi z intaktnim mikrocistinom.

7 POVZETEK

Cianobakterije so mikroorganizmi, ki naseljujejo številna vodna telesa po vsem svetu. V času cvetenja lahko proizvajajo cianotoksine, med katerimi so najbolj pogosti mikrocistini. Mikrocistini so hepatotoksi, ki izrazito inhibitorno delujejo na proteinske fosfataze tipa 1 in 2A. Inhibicija številnih proteinskih fosfataz in posledično hepatotoksično delovanje ter dokazana tumorska promocija mikrocistinov so lastnosti, zaradi katerih je prisotnost mikrocistinov v vodi nevarna. Priprava pitne vode določa odstranjevanje ali razgrajevanje mikrocistinov kot onesnažila. WHO (Cyanobacterial ..., 2003) je določila mejno vrednost MC-LR 1 µg/l. V tej raziskavi smo kot metodo odstranjevanja mikrocistina uporabili elektrolitsko celico, z z borom dopirano diamantno anodo (BDDA). Namen naloge je bil z BDDA razgraditi izoliran mikrocistin v raztopini gojišča (medij Jaworski). Uporabili smo dva načina izvedbe: šaržno pretočno učinkovanje in kontinuirano pretočno učinkovanje z mešanjem. S časom učinkovanja v elektrolitski celici se je zmanjševala koncentracija mikrocistina. Glede na rezultate UV spektrov in retensijskih časov vrhov produktov razgradnje (I) in (II) ter mikrocistina na HPLC elucijskem diagramu lahko sklepamo, da se mikrocistin in produkti razgradnje s časom elektrolize z BDDA razgrajujejo. Rezultati so pokazali, da je bil pri razgradnji mikrocistina način kontinuiranega pretočnega učinkovanja z mešanjem učinkovitejši. Preostanek mikrocistina po elektrolizi je imel zmanjšano inhibitorno aktivnost za PP1, kar je pokazatelj njegove manjše biološke aktivnosti in posledično toksičnosti.

8 VIRI

- Acero J. L., Rodriguez E., Meriluoto J. 2005. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. Water Research, 39: 1628-1638
- Afzal A., Oppenländer T., Bolton J. R., El-Din M. G. 2010. Anatoxin-a degradation by advanced oxidation processes: vacuum-UV at 172 nm, photolysis using medium pressure UV and UV/H₂O₂. Water Research, 44: 278-286
- Alehashem S., Chambers F., Strojek J. W., Swain G. M., Ramesham R., 1995. Cyclic voltammetric studies of charge transfer reactions at highly boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. Analytical Chemistry, 67, 17: 2812-2821
- Al Momani F. A., Jarrah N. 2010. Treatment and kinetic study of cyanobacterial toxin by ozone. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 45: 719-731
- Azevedo S. M. F. O., Carmichael W. W., Jochimsen E. M., Rinehart K. L., Lau S., Shaw G. R., Eaglesham G. K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. Toxicology, 181: 441-446
- Blom J. F., Robinson J. A., Jüttner F. 2001. High grazer toxicity of [D-Asp³, (E)-Dhb⁷] microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. Toxicon, 39, 12: 1923-1932
- Brooke S., Newcombe G., Nicholson B., Klass G. 2006. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. Toxicon, 48: 1054-1059
- Bubik A. 2012. Ekološki, biološki in biokemični učinki nekaterih pogostih Ne-hepatotoksičnih cikličnih cianopeptidov (n-hCCP). Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Podiplomski študij biomedicine: 145 str.
- Campinas M., Rosa M. J. 2010. Removal of microcystins by C/UF. Separation and Purification Technology, 71: 114-120
- Campos A., Vasconcelos V. 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. International Journal of Molecular Sciences, 11: 268-287
- Catling D. C. in Claire M. W. 2005. How Earth's atmosphere evolved to an oxic state: A status report. Earth and Planetary Science Letters, 237: 1-20
- Chen J., Xie P., Li L., Xu J. 2009. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. Toxicological Sciences, 108, 1: 81-89
- Chorus I., Bartram J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. London, E & FN Spon: 400 str.

- Chow C. W. K., Panglisch S., House J., Drikas M., Burch M. D., Gimbel R. 1997. A study of membrane filtration for the removal of cyanobacterial cells. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 46, 6: 324-34
- Codd G. A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16, 1: 51-60
- Cohen P. 2002. The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4, 5: E127-E130
- Cohen-Bazire G., Bryant D. A. 1982. Phycobilisome: composition and structure. V: *The Biology of Cyanobacteria*. Carr N. G., Whitton B. A. (eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 43: 190
- Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. 2003. Geneva, World Health Organization: 1-18 http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf?ua=1 (4. jun. 2014)
- Dixon M. B., Falconet C. Ho L., Chow C. W. K., O'Neill B. K., Newcombe G. 2010. Nanofiltration for the removal of algal metabolites and the effects of fouling. *Water Science and Technology*, 61: 1189-1199
- Dixon M. B., Falconet C., Ho L., Chow C. W. K., O'Neill B. K. Newcombe. G, 2011. Removal of cyanobacterial metabolites by nanofiltration from two treated waters. *Journal of Hazardous Materials*, 188: 288-295
- Donati C., Drikas M., Hayes R., Newcombe G. 1994. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Reseach*, 28: 1735-1742
- Feng C., Sugiura N., Masaaka Y, Maekawa T. 2005. Electrochemical degradation of microcystin-LR, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40: 453-465
- Feurstein D., Holst K., Fischer A., Dietrich D. R. 2009. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234: 247-255.
- Filipič M., Žegura B., Sedmak B., Horvat-Žnidaršić I., Milutinovič A., Šuput D. 2007. Subchronic exposure of rats to sublethal dose of microcystin-YR induces DNA damage in multiple organs. *Radiology and Oncology*, 41, 1: 15-22
- Francis, G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature*, 18: 11-12
- Gijsbertsen-Abrahamse A. J., Schmidt W., Chorus I., Heijman S. G. J. 2006. Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 276, 1: 252-259
- Grach-Pogrebinsky O., Sedmak B., Carmeli S. 2004. Seco [d-Asp3] microcystin-RR and [d-Asp3, d-Glu (OMe) 6] microcystin-RR, two new microcystins from a toxic water bloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of Natural Products*, 67, 3: 337-342

- Gradnik R. 1946. Toplinski odnošaji v Blejskem in Bohinjskem jezeru. Geografski vestnik, 18, 1-4: 94-125
- Gregorio L. K., Esteves S. L., Fardilha M. 2014. Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins. *Translational Research*, 164, 5: 366-391
- Grützmacher G., Böttcher G., Chorus I., Bartel H. 2002. Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environmental Toxicology*, 17, 4: 386-394
- Hall T., Hart J., Croll B., Gregory R. 2000. Laboratory-scale investigations of algal toxin removal by water treatment. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, 14: 143-149
- He X., Pelaez M., Westrick J. A., O'Shea K. E., Hiskia A., Triantis T. in sod. 2012. Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H₂O₂ in synthetic and natural water samples. *Water Reseach*, 46: 1501-1510
- Hendeland K. in Østensvik Ø. 2010. Microcystin poisoning in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Toxicon*, 56: 1076-1078
- Hitzfeld B. C., Hoeger S. J., Dietrich D. R. 2000. Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 108 (Suppl 1): 113-122
- Hongxing S., Juhui Q., Aimin W., Jiantuan G. 2005. Degradation of microcystins in aqueous solution with in situ electrogenerated active chlorine. *Chemosphere*, 60: 326-333
- Honkanen R. E., Zwiller J., Moore R. E., Daily S. L., Khatra B. S., Dukelow M., Boynton A. L. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 19401-19404
- Hornbeck P. V., Kornhauser J. M., Tkachev S., Zhang B., Skrzypek E., Murray B., Latham V., Sullivan M. 2012. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Research*, 40: D261-D270
- Ingebritsen T. S., Cohen P. 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science*, 221: 331-338
- Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. 2010. Lyon, France, WHO/IARC: 464 str.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/mono94.pdf> (15. jun. 2014)
- Kaya K., Sano T. 1998. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hetotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. *Chemical Research in Toxicology*, 11: 159-163
- Lambert T. W., Holmes C. F. B., Hrudey S. E. 1996. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Reseach*, 30: 1411-1422

- Lawton L. A., Robertson P. K. J., Cornish B. J., Jasrs M. 1999. Detoxification of microcystins (cyanobacterial hetotoxins) using TiO₂ photocatalytic oxidation. Environmental Science & Technology, 33: 771-775
- Lee J., Walker H. W. 2008. Mechanisms and factors influencing the removal of microcystin-LR by ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science, 320: 240-247
- Liao W., Murugananthan M., Zhang Y. 2014. Electrochemical degradation and mechanistic analysis of microcystin-LR at boron-doped diamond electrode. Chemical Engineering Journal, 243: 117-126
- Liu I., Lawton L. A., Bahnemann D. W., Liu L., Proft B., Robertson P. K. J. 2009. The photocatalytic decomposition of microcystin-LR using selected titanium dioxide materials. Chemosphere, 76: 549-553
- Lürling M., in Faassen E. J. 2013. Dog poisonings associated with a *Microcystis aeruginosa* Bloom in the Netherlands. Toxins, 5: 556-567
- Ma B., Chen Y., Hao H., Wang B., Lv H., Zhang G. 2005. Influence of ultrasonic field on microcystins produced by bloom forming algae. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 41: 197-201
- MacKintosh R. W., Dalby K. N., Campbell D. G., Cohen P. T.W., Cohen P., MacKintosh C. 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. FEBS Letters, 371: 236-240
- Martin H. B., Argoitia A., Landau U., Anderson A. B., Angus J. C. 1996. Hydrogen and Oxygen Evolution on Boron-Doped Diamond Electrodes. Journal of the Electrochemical Society, 143, 6: 133-136
- Martínez-Huitle C. A., Ferro S. 2006. Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: direct and indirect processes. Chemical Society Reviews, 35, 12: 1324-1340
- McElhiney J., Lawton L. A., Leifert C. 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. Toxicology, 39, 9: 1411-1420
- Merel S., LeBot B., Clément M., Seux R., Thomas O. 2009. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products. Chemosphere, 74: 832-839
- Merel S., Clément M., Thomas O. 2010. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. Toxicology, 55: 677-691
- Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baurès E., Thomas O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. Environment International, 59: 303-327
- Miao H. F., Qin F., Tao G. J., Tao W. Y., Ruan W. Q. 2010. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. Chemosphere, 79: 355-361

- Milutinović A., Sedmak B., Horvat-Žnidaršić I., Šuput D. 2002. Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7, 1: 139-141
- Modestov A. D., Evstafeva Yu.E., Pleskov Yu.V., Mazin V. M., Varnin V. P., Teremetskaya I. G. 1997. Synthetic semiconductor diamond electrodes: kinetics of some redox reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 431, 2: 211-218
- Mohamed Z. A., Carmichael W. W., El-Sharouny H. M. 1998. Activated carbon removal efficiency of microcystins in an aqueous cell extract of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria tenuis* strains isolated from Egyptian freshwaters. *Environment Toxicology*, 14: 197-201
- Mouchet P., Bonnelye V. 1998. Solving algae problems: French expertise and world-wide applications. *Journal of Water Supply: Research and Technology –Aqua*, 47: 125-141
- Mur L. R., Schreurs H., Visser P. 1993. How to control undesirable cyanobacterial dominance. V: Strategies for Lake Ecosystems Beyond 2000. Giussani G. in Callieri C. (eds.). Proc. 5th Int. Conf. Conservation and management of Lakes, Stresa: 565-569
- Newcombe G., Nicholson B. 2004. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *Journal of Water Supply: Research and Technology –AQUA*, 53: 227-239
- Nicholson B. C., Rositano J., Burch M. D. 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hetotoxins by chlorine and chloramine. *Water Research*, 28:1297-1303
- Panizza M., Cerisola G. 2005. Application of diamond electrodes to electrochemical processes. *Electrochimica Acta*: 51, 2: 191-199
- Pearl H. W., Hall N. S., Calandrino E. S. 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climate-induced change. *Science of the Total Environment*, 409: 1739-1745
- Pieterse A. J. H., Cloot A. 1997. Algal cells and coagulation, flocculation and sedimentation processes. *Water Science and Technology*, 36: 111-118
- Pleskov Y. V. 1999. Synthetic diamond in electrochemistry. *Russian Journal of Electrochemistry*, 68: 381-392
- Pleskov Y. V. 2002. Electrochemistry of Diamond: A Review. *Russian Journal of Electrochemistry*, 38, 12: 1275-1291
- Qiao R. P., Li N., Qi X. H., Wang Q. S., Zhuang Y. Y. 2005. Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide. *Toxicon*, 45: 745-752
- Rai A. N. 1990. Handbook of symbiotic cyanobacteria. CRC Press, Inc.: 253 str.
- Ramesham R., Rose M. F. 1997. Electrochemical characterization of doped and undoped CVD diamond deposited by microwave plasma. *Diamond and Related Materials*, 6, 1: 17-26

- Rao P. V., Gupta N., Bhaskar A. S., Jayaraj R. 2002. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *Journal of Environmental Biology/Academy of Environmental Biology*, India, 23, 3: 215-224
- Remec-Rekar Š., Bat M. 2003. Jezera. V: *Vodno bogastvo Slovenije*. Uhan. J., Bat. M. (eds.). Ljubljana, Ministry of Environment and spatial planning, Environment Agency of the Republic of Slovenia: 39-45
- Ressom R., Soong F. S., Fitzgerald J., Turczynowicz L., El Saadi O., Roder D., Maynard T., Falconer I. 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Research Council: 112 str.
- Rodríguez E. M., Acero J. L., Spoof L., Meriluoto J. 2008. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products. *Water Research*, 42: 1744-1752
- Rositano J., Nicholson B., Pieronne P. 1998. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. *Ozone: Science & Engineering Journal*, 20: 223-238
- Runnegar M., Berndt N., Kong S. M., Lee E. Y. C. in Zhang L. F. 1995. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatase 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216, 1: 162-169
- Sarma T. A. 2012. *Handbook of Cyanobacteria*, CRC Press: 802 str.
- Sassolas. A., Catanante G., Fournier D., Marty J. L. 2011. Development of a colorimetric inhibition assay for microcystin-LR detection: comparison of the sensitivity of different protein phosphatases. *Talanta*, 85, 5: 2498-2503
- Schopf J. W. 1993. Microfossils of the early archaen apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260: 640-646
- Schopf J. W. 2000. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. V: *The Ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Whitton B. A., Potts M. (eds.), Dordrecht, Kluwer: 13-35
- Sedmak B., Kosi G. 1991. Alge i njihovi toksini u našim vodama (povodom masovne pojave modrozelenih algi *Aphanizomenon flos-aquae* u Bledskom jezeru). *Vodoprivreda*, 23: 265-272
- Sedmak B., Kosi G. 1997. Microcystins in Slovene freshwaters (Central Europe)—first report. *Natural Toxins*, 5, 2: 64-73
- Sedmak B., Kosi G. 1998. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research*, 20, 4: 691-708
- Sedmak B. 2006. Toksične cianobakterije: prebivalstvo proti vodi - medsebojna pretnja. Toxic cyanobacteria: population against water - a mutual threat. *Ujma*, 20: 137-143

- Sedmak B., Eleršek T., Grach-Pogrebinsky O., Carmeli S., Sever N., Lah T. T. 2008. Ecotoxicologically relevant cyclic peptides from cyanobacterial bloom (*Planktothrix rubescens*) – a threat to human and environmental health. Radiology and Oncology, 42, 2: 102-113
- Sedmak B. 2012 Cyanobacteria and their toxins: What are they, Where can we find them, Why are they able to prevail and How do they behave? Ljubljana, National Institute of Biology: 166 str.
- Senogles P. J., Scott J. A., Shaw G., Stratton H., 2001. Photocatalytic degradation of the cyanotoxin cylindrospermopsin, using titanium dioxide and UV irradiation. Water Research, 35: 1245-1255
- Seshacharyulu P., Pandey P., Datta K., Batra S. K. 2013. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. Cancer Letters, 335: 9-18
- Shi Y. 2009. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. Cell, 139: 468-484
- Somdee T., Thunders M., Ruck J., Lys I., Allison M., Page R. 2013. Degradation of [Dha⁷] MC-LR by a microcystin degrading bacterium isolated from Lake Rotoiti, New Zealand. ISRN Microbiology, 2013: 1-8
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/596429> (1.12.2014)
- Song W., Teshiba T., Rein K., O'Shea K. E. 2005. Ultrasonically induced degradation and detoxification of microcystin- LR (cyanobacterial toxin). Environmental Science & Technology, 39: 6300-6305
- Swain G. M. 1994a. The susceptibility to surface corrosion in acidic fluoride media: a comparison of diamond, HOPG, and glassy carbon electrodes. Journal of the Electrochemical Society, 141, 12: 3382-3393
- Swain G. M. 1994b. The use of CVD diamond thin films in electrochemical systems. Advanced Materials, 6, 5: 388-392
- Swain G. M., Anderson A. B., Angus J. C. 1998. Applications of diamond thin films in electrochemistry. MRS Bulletin, 23, 9: 56-60
- Teixeira M. R., Rosa M. J. 2006a. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa* Part I. The key operating conditions. Separation and Purification Technology, 52, 1: 84-94
- Teixeira M. R., Rosa M. J. 2006b. Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration. Water Research, 40, 15: 2837-2846
- Teixeira M. R., Rosa M. J. 2007. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa* Part II. The effect of water background organics. Separation and Purification Technology, 53, 1: 126-134
- Teixeira M. R., Sousa V., Rosa M. J. 2010. Investigating dissolved air flotation performance with cyanobacterial cells and filaments. Water Research, 44, 11: 3337-3344

The molecular biology of cyanobacteria. Bryant D. A. (ed.). 1994. Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 881 str.

Thompson A.S., Rhodes J. C., Pettman I. 1988. Culture collection of algae and protozoa – Catalogue of Strains. Thompson A.S., Rhodes J. C., Pettman I. (eds.). 5th ed. United Kingdom, Ambleside, Natural Environment Research Council: 164 str.

Tran L. H., Drogu P., Mercier G., Blais J. F. 2009. Electrochemical degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote solution using ruthenium oxide on titanium exnded mesh anode. *Journal of Hazardous Materials*, 164: 1118-1129

Tran N., Drogu P. 2013. Electrochemical removal of microcystin-LR from aqueous solution in the presence of natural organic pollutants. *Journal of Environmental Management*, 114: 253-260

Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M. F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H., Harada K. I. 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria—ii. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon*, 33, 12: 1619-1631

Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M. F., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H., Harada K. 1997. Stability of microcystins from cyanobacteria—iv. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon*, 35, 7: 1033-1041

Ueno Y., Nagata S., Tsutsumi T., Hasegawa A., Watanabe M. F., Park H.-D., Chen G.-C., Chen G., Yus S.-Z. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17, 6: 1317-1321

Van Apeldoorn M. E., Van Egmond H. P., Speijers G. J. A., Bakker G. J. I. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51,1: 7-60

Van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M. 1995. Algae, An Introduction to Phycology. Van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M., (eds.). Cambridge, University Press: 623 str.

Vuori E., Pelander A., Himberg K., Waris M., Niinivaara K. 1997. Removal of nodularin from brackish water with reverse osmosis or vacuum distillation. *Water Research*, 31: 2922-2924

Walsby A. E. 1978. The gas vesicles of aquatic prokaryotes. V: Relations Between Structure and Functioning in Prokaryotic Cell. 28th Symposium of the Society for General Microbiology. Stanier R. Y., Rogers H. J., Ward J. B. (eds.). Cambridge, University Press: 338 str.

Wood S. A., Heath M. W., Holland P. T., Munday R., McGregor G. B., Ryan K. G. 2010. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (*Oscillatoriales*) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon*, 55: 897-903

Yadav S., Sinha R. P., Tyagi M. B., Kumar A. 2011. Cyanobacterial secondary metabolites. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2,1: 144-167

Yi D., Song L-R., Sedmak B. 2013. UVB radiation as a potential selective factor favoring microcystin producing bloom sorming cyanobacteria. *Plos One*, 8, 9: e73919, doi: 10.1371/journal.pone.0073919 str.

- Yoshizawa S., Matsushima R., Watanabe M. F., Harada K., Ichihara A., Carmichael W. W., Fujiki H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 116: 609-614
- Zhang C., Fu D., Gu Z. 2009. Degradation of microcystin-RR using boron-doped diamond electrode. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 2: 847-853
- Zhang Y., Zhang Y., Yang N., Liao W., Yoshihara S. 2013. Electrochemical degradation and mechanistic analysis of microcystin-LR. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 8: 1529-1537
- Žegura B., Sedmak B., Filipič M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, 41, 1: 41-48

ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem recenzentu, izr. prof. dr. Bojanu Sedmaku za odlično usmerjanje, strokovno pomoč, čas, potrpežljivost, nasvete ter strokoven pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se somentorju dr. Andreju Megliču za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela, za čas in vse nasvete v okviru magistrskega dela.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Domnu Leštanu, ker mi je omogočil sodelovanje v tej raziskavi. Zahvaljujem se mu tudi za hiter pregled magistrskega dela, ter za vse nasvete, ki so pripomogli k izboljšanju.

Zahvaljujem se Nacionalnemu Inštitutu za Biologijo za prostore in opremo, kjer sem izvajala magistrsko delo. Zahvaljujem se dr. Ani Torkar za pomoč pri meritvah na spektrofotometru SynergyTM Mx.

Najlepša hvala Karmen Stanič za vso nesebično pomoč in pozitiven sprejem vsako jutro.

Hvala mami, atu, Tjaši, Anči in ostali družini za popolno podporo tekom mojega celotnega študija. Za vse razumevanje in zato, ker mi stojite ob strani, ne glede na moje odločitve.

Hvala Urški in Jerici za pomoč ob katerikoli uri, za poslušanje, za bodrenje, za svetovanje, za kave, za smeh.

In hvala Mateju za pohvale in za kritike, za podporo in za grajo, predvsem pa za vprašanja, ki me nikoli ne pustijo ravnodušno.