

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Catedra de Biologie Experimentală

Bogdan Drugă

**MARKERI MOLECULARI PENTRU
IDENTIFICAREA TULPINILOR PRODUCĂTOARE
DE CIANOTOXINE DIN GENUL *MICROCYSTIS***

- Rezumatul tezei de doctorat -

**Coordonator științific
Prof. dr. Nicolae Dragoș**

Cluj-Napoca

2009

CUPRINS

1. Introducere	3
2. Obiectivele studiului	5
3. Material și metode.....	6
3.1 Studii de taxonomie și filogenie	6
3.2 Studiul potențialului toxic.....	7
4. Rezultate și discuții.....	9
4.1 Identificarea fimbriilor prin microscopia electronică.....	9
4.2 Analiza secvențelor genomice repetate.....	11
4.3 Analiza filogenetică pe baza genei pentru ARNr 16S și a fragmentului ITS	13
4.4 Textele de toxicitate pe șoareci.....	15
4.5 Spectrele MALDI-TOF MS.....	20
4.6 Amplificarea prin PCR cu amorse preluate din literatură.....	22
4.7 Migrarea produșilor de amplificare prin DGGE.....	23
4.8 Amplificarea prin PCR cu noile amorse	24
4.9 Identificarea cianobacteriilor toxice din lacuri și eleștee.....	25
4.10 Tulpina AICB 702.....	27
5. Concluzii.....	29
6. Mulțumiri	30
7. Bibliografie selectivă	32

1. Introducere

În multe părți din lume, apele de suprafață sunt utilizate ca sursă pentru apa potabilă, iar calitatea acestor ape este foarte variabilă. Cianobacteriile reprezintă o parte importantă a fitoplanctonului apelor de suprafață, speciile toxice fiind de asemenea frecvent întâlnite.

Toxinele cianobacteriilor (cianotoxinele) sunt rezistente la fierbere, au dimensiuni prea mici încât să poată fi reținute de filtre și pot de asemenea rezista tratamentelor convenționale. Importanța studiului cianotoxinelor în sursele de apă potabilă precum și în piscicultură a fost evidențiată de curând prin adoptarea unor „valori-prag” (Guideline Value) de către Organizația Mondială a Sănătății (World Health Organization - WHO), pentru microcistina LR și pentru cilindrospermopsine, acestea fiind cele mai frecvent întâlnite cianotoxine. Mai multe țări au adoptat aceste standarde, punând la punct metode de monitorizare a apelor precum și metode analitice de testare calitativă și cantitativă a cianotoxinelor.

Nevoia monitorizării atente a toxinelor cianobacteriene a fost evidențiată într-o serie de cazuri tragice, în care și-au pierdut viața un număr mare de oameni în urma intoxicării cu acești metaboliți. Există două aspecte ale toxicității cianobacteriilor, care necesită o atenție deosebită: posibilele efecte pe termen lung asupra populației expuse la cantități reduse de toxine, și expunerile intermitente la doze toxice mai mari.

Există 3 tipuri de cianotoxine: hepatotoxine, neurotoxine și dermatoxine. Hepatotoxinele cianobacteriene (microcistinele și nodularinele) sunt produse de un număr mare de specii, din patru ordine diferite: Chroococcales, Oscillatoriales, Stigonematales și Nostocales. Microcistinele sunt inhibitori ai protein-fozfatazelor 1 și 2A, afectând în special ficatul organismelor superioare, și conducând de cele mai multe ori la afecțiuni grave ale acestui organ, chiar la moarte (Carmichael, 1994, Carmichael, 1997, Pouria și colab., 1998). Expunerea subcronică la microcistine este asociată cu accelerarea dezvoltării tumorilor, toxinele având rol de co-factor în proliferarea țesuturilor canceroase (Ito și colab., 1997).

Toate acestea fac necesară identificarea înfloririlor toxice încă din stadiile inițiale, pentru evitarea efectelor nedorite ale acestora. Pentru aceasta s-au pus la punct și

dezvoltat o serie de metode de detecție și cuantificare a microcistinelor, care diferă atât în ceea ce privește procedura de lucru și aparatura necesară, cât și în ceea ce privește costul efectuării. Câteva dintre aceste metode sunt: injectarea intraperitoneală a șoarecilor de laborator, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight - Mass Spectrometry), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), identificarea microcistinelor prin tehnica Immuno Gold, sau teste de inhibiție a protein-fosfatazelor (PPIA – Protein Phosphatase Inhibition Assay). Acestea sunt mai mult sau mai puțin precise, costul reactivilor și al aparaturii fiind principalul impediment în testarea lor. Acesta a fost unul dintre motivele care au condus la încercarea evaluării potențialului toxic al tulpinilor cianobacteriene pe baza analizei cluster-ului genic responsabil de sinteza microcistinelor (Neilan și colab., 1999, Kaebernick și colab., 2000, Hisbergues și colab., 2003, Jungblut și Neilan, 2006).

În cadrul tezei de doctorat sunt redată într-o primă fază cunoștințele acumulate până în prezent în ceea ce privește speciile cianobacteriene cu potențial toxic, chimia și toxicitatea celor mai relevante cianotoxine, precum și posibilia markeri moleculari utilizabili pentru discriminarea rapidă și facilă a tulpinilor toxice de cele netoxice. În al doilea rând sunt prezentate rezultatele analizelor filogenetice efectuate cu 24 de tulpini cianobacteriene din genul *Microcystis* aparținând Colecției de Cianobacterii și Alge a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca. De asemenea sunt redată rezultatele analizei morfologice a tulpinilor prin microscopia optică și electronică, precum și a studiilor taxonomice bazate pe secvențele genomice repetate. În ultima parte sunt prezentate rezultatele studiului potențialului toxic al celor 24 de tulpini. Analizele efectuate au permis identificarea precisă atât a tulpinilor producătoare de microcistine, cât și a tipurilor de toxine care le conferă acestora potențialul toxic. Cel mai important rezultat al lucrării de față constă în posibilitatea identificării precise a cianobacteriilor toxice din probele prelevate direct din mediul natural, fapt care își poate găsi utilitatea în evitarea intoxicării oamenilor sau animalelor care intră în contact cu înfloririle cianobacteriene.

2. Obiectivele studiului

Obiectivele acestei teze de doctorat au fost:

- Studiul morfologic al celor 25 de tulpini de *Microcystis* din Colecția AICB (ICB Cluj)
- Analiza taxonomică și filogenetică pe baza secvențelor genomice repetate și a secvenței genei pentru ARNr 16S
- Evaluarea potențialului toxic al tulpinilor cianobacteriene studiate
- Propunerea unei metode pentru detecția precisă și rapidă a cianobacteriilor toxice din culturi și din mediu

3. Material și metode

3.1 Studii de taxonomie și filogenie

În lucrarea de față s-au utilizat 25 de tulpini cianobacteriene aparținând genului *Microcystis* din Colecția de Cianobacterii și Alge a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca: AICB 34, AICB 35, AICB 36, AICB 318, AICB 619, AICB 620, AICB 644, AICB 679, AICB 680, AICB 681, AICB 682, AICB 688, AICB 689, AICB 695, AICB 697, AICB 702, AICB 746, AICB 747, AICB 748, AICB 822, AICB 823, AICB 826, AICB 827, AICB 832 și AICB 833. Toate aceste tulpini sunt păstrate în eprubete cu mediu de creștere BG11 lichid (Dragoș și colab., 1997). Tulpinile au fost izolate la microscop, dintr-o singură colonie, cu ajutorul micromanipulatorului.

Analiza morfologică a tulpinilor de *Microcystis*

Studiile moleculare au fost precedate de o serie de analize morfologice, bazate pe observarea celulelor cianobacteriene la microscopul optic și electronic.

Pentru microscopia optică celulele au fost analizate cu un microscop inversat Nikon TE 2000 U. Fotografiele au fost obținute cu ajutorul unei camere foto digitale Nikon D 200, cu o rezoluție de 12 Mpixeli.

Pentru observarea detaliilor inaccesibile microscopului optic am utilizat microscopia electronică cu baleiaj (SEM – „Scanning Electron Microscopy”) și cu transmisie (TEM – „Transmission Electron Microscopy”). Microscoapele cu baleiaj permit analiza fină a suprafețelor la o rezoluție foarte mare, de câțiva nanometri. Pe de altă parte, microscoapele electronice cu transmisie permit observarea structurilor celulare, putând reda cu finețe aranjarea acestora, precum și relațiile dintre ele.

Extracția ADN

Materialul genetic cianobacterian a fost extras prin două metode: una clasică, implicând diverse soluții-tampon și una mai rapidă, bazată pe folosirea kit-urilor comerciale provenind de la diverse firme. Metoda clasică s-a bazat pe utilizarea fenolului, a cloroformului și a alcoolului izoamilic pentru purificarea ADN. În urma verificării spectrofotometrice a concentrației obținute, materialul genetic a fost diluat la 50 ng/μl.

Analiza secvențelor genomice repetate

Amplificarea secvențelor genomice repetate s-a efectuat cu ajutorul unui termocycler Beckman. Pentru a amplifica secvențele HIP1 au fost folosite amorse specifice, cu două nucleotide adăugate la capătul 3'-OH. Cu ajutorul programului LuciaNet 1.20 s-a putut măsura distanța la care au migrat fragmentele de ADN obținute în urma amplificării prin PCR, iar pe baza acestor măsurători s-a obținut o dendrogramă care a grupat tulpinile de *Microcystis sp.* în funcție de profilurile electroforetice. Dendrograma a fost construită cu ajutorul programului STATISTICA 6, folosind algoritmul UPGMA („Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”), care a grupat tulpinile în funcție de prezența sau absența benzilor electroforetice.

Studiile de filogenie moleculară

Acestea au constat în analiza bioinformatică a secvenței genei pentru ARNr 16S și a fragmentului intergenic ITS (Internal Transcribed Spacer) dintre genele pentru ARNr 16S și ARNr 23S. Fragmentele amplificate prin PCR au fost clonate în celule de *E. coli* cu ajutorul vectorului pGEM-T (Promega), coloniile cu plasmide recombinante fiind izolate prin selecția alb-albastră. Secvențarea fragmentelor a fost efectuată cu ajutorul unui secvențator Beckman CEQ 8800 Genetic Analysis System, la Institutul de Cercetări Experimentale Interdisciplinare din cadrul Universității Babeș-Bolyai. Calitatea secvențelor obținute a fost estimată pe baza analizei cromatogramelor aferente fiecărei secvențe, cu ajutorul soft-ului VectorNTI. Cu acest program, segmentele genice au fost concatenate, pentru a se obține secvența genelor întregi. Ulterior acestea au fost aliniat multiplu (soft MEGA4) pentru obținerea blocurilor de conservare pe baza cărora s-a construit arborele filogenetic. Acesta a fost obținut (soft MEGA4) folosind împreună secvențele genei pentru ARNr 16S de la tulpinile AICB și secvențe cianobacteriene preluate din baza de date NCBI. Ca și outgroup pentru arborele filogenetic s-a folosit o tulpină de *Escherichia coli*.

3.2 Studiul potențialului toxic

Injecția intraperitoneală a șoarecilor de laborator

În studiul de față injecția intraperitoneală a șoarecilor de laborator cu material cianobacterian a constituit un prim test pentru evaluarea potențialului hepatotoxic al tulpinilor de *Microcystis* din colecția AICB. Pentru aceasta, cele 24 de tulpini au fost

crescute în mediu de cultură BG11, sub agitare continuă. Materialul cianobacterian injectat șoarecilor a fost cuantificat prin metoda Lowry, prin diferitele concentrații analizate urmărindu-se obținerea unor drepte-etalon care să permită estimarea concentrației diverselor componente celulare pe baza măsurătorilor spectrofotometrice.

Dupa 5-8 ore de la injectare șoarecii care au murit în urma efectului microcistinelor au fost disecați pentru analiza ficatului și a rinichilor, ceilalți șoareci fiind sacrificați pentru efectuarea aceluiași analize. S-a urmărit aspectul general al organelor prelevate, culoarea acestora reprezentând un indiciu al efectului. De asemenea, organele au fost cântărite, masa acestora raportându-se în final la masa corpului animalelor înainte de a fi injectate.

Testul MALDI-TOF MS

Pentru efectuarea testului MALDI-TOF-MS au fost obținute o serie de culturi cianobacteriene similare celor necesare pentru injectarea intraperitoneală a șoarecilor de laborator. Materialul concentrat prin centrifugare a fost ulterior liofilizat timp de 48 de ore, la -60°C. Analiza MALDI-TOF-MS a probelor a fost efectuată la Universitatea Tehnică din Berlin, cu un aparat Shimadzu AXIMA Confidence. Ca matrice s-a utilizat un amestec de acid 2,5-dihidrobenzoic (75 mg / ml amestec de acetonitril:etanol:apă 1:1:1 acidifiat cu acid trifluoroacetic 1%).

Amplificarea prin PCR a unor regiuni genice implicate în toxicitate

Pentru evaluarea prin PCR a potențialului toxic al tulpinilor AICB am utilizat o serie de amorse preluate din literatura de specialitate (Neilan și colab., 1999; Kaebernick și colab., 2000; Jungblut și Neilan, 2006; Hisbergues și colab., 2003; Tillet și colab., 2001). Acestea sunt specifice pentru 5 din cele 10 gene cu rol în sinteza microcistinelor. În funcție de temperatura de aliniere a fiecăreia au fost folosite cicluri adecvate de temperatură, care în unele cazuri au fost modificate pentru obținerea de ampliconi în cantitate mai mare.

Analiza produșilor de amplificare prin DGGE, și secvențarea acestora

Scopul analizei prin DGGE a ampliconilor PCR a constat în încercarea de a identifica o legătură între profilurile DGGE și toxicitatea tulpinilor de *Microcystis*, atâta timp cât reacția PCR a generat benzi electroforetice atât la tulpinile toxice, cât și la unele netoxice. Pentru aceasta s-a utilizat perechea de amorse mcyDF2-mcyDR2, amorsei în

aval fiindu-i adăugat un fragment GC de 28 de nucleotide, la capătul 5'. Pentru gel a fost folosit un gradient 30%-70%, probele de ADN fiind migrate timp de 16 ore, la o intensitate de 100V. În final gelurile au fost colorate cu bromură de etidiu și fotografiate cu o cameră digitală Olympus C3040. Secvențarea fragmentelor a fost efectuată cu ajutorul unui secvențator Beckman CEQ 8800 Genetic Analysis System, la Institutul de Cercetări Experimentale Interdisciplinare al Universității Babeș-Bolyai.

Reacția PCR cu noile amorse

În funcție de secvență, fiecărei amorse i-a fost calculată temperatura de topire (T_m) și temperatura de aliniere (T_a). În final a fost conceput un program PCR cu care s-a încercat amplificarea unor fragmente de ADN specifice doar tulpinilor producătoare de microcistine. Produșii de amplificare obținuți au fost migrați în gel de agaroză 1%, colorați cu bromură de etidiu (5 mg/ml) și fotografiați în lumină UV cu o cameră foto Olympus C3040.

Identificarea cianobacteriilor producătoare de microcistine din probe prelevate din mediul natural

Pentru valorificarea amorselor oligonucleotidice obținute, este foarte importantă posibilitatea utilizării lor în identificarea cianobacteriilor producătoare de microcistine din mediul natural. Pentru aceasta, au fost prelevate o serie de probe din mai multe locații din județul Mureș, în patru dintre acestea fiind prezente specii de *Microcystis*. ADN genomic a fost supus amplificării prin PCR cu noile amorse, pentru verificarea prezenței unui fragment al genei *mcyD* din clusterul genic implicat în biosinteza microcistinelor. Pentru confirmarea rezultatelor obținute prin PCR, cele patru probe biologice au fost liofilizate și supuse analizei prin tehnica MALDI-TOF MS.

4. Rezultate și discuții

4.1 Identificarea fimbriilor prin microsopia electronică

Analiza tulpinilor la microscopul electronic cu baleiaj și cu transmisie a condus la observarea fimbriilor pe suprafața celulară. Colorația negativă a permis calculul grosimii acestora.

O primă observație este aceea că fimbriile nu se regăsesc cu preponderență la un anumit pol al celulei, ci acoperă celula cianobacteriană în egală măsură pe toată suprafața acesteia (fig. 2). La unele tulpini am observat prezența a două tipuri diferite de fimbrii (groase și subțiri) așa cum se întâlnesc și la *Synechocystis sp.* (Bhaya și colab., 2000). Grosimea fimbriilor subțiri este de 2-3 nm, în timp ce fimbriile groase par a fi foarte similare cu cele de tipul IV de la bacterii, având 6-10 nm în grosime (fig. 4). Însă spre deosebire de *Synechocystis sp.*, unde fimbriile au lungimea de max. 5 μm (Ranta și colab., 1983), la *Microcystis sp.* lungimea acestora depășește 20 μm (fig. 2).

În unele experimente s-a constatat că, uneori, fimbriile de tipul IV se atașează unele de altele și formează mănunchiuri caracteristice (Nakasugi și Neilan, 2005; Ranta și colab., 1984). În studiul de față am observat existența acestor mănunchiuri de fimbrii, însă nu la toate tulpinile (fig. 1). Chiar dacă fimbriile se atașează unele de celelalte, aceasta se întâmplă doar între fimbriile aceleiași celule, nu și între celule diferite. Chiar și așa, se poate presupune faptul că datorită numărului mare de fimbrii la unele tulpini, acestea au un rol și în stabilizarea coloniilor.

Observațiile la microscopul electronic cu transmisie indică faptul că unele tulpini au mult mai puține fimbrii decât altele. Mai mult, la unele tulpini fimbriile au fost observate cu dificultate, sau chiar de loc, în unele cazuri.

La microscopul electronic cu baleiaj au fost detectate unele structuri extracelulare care par să interconecteze celulele între ele (fig. 3), și care ar putea fi mănunchiuri de fimbrii și mucus. Aceste structuri par a fi diferite de cele în care este prezent doar mucus, însă ar putea de asemenea să fie artefacte.

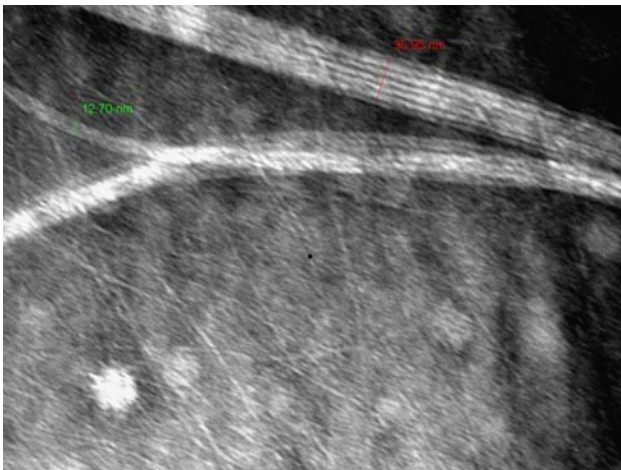


Fig. 1 *Microcystis sp.* AICB 695, TEM.

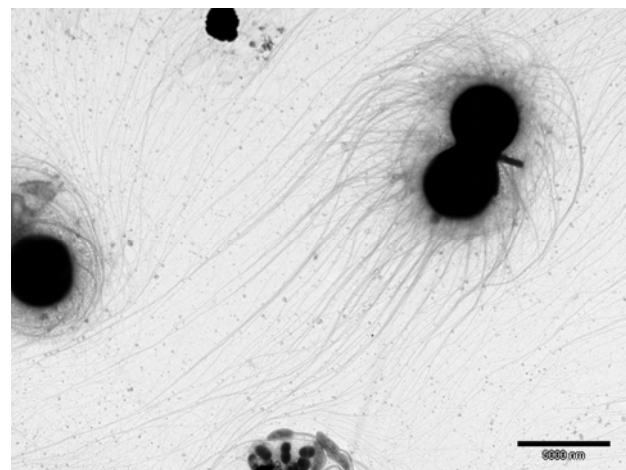


Fig. 2 *Microcystis sp.* AICB 754, TEM. Bara = 5 μm



Fig. 3 *Microcystis* sp AICB 318, SEM. Bara = 5 µm.

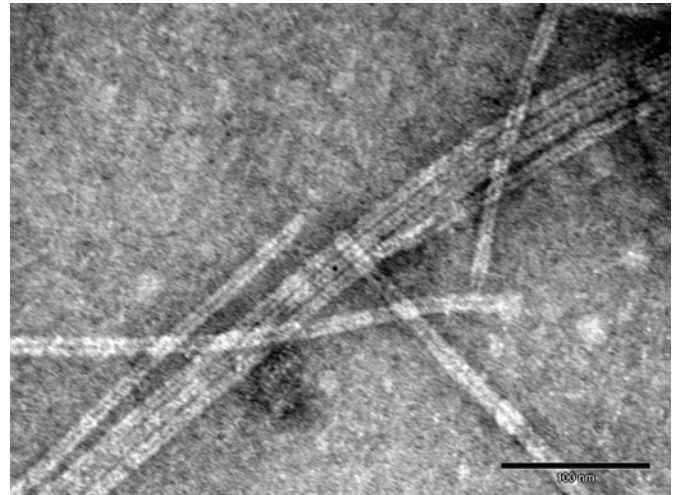


Fig. 4 *Microcystis* sp AICB 318, TEM. Bara = 100 nm

4.2 Analiza secvențelor genomice repetate

Studiul secvențelor repetate a fost realizat prin analiza profilurilor electroforetice obținute în urma amplificării prin PCR cu amorse specifice. Gelurile de electroforeză au fost fotografiate cu o cameră foto digitală Olympus C3040, iar lungimea fragmentelor obținute a fost măsurată în raport cu benzile marker-ului FastRuler Middle Range. Benzile profilurilor electroforetice obținute au fost clare, bine individualizate (fig. 5). Toate tulpinile au generat pe gel o bandă comună, de 630 pb. Tulpina AICB 689 are 4 benzi caracteristice, de 325 pb, 940 pb, 1142 pb și 1224 pb. Tulpina AICB 748 a generat o bandă de 325 pb, în timp ce tulpinile AICB 34, AICB 318 și AICB 689 au prezentat o bandă comună de 940 pb.

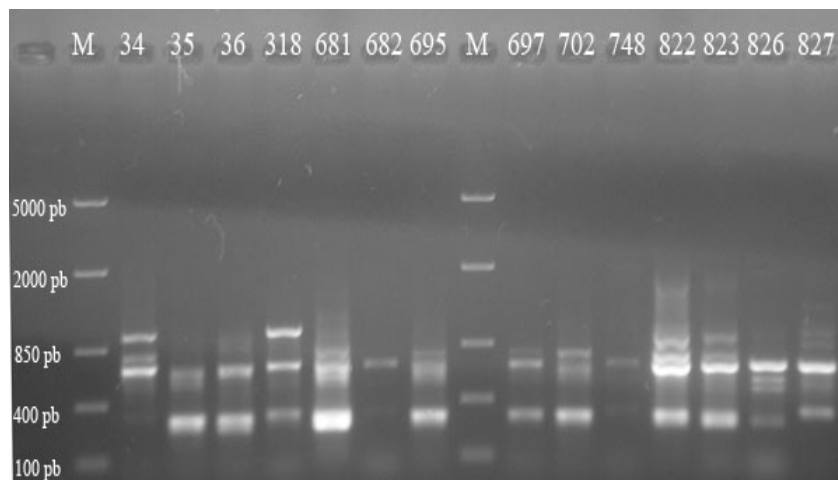


Fig. 5 Profilul electroforetic obținut în urma amplificării secvențelor genomice repetate de tip HIP cu amorsa HIP-AT, la 14 tulpini aparținând genului *Microcystis*. M = markerul FastRuler Middle Range

În urma măsurătorilor efectuate s-a obținut o dendrogramă, cu ajutorul algoritmului UPGMA (fig. 6). Astfel, prezența sau absența benzilor electroforetice a dus la o asociere a tulpinilor în grupuri, evidențiind similaritatea acestora. Dendrograma rezultată nu reflectă relațiile evolutive dintre tulpinile studiate, întrucât secvențele genomice repetate nu reprezintă markeri filogenetici. Ele au relevanță doar prin prezența sau absența lor, ceea ce nu se înseamnă că reflectă relațiile în timp dintre tulpini/specii.

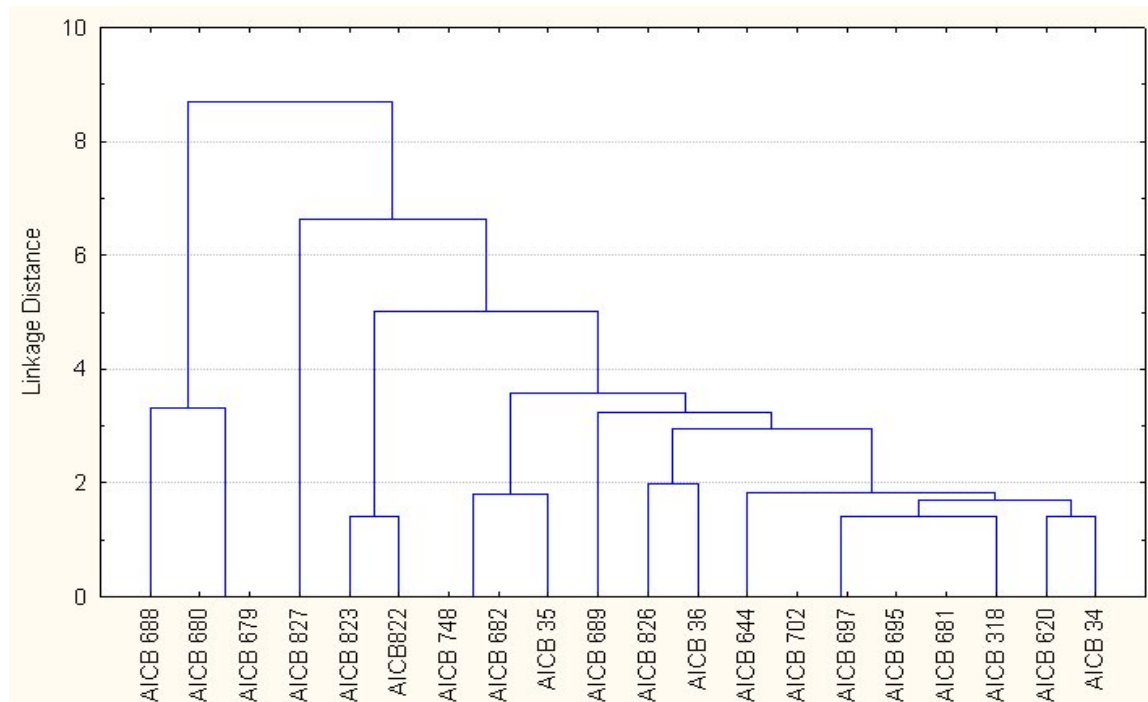


Fig. 6 Dendrogramă generată pe baza profilurilor electroforetice obținute în urma amplificării prin PCR a secvențelor genomice repetate cu amorsa HIP-AT. Scara exprimă similaritatea în unități relative.

Din dendrogramă se poate observa gruparea foarte strânsă a unor tulpini care au fost colectate din același habitat. Astfel, tulpinile AICB 679, AICB 680 și AICB 688 sunt grupate împreună, ele fiind prelevate în anul 2001 dintr-un lac în localitatea Zau de Câmpie, județul Mureș. De asemenea, Tulpinile AICB 822 și AICB 823 apar grupate împreună, fiind colectate în anul 2006 dintr-un lac în localitatea Geaca, județul Cluj. Pe de altă parte, dendrograma grupează și tulpini care au fost colectate din locuri diferite, în perioade diferite. Este cazul tulpinilor AICB 682 și AICB 748, colectate din localitățile Zau de Câmpie în anul 2001, respectiv Lacu, în anul 2003. Mai departe, cele două tulpini apar grupate cu AICB 35, colectată în localitatea Cătina, în anul 1980.

Prin această dendrogramă se confirmă o dată în plus capacitatea secvențelor genomice repetate de a diferenția tulpinile cianobacteriene, chiar și în cazul colectării acestora din același loc și în aceeași perioadă. Se evidențiază de asemenea faptul că secvențele repetate nu oferă informații privitoare la relațiile evolutive dintre tulpinile studiate, deoarece ele nu reprezintă un marker filogenetic. Astfel din dendrogramă se observă faptul că tulpinile AICB 34 și AICB 620 apar grupate împreună, la fel ca și tulpina AICB 702 care apare grupată împreună cu AICB 681, AICB 695 și AICB 697, iar din analiza filogenetică reiese că AICB 702, AICB 681 și AICB 695 aparțin speciei *Microcystis wesenbergii*, spre deosebire de AICB 697.

4.3 Analiza filogenetică pe baza genei pentru ARNr 16S și a fragmentului ITS

Amplificarea secvenței genei pentru ARNr 16S / ITS cu amorsele 27F și ITER a condus la obținerea unor fragmente de ADN cu mărimea de aproximativ 2000 pb (fig. 7).

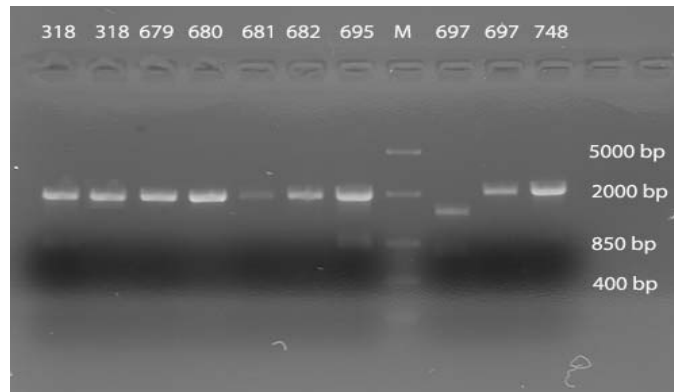


Fig. 7 Electroforegrama rezultată în urma amplificării prin PCR cu amorse specifice a genei pentru ARNr 16S / ITS la 8 tulpini de *Microcystis* sp. M = markerul FastRuler Middle Range.

Până în prezent au fost secvențate genele pentru ARNr 16S / ITS de la 18 tulpini din Colecția de Cianobacterii și Alge a Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca: AICB 34, AICB 35, AICB 36, AICB 318, AICB 618, AICB 619, AICB 620, AICB 644, AICB 680, AICB 681, AICB 682, AICB 688, AICB 689, AICB 695, AICB 697, AICB 748, AICB 822 și AICB 826. Secvențele obținute în urma amplificării cu amorse interne au fost asamblate cu ajutorul programului Vector NTI. Lungimea secvențelor obținute cu diferitele amorse a variat între 335 și 857 pb, în cazul tulpinii AICB 619 amplificată cu amorsa HR. Inițial am asamblat un număr mare de secvențe obținute cu diverse amorse. Ulterior am redus numărul amorselor folosite pentru a obține

întreaga secvență a genei pentru ARNr 16S. Uneori fragmentele care au o regiune comună nu se asamblează decât în prezența altei secvențe intermediare. Aceasta se datorează faptului ca programul VectorNTI asamblează secvențele doar dacă există o regiune comună de cel puțin 20 de nucleotide.

În unele cazuri (tulpinile AICB 697 și AICB 822), s-a reușit secvențierea întregii gene pentru ARNr 16S cu doar 3 amorse: HR, FR și CZA 784R (fig. 8). Acest fapt este important prin prisma costului reactivilor necesari secvențării, deoarece până de curând aceasta se realiza amplificând gena cu 5 amorse.

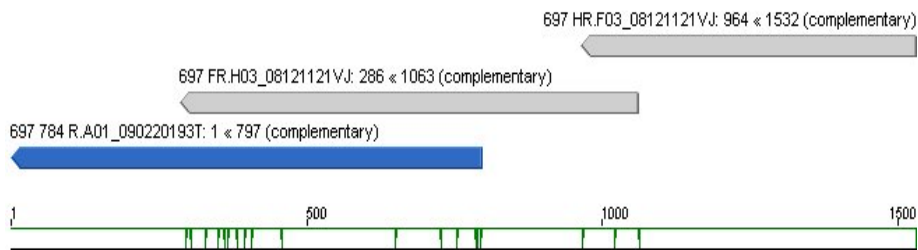


Fig. 8 Secvența genei pentru ARNr 16S de la tulpina AICB 697, având 1532 pb, obținută după asamblarea fragmentelor obținute prin amplificarea ADN cu amorsele HR, FR și CYA 784R (program ContigExpress – VectorNTI).

Alinierea multiplă a secvențelor rezultate a fost efectuată în programul MEGA4. La aliniere s-au utilizat secvențe preluate din baza de date GeneBank: 5 tulpini de *Microcystis* sp. (*M. wesenbergii*, *M. ichtioblabe*, *M. viridis*, *M. aeruginosa* și *M. novacekii*), o tulpină de *Synechocystis* sp., 2 tulpini de *Arthrospira* sp., 3 tulpini de *Anabaena* sp., 2 tulpini de *Oscillatoria* sp., și 2 tulpini de *Nodularia* sp.. Ca și outgroup a fost folosită secvența genei pentru ARNr 16S de la o tulpină de *Escherichia coli*. Arborele filogenetic a fost obținut în programul MEGA4, folosind metoda „Minimum Evolution” (fig. 9).

Arbore filogenetic arată faptul că toate cele 18 tulpini cianobacteriene studiate aparțin genului *Microcystis*. Acestea formează un grup distinct față de restul cianobacteriilor, având o valoare bootstrap de 93. Similaritatea de secvență face dificilă validarea apartenenței tulpinilor la o anumită specie. Totuși, se poate spune că tulpina

AICB 702 aparține speciei *Microcystis wesenbergii*, grupându-se cu o tulpină a acestei specii.

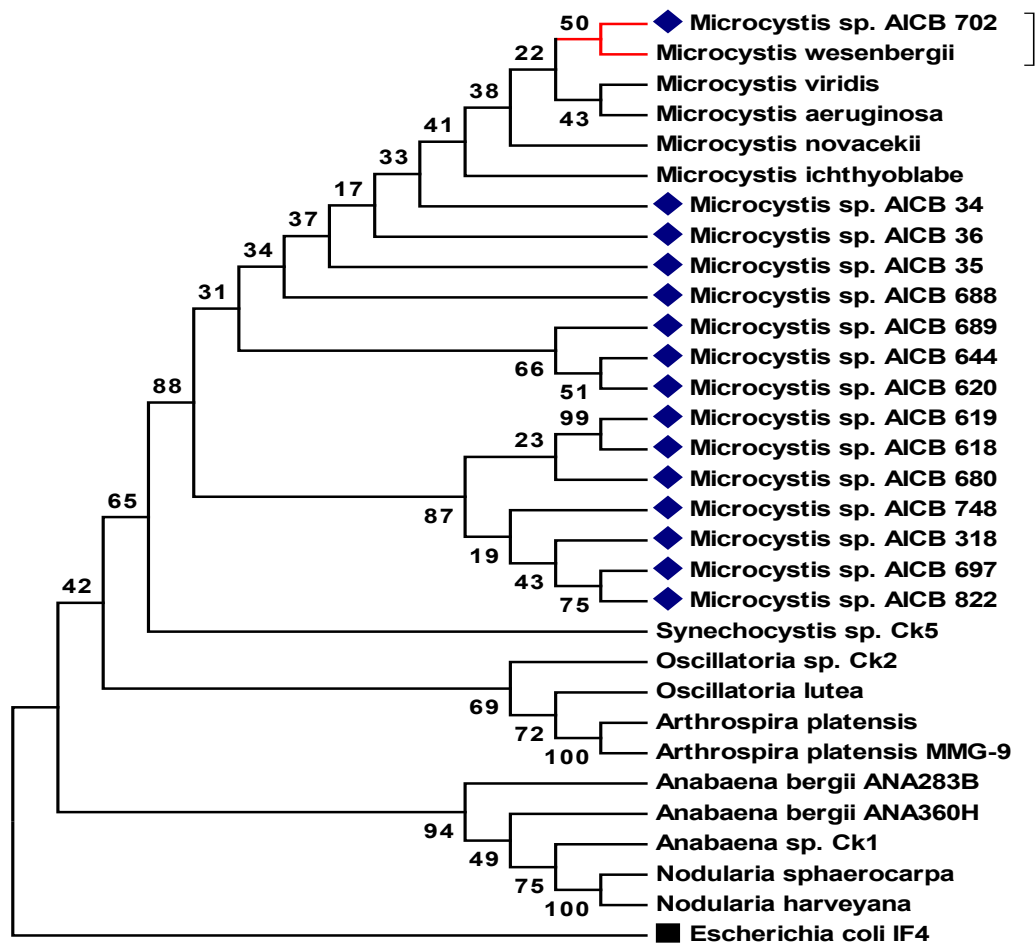


Fig. 9 Arborele filogenetic obținut pe baza secvențelor pentru ARNr 16S / ITS, prin metoda „Minimum Evolution”. Numerele de pe ramuri indică valorile bootstrap, în 100 de replicare. Cu albastru sunt marcate tulpinile provenite din colecția AICB.

Tulpinile de *Synechocystis* sp., *Arthrospira* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., și *Nodularia* sp.s-au grupat separat, dovadă a faptului că arborele filogenetic este veridic și exprimă cu suficientă și acuratețe relațiile filogenetice dintre taxonii analizați.

4.4 Textele de toxicitate pe șoareci

Pe baza concentrației carotenilor și a clorofilei a din cele 5 diluții ale materialului cianobacterian au fost trasate două drepte etalon (fig. 10,11). Ecuațiile de gradul 2 aferente acestora permit estimarea concentrației acestor constituenți celulari pe baza măsurării extincției materialului biologic la 600 nm. Măsurarea extincției la câte 3

variante ale fiecărei diluții a permis calculul deviației standard în cazul fiecărei probe, parametru reprezentat de asemenea pe grafice. În cazul carotenilor și a clorofilei a valoarea parametrului R^2 a fost mai mare de 0,99, certificând verosimilitatea rezultatelor obținute. În cazul proteinelor, valorile concentrațiilor obținute prin metoda Lowry nu au permis obținerea unor rezultate similare, R^2 având valoarea de 0,93, și din acest motiv singurii parametri luați în considerare au fost carotenii și clorofila a.

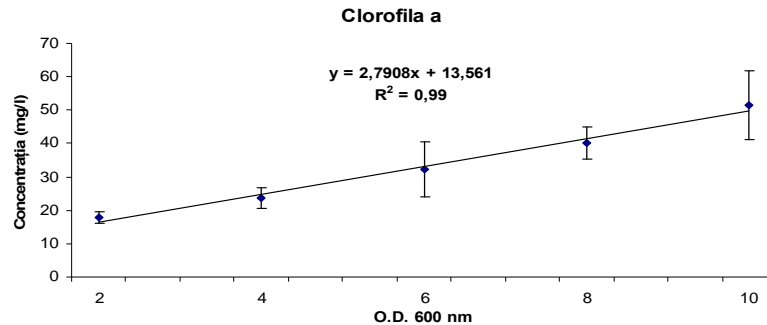


Fig. 10 Dreapta etalon obținută pe baza concentrației clorofilei a din 5 diluții diferite de suspensie cianobacteriană

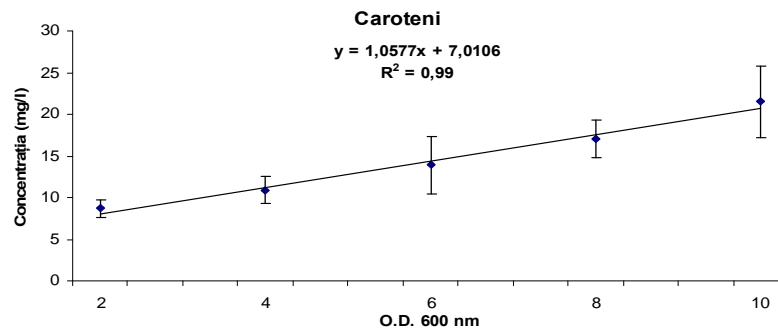


Fig. 11 Dreapta etalon obținută pe baza concentrației carotenilor din 5 diluții diferite de suspensie cianobacteriană

Injecția intraperitoneală a șoarecilor de laborator cu material cianobacterian concentrat prin centrifugare a condus la moartea animalelor injectate cu 5 din cele 24 de tulpini de *Microcystis*. Cele 5 tulpini sunt: AICB 318, AICB 682, AICB 689, AICB 697 și AICB 702. Moartea a survenit după 5-8 ore de la injectare. Șoarecii morți au fost disecați și li s-au prelevat ficatul și rinichii. Șoarecii neafecțați de injecție au fost sacrificați pentru prelevarea organelor. În ambele cazuri, acestea au fost cântărite cu o balanță analitică, iar masa lor s-a raportat la masa corpului fiecărui șoarece înainte de injecție.

Aspectul ficatului șoarecilor uciși de acțiunea microcistinilor (fig. 12) a fost în mod evident diferit de acela al organelor sănătoase (fig. 13).



Fig. 12 Ficatul a doi șoareci afectați de microcistine, după injectare cu suspensie cianobacteriană aparținând tulpinilor AICB 697 și AICB 702

Culoarea organelor afectate de toxine a fost de un roșu-închis, prezentând pe alocuri unele umflături incolore. De asemenea, masa ficatului raportată la masa corpului este cu până la 15% mai mare decât în cazul organelor sănătoase. Aceste modificări ale ficatului se datorează modului de acțiune al microcistinelor, care conduc la apariția de spații între hepatocite, spații care în cele din urmă sunt umplute cu sânge. Toate acestea au ca finalitate încetarea funcțiilor hepatice, și în final moartea animalelor.

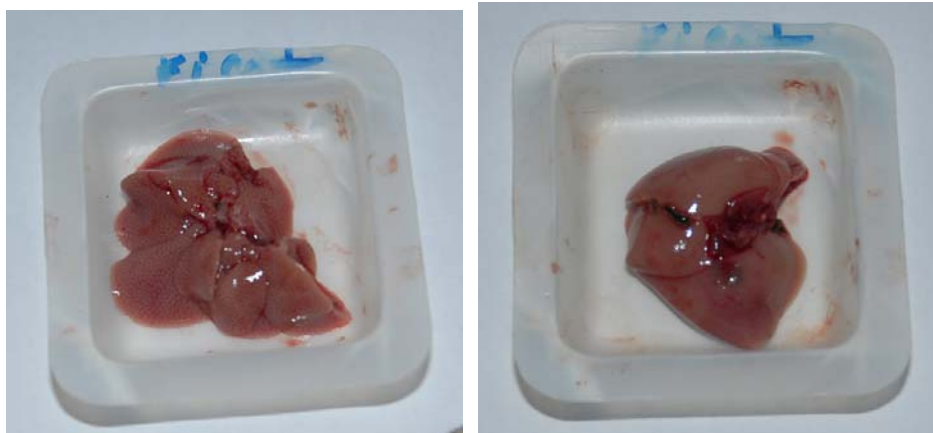


Fig. 13 Ficatul a doi șoareci de laborator injectați cu cianobacterii aparținând tulpinilor netoxice AICB 696 și AICB 823

Ficatul neafectat de microcistine a avut culoare normală, și nu a prezentat la suprafață acele umflături întâlnite pe organele afectate. De asemenea, rinichii șoarecilor nu au fost afectați în vreun fel de prezența microcistinelor. Culoarea acestora este roz, asemănătoare cu cea a rinichiului sănătos. Nu am observat diferențe relevante nici în ceea

ce privește masa rinichilor prelevați de la șoarecii morți în urma efectului microcistinelor comparativ cu rinichii proveniți de la animalele neafectate de injecția intraperitoneală cu cianobacterii.

Au fost analizate organele șoarecilor și de la lotul martor, pentru a se face o comparație între acestea și cele ale animalelor injectate cu cianobacterii. Aspectul general al acestora este identic cu cel al organelor prelevate de la șoarecii injectați cu cianobacterii netoxice.

Datele obținute au fost folosite pentru generarea unor grafice care să reflecte diferențele dintre organele șoarecilor afectați de microcistine și a celor neafecțați (fig. 14, 15). Re remarcă raportul masei ficatului la masa corpului, în cazul șoarecilor morți din cauza microcistinelor acest raport fiind clar diferit comparativ cu cel din cazul șoarecilor neafecțați de toxine.

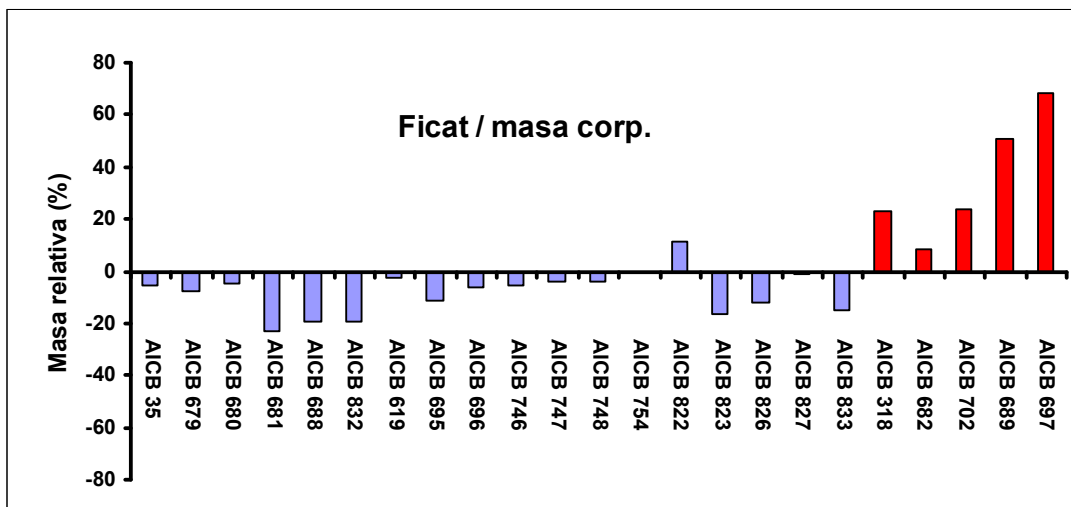


Fig. 14 Reprezentare grafică a diferențelor între masa relativă a ficatului afectat de microcistine (roșu) și cea a organelor neafectate (albastru) raportată la masa corpului. Între cele două loturi se observă diferențe notabile, masa relativă a ficatului fiind mai mare în cazul șoarecilor injectați cu cianobacterii toxice

În cazul rinichilor nu sunt diferențe care să delimiteze clar eșantionul șoarecilor afectați de microcistine de cel al șoarecilor neafecțați (fig. 53).

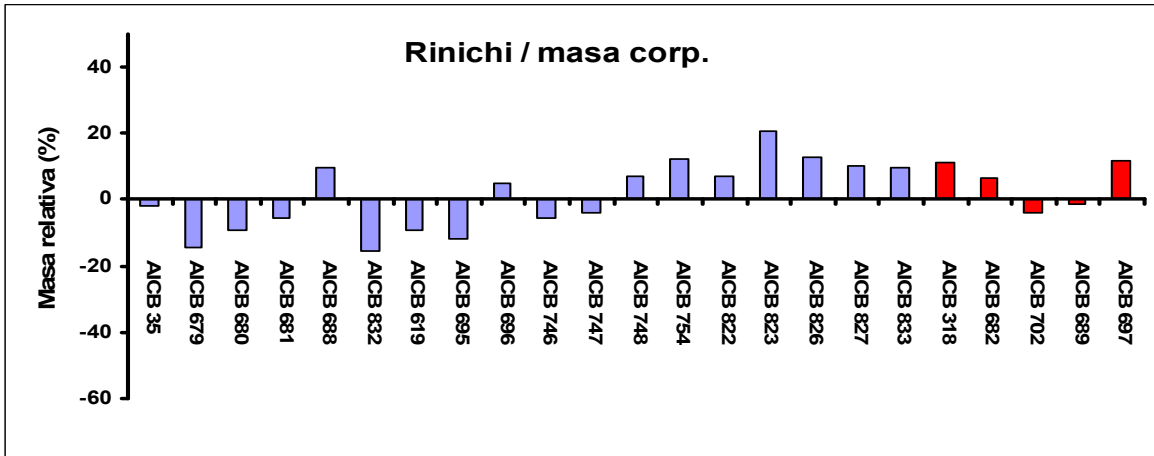


Fig. 15 Reprezentarea grafică a masei rinichilor șoarecilor afectați de microcistine (roșu) și a celor neafectați (albastru) raportată la masa corpului. Nu se remarcă diferențecclare între cele două loturi

Rezultatele obținute sunt și mai bine reprezentate într-un grafic care redă diferențele între lotul șoarecilor afectați de toxine și a celor neafectați. Se remarcă din nou faptul că ficatul este principalul organ afectat de microcistine (fig. 16). Rezultatul este statistic semnificativ în cazul ficatului, parametrul P calculat prin testul Student (Testul T) având valoarea de 0,015, în condițiile în care valoarea maximă acceptată este de 0,05. În schimb, în cazul rinichilor, valoarea parametrului P este de 0.38, demonstrându-se lipsa afectării acestor organe de către tulpinile toxice de *Microcystis*.

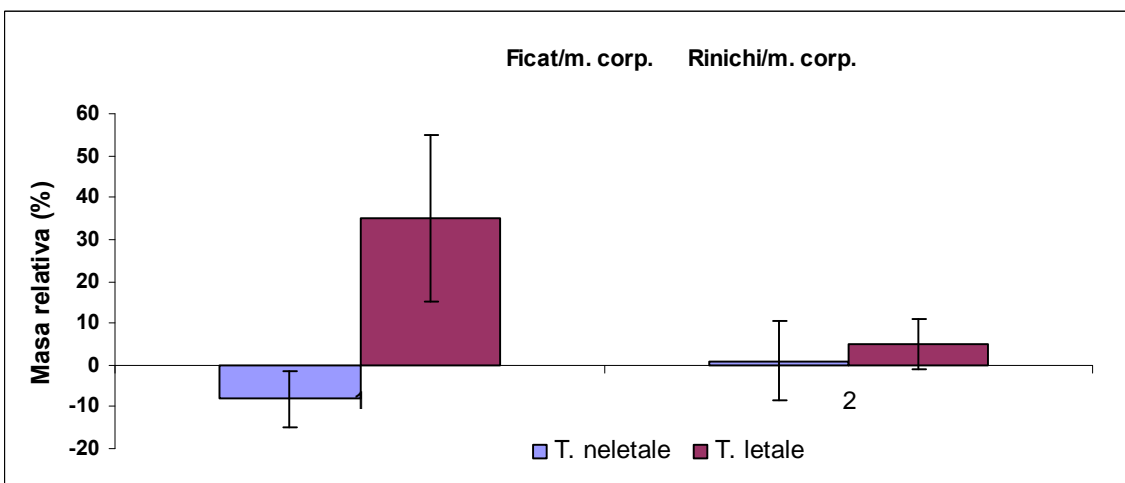


Fig. 16 Diferența între masa ficatului și a rinichilor șoarecilor grupați în două eșantioane (afectați/neafectați de microcistine) raportată la masa corpului

Rezultatele acestui test confirmă faptul că injectarea intraperitoneală a șoarecilor de laborator cu cianobacterii reprezintă o bună cale de a identifica potențialul toxic al

probelor analizate. Aspectul ficatului indică fără dubii efectul hepatotoxic al microcistinelor, înlăturând în mare măsură posibilitatea ca moartea animalelor să fi survenit din alte cauze decât cele datorate acestor toxine. Aceste rezultate au fost confirmate și de cel de-al doilea test de injecție a șoarecilor, pe câte 5 animale.

Acumularea sângelui în ficatul afectat este relevantă de masa acestor organe raportată la masa corpului. Astfel, în cazul șoarecilor din lotul martor și a celor neafecți de injecția cu cianobacterii, ficatul reprezintă aproximativ 5-6% din masa corpului, pe când în cazul animalelor moarte ca urmare a efectului microcistinelor masa ficatului reprezintă între 7,3 și 12,58% din masa corpului.

4.5 Spectrele MALDI-TOF MS

Analiza probelor cianobacteriene liofilizate a evidențiat prezența microcistinelor la 5 din cele 24 de tulpini de *Microcystis* analizate. Acestea sunt aceleași cu cele care s-au dovedit a fi toxice în urma injectării intraperitoneale a șoarecilor de laborator (AICB 318, AICB 682, AICB 689, AICB 697 și AICB 702). Au fost semnalate două tipuri de microcistine: MC-LR, la tulpinile AICB 682, AICB 689, AICB 697 și MC-RR, la tulpinile AICB 318 și AICB 702 (fig. 17-19).

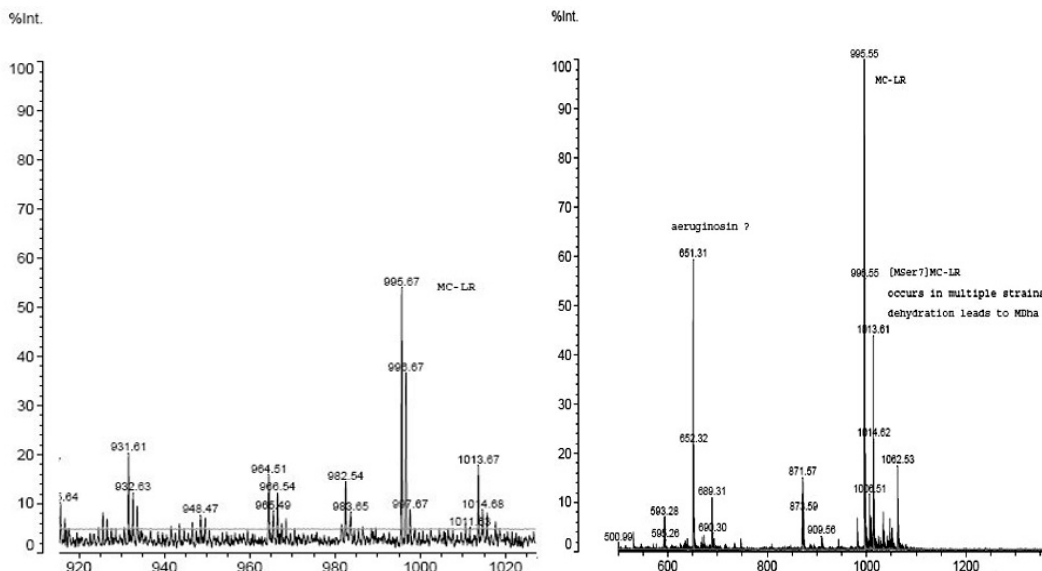


Fig. 17 Spectrele MALDI-TOF-MS obținute în urma analizei materialului cianobacterian liofilizat aparținând tulpinilor AICB 682 și AICB 689

Microcistina MC-LR se întâlnește în zona 995 m/z, în timp ce microcistina MC-RR se generează un răspuns în zona 1038 m/z.

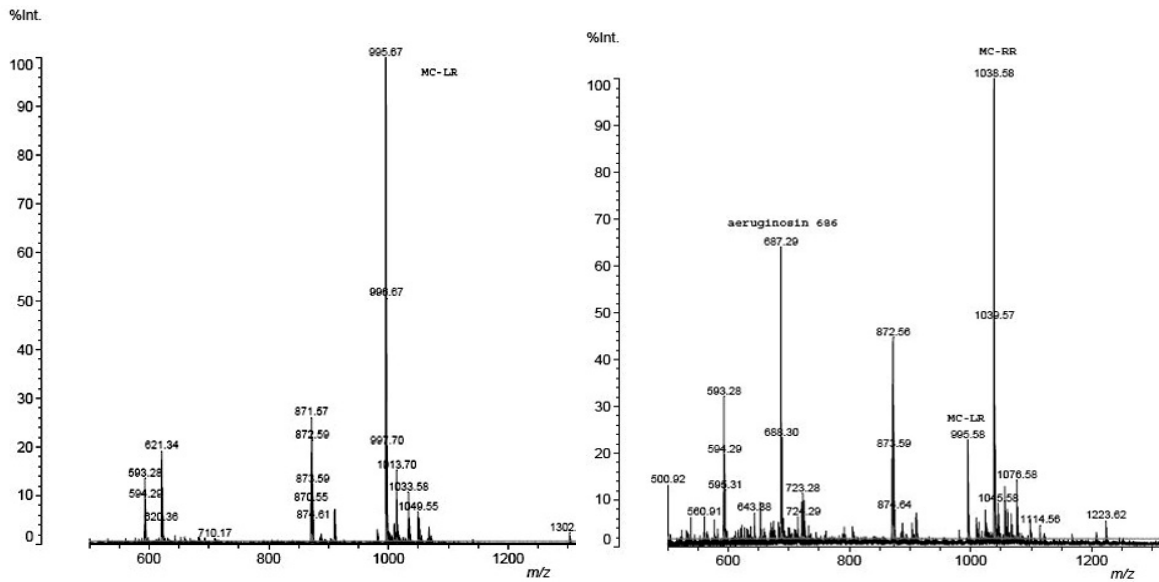


Fig. 18 Spectrele MALDI-TOF-MS obținute în urma analizei materialului cianobacterian liofilizat aparținând tulpinilor AICB 697 și AICB 318

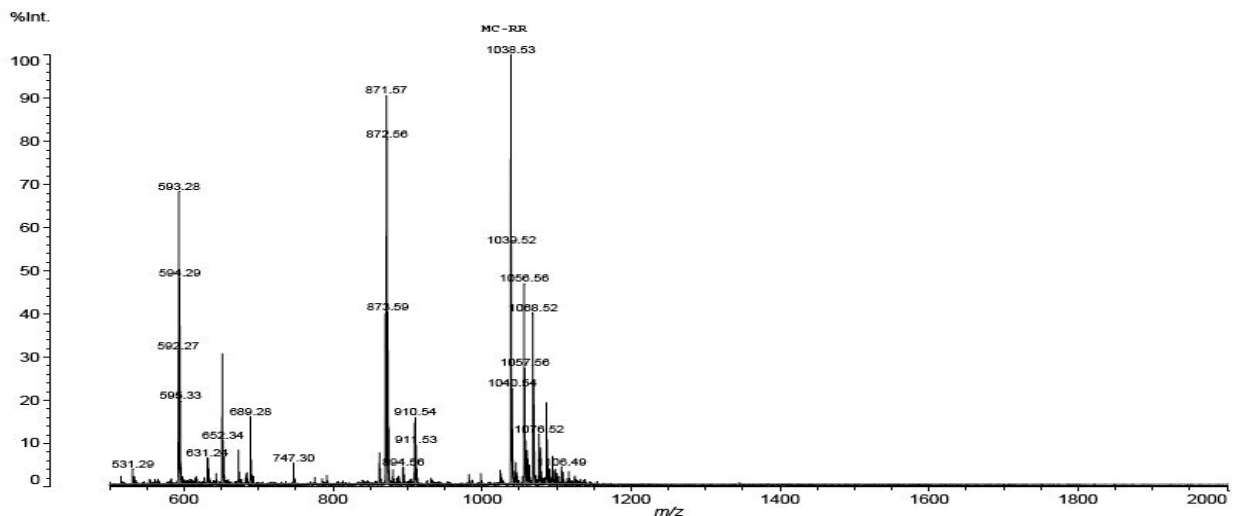


Fig. 19 Spectrul MALDI-TOF-MS obținut în urma analizei materialului cianobacterian liofilizat aparținând tulpinii AICB 702

Analiza tulpinilor de *Microcystis* din Colecția AICB a confirmat rezultatele testelor de injectare intraperitoneală a șoarecilor de laborator cu aceste cianobacterii.

4.6 Amplificarea prin PCR cu amorse preluate din literatură

Amplificarea unor fragmente de ADN implicate în potențialul toxic cu amorse preluate din literatura de specialitate a condus la obținerea unor produși de amplificare mai mult sau mai puțin specifici și repetabili. Perechile de amorse mcyA-Cd 1F - mcyA-Cd 1R și FAA – RAA nu au generat benzi clare, în timp ce perechea TOX2+ - TOX2- a generat profiluri electroforetice supraîncărcate, cu benzi multiple. Perechile de amorse care au permis generarea celor mai clare benzi electroforetice pentru tulpinile AICB sunt mcyDF2-mcyDR2 și HEPF-HEPR (fig. 20). Profilurile electroforetice generate de acestea au fost similare în ceea ce privește prezența sau absența benzilor, singura diferență constând în lungimea fragmentelor amplificate.

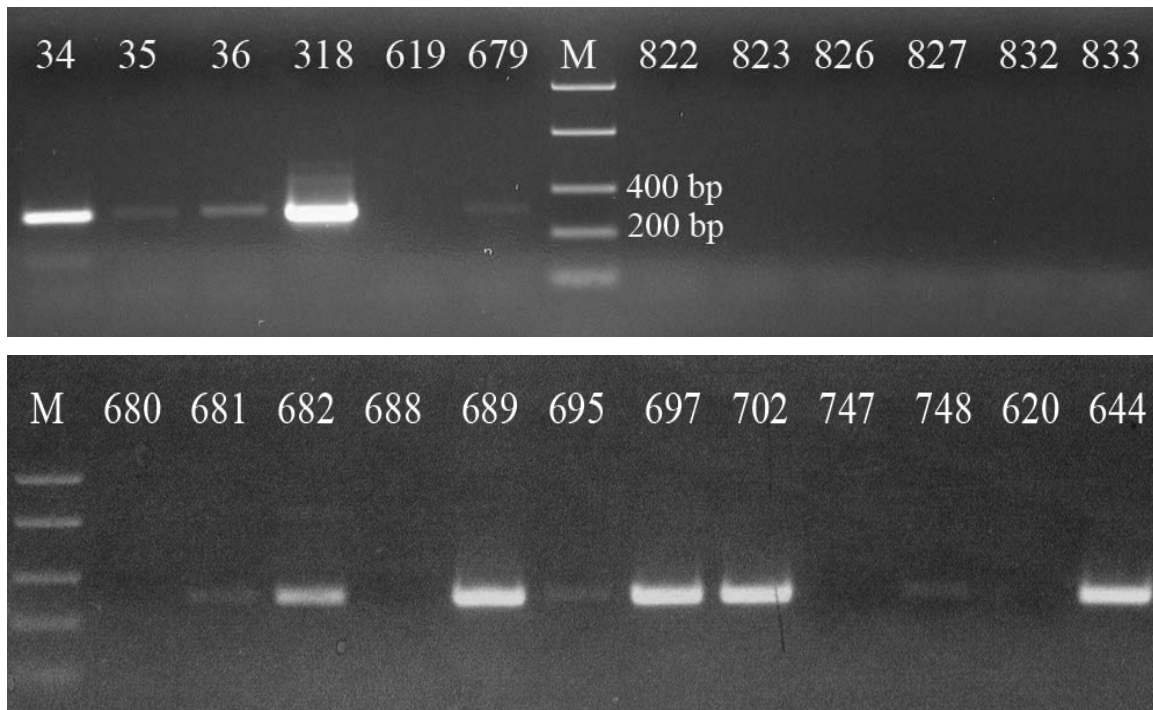


Fig. 20 Electroforegrame prezentând produșii de amplificare rezultați în urma reacției PCR a ADN cianobacterian cu perechea de amorse mcyDF2-mcyDR2.

Cele mai intense benzi electroforetice au fost generate cu ADN din tulpinile AICB 34, AICB 318, AICB 682, AICB 689, AICB 697, AICB 702 și AICB 644. Dintre acestea, tulpina AICB 644 nu a putut fi analizată din cauza faptului că nu se mai regăsește printre tulpinile Colecției AICB.

Se remarcă faptul că între cele 6 tulpini rămase (tulpina AICB 644 fiind pierdută din Colecția AICB) care au generat ampliconi intensi în electroforegramă se regăsesc toate cele 5 tulpini cu potențial toxic (AICB 318, AICB 682, AICB 689, AICB 697 și AICB 702). Totuși, se observă existența unei benzi foarte intense în dreptul tulpinii AICB 34, ceea ce ar însemna că aceasta este producătoare de microcistine, deși testele de injectare intraperitoneală și MALDI-TOF-MS au infirmat acest lucru. De asemenea, existența unor benzi slabe în dreptul altor tulpini (AICB 35, AICB 36, AICB 681 sau AICB 748) a ridicat unele semne de întrebare cu privire la specificitatea acestor amorse pentru tulpinile cu potențial toxic. Acesta a reprezentat motivul pentru care am încercat în primă fază diferențierea prin DGGE a ampliconilor PCR, în încercarea de a depista o legătură între poziția ampliconilor în gel și potențialul toxic al tulpinilor de *Microcystis*.

4.7 Migrarea produșilor de amplificare prin DGGE

Prin DGGE ampliconii rezultați în urma amplificării cu amorsele mcyDF2-mcyDR2 au fost separați, oprindu-se în gel în anumite regiuni, în funcție de cantitatea de GC a fiecăruia (fig. 21).

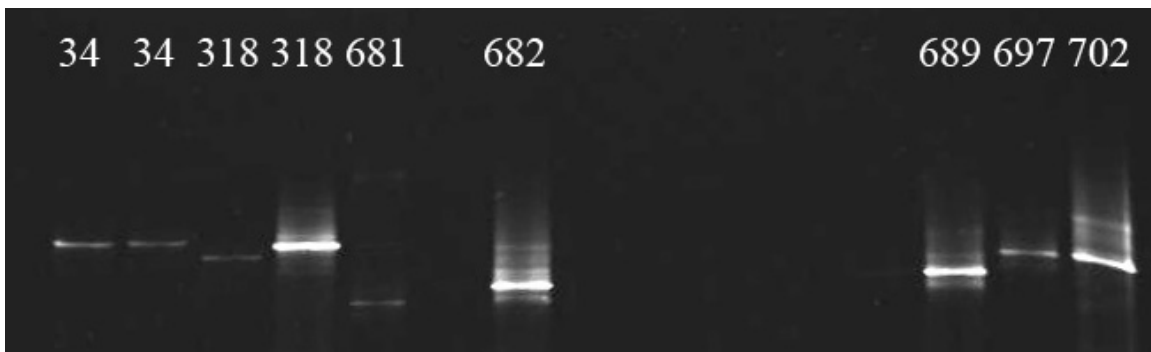


Fig. 21 Electroforegrama rezultată în urma migrării prin DGGE a ampliconilor rezultați în urma reacției PCR a ADN cianobacterian cu amorsele mcyDF2-mcyDR2

Din electroforegrama rezultată nu s-a putut face o distincție concretă între tulpinile netoxice (AICB 34 și AICB 681) și cele toxice. Distanța până la care au migrat ampliconii nu a permis observarea unei corelații între poziția acestora și caracterul toxic/netoxic al tulpinilor.

4.8 Amplificarea prin PCR cu noile amorse

Noile amorse obținute cu ajutorul soft-ului PerlPrimer (tab. 1) au fost combinate astfel încât materialul genetic provenit de la fiecare tulpină a fost amplificat cu ambele perechi posibile (MCYD-F1 – MCYD-R1 și MCYD-F1 – MCYD-R2).

Tab. 1

Cele 3 noi amorse obținute pentru amprentarea tulpinilor cu potențial toxic

Genă	Amorsa	Secvența amorsei
<i>mcyD</i>	MCYD-F1	5' TCA ATA TCG AGA ACT ATC CC 3'
<i>mcyD</i>	MCYD-R1	5' AGC AAC GGC AAA GTT TAG 3'
<i>mcyD</i>	MCYD-R2	5' CAG CAA CGG CAA AGT TTA 3'

Migrarea produșilor PCR în gel de agaroză a relevat existența benzilor electroforetice la toate cele 5 tulpini toxice. Acestea însă nu au fost prezente în cazul tulpinilor netoxice AICB 34 și AICB 681 (fig. 22), cum s-a întâmplat în urma amplificării cu amorsele preluate din literatură (fig. 20).

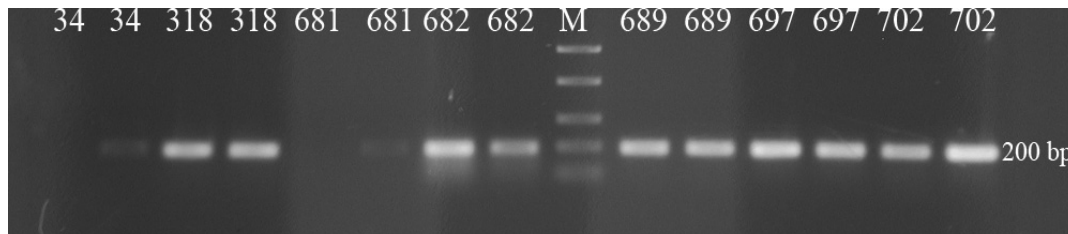


Fig. 22 Ampliconii rezultați în urma amplificării unui fragment al genei *mcyD* cu noile amorse. ADN provenit de la fiecare tulpină a fost amplificat cu ambele perechi de amorse: F1-R1 și F1-R2.

Din electroforegramă se remarcă mărimea produșilor de amplificare rezultați, de aproximativ 200 pb. În cazul tulpinilor AICB 34 și AICB 681 se observă o bandă electroforetică difuză, de asemenea de cca. 200 pb, obținută prin amplificarea cu perechea de amorse MCYD-F1 – MCYD-R2. În schimb, nu s-a obținut nici un amplicon în urma reacției PCR cu perechea de amorse MCYD-F1 – MCYD-R1. Astfel, această pereche de amorse s-a dovedit a fi cea mai potrivită pentru amprentarea tulpinilor producătoare de microcistine din genul *Microcystis*.

4.9 Identificarea cianobacteriilor toxice din lacuri și eleștee

Reacția de amplificare prin PCR a unui fragment aparținând genei *mcyD* din ADN genomic provenind din probele prelevate din mediul natural cu ajutorul perechii de amorse MCYD-F1 - MCYD-R1 a generat produși de amplificare în fiecare din cele patru cazuri (fig. 23).

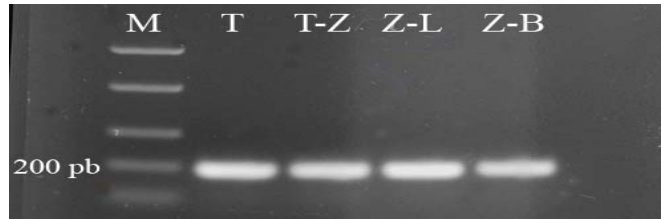


Fig. 23 Electroforegramă redând amplificarea prin PCR a unui fragment de cca. 200 pb din probe cianobacteriene prelevate din mediul natural. M=marker; T=Tăureni; T-Z=Tăul Zaului; Z-L=Zau de Câmpie, lac; Z-B=Zau de Câmpie, bazin piscicol.

La fel ca și în cazul amplificării ADN provenit din tulpinile toxice din Colecția AICB (fig. 22), reacția PCR a generat ampliconi de aprox. 200 pb, ceea ce teoretic înseamnă că toate cele patru probe prelevate conțin cianobacterii toxice, producătoare de microcistine.

Pentru confirmarea toxicității cele 4 probe au fost analizate prin tehnica MALDI-TOF MS, rezultatele fiind redată în figura 24.

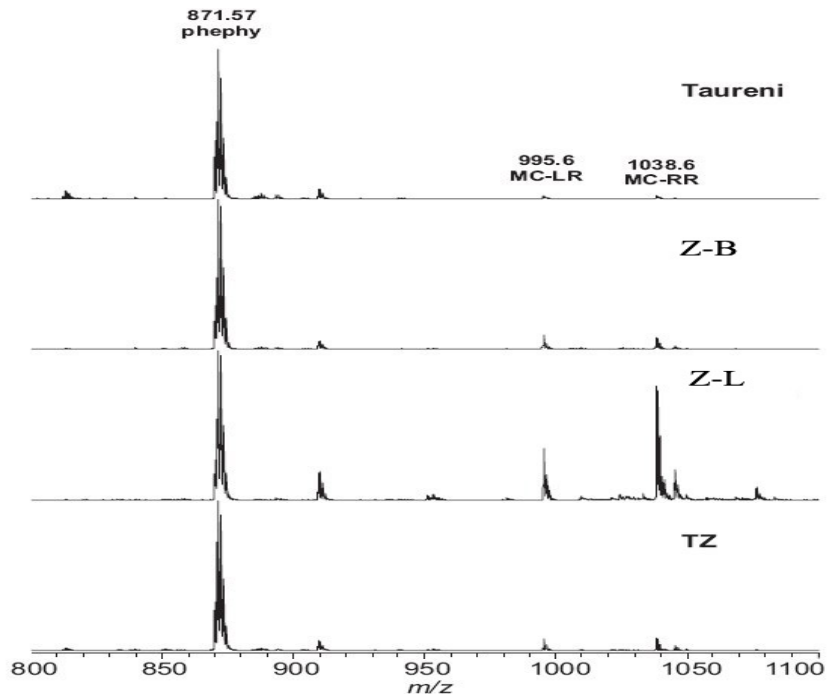


Fig. 24 Spectrele MALDI-TOF MS obținute în urma analizei materialului cianobacterian provenit din patru locații diferite: Tăureni, T-Z=Tăul Zaului; Z-L=Zau de Câmpie, lac; Z-B=Zau de Câmpie, bazin piscicol.

Toate cele patru spectre MALDI-TOF MS certifică prezența microcistinelor în probele prelevate din mediul natural. În dreptul raportului $m/z = 995.6$ se regăsește microcistina-LR, iar pentru valoarea 1038.6 corespunde microcistina-RR. Conform acestor spectre, probele de la Tăureni, Tăul Zaului și din bazinul piscicol de la Zau de Câmpie conțin o cantitate mică de microcistine, spre deosebire de cantitatea mult mai mare a acestora din apa lacului de la Zau de Câmpie. Pentru o exprimare mai precisă a prezenței microcistinelor în apă s-a calculat procentul acestora raportat la cantitatea feofitinei-a (tab. 2). Aceasta este o variantă a clorofilei-a, are un raport $m/z = 871.6$, iar cantitatea sa reprezintă o constantă în toate probele analizate.

Tab. 2

Cantitatea de microcistine raportată la conținutul în feofitină-a în cazul celor 4 probe prelevate din natură

	Tăureni		Zau de C. - bazin		Zau de C. - lac		Tăul Zaului	
	m/z	MC%/Feo	m/z	MC%/Feo	m/z	MC%/Feo	m/z	MC%/Feo
Feofitină-a	871,57		871,57		871,57		871,57	
MC-LR	995,65	8,46	995,56	2,46	995,66	37,88	995,65	6,11
MC-RR	1038,66	7,35	1038,56	2,55	1038,67	74,94	1038,69	6,34

Din tabel reiese aceeași concluzie ca și după observarea spectrelor, și anume că doar în cazul probei cianobacteriene din lacul de la Zau de Câmpie se poate vorbi despre o cantitate notabilă de microcistine. În ceea ce privește cantitatea de microcistină RR, aceasta este comparabilă cu cea de feofitină, ajungând aproape la 75% din aceasta.

În cazul celorlalte trei locații procentul de microcistine este mult mai mic. Cu toate acestea, cantitatea mică de microcistine este suficientă pentru a provoca moartea peștilor din apele respective (fig 25). Analizele MALDI-TOF MS au arătat faptul că singurii compuși cu potențial toxic prezenți în aceste locații sunt microcistinele-LR și RR.



Fig. 25 Înflorire cianobacteriană toxică în lacul Tăureni. Toxicitatea este evidențiată de peștii morți.

4.10 Tulpina AICB 702

Poate cea mai interesantă tulpină din colecția AICB din punct de vedere al toxicității este AICB 702, care conform spectrului MALDI-TOF-MS conține o cantitate apreciabilă de microcistină MC-RR (fig. 19). Conform analizelor filogenetice pe baza secvenței genice pentru ARNr 16S și a fragmentului ITS efectuate anterior (fig. 9), această tulpină aparține speciei *Microcystis wesenbergii*, care în prezent este considerată a nu produce microcistine. De asemenea, mărimea celulelor permite încadrarea acestei tulpini la specia *M. wesenbergii*. Cel mai important caracter morfologic pentru identificarea acestei specii îl constituie teaca mucilaginoasă din jurul coloniilor, care este puternic refringentă. Din păcate, în cazul culturilor cianobacteriene din colecții teaca mucilaginoasă nu se păstrează, neputând fi utilizată în validarea apartenenței tulpinilor la o anumită specie.

Acesta constituie principalul obstacol în confirmarea - pe criterii morfologice – a tulpinii AICB 702 ca aparținând speciei *M. wesenbergii*. Atâta timp cât datele moleculare indică acest fapt, s-a impus efectuarea unor analize adiționale menite să ateste faptul că tulpina AICB 702 nu este impurificată cu alte cianobacterii.

În aceste sens gena pentru ARNr 16S și fragmentul ITS a fost amplificată prin PCR cu perechea de amorse 27F-ITER, și a fost clonată în plasmidul pGEM-T. Prin selecția alb-albastră au fost alese 24 de colonii din care a fost secvențat fragmentul ITS, cu

amorsa ITEF. În final au fost obținute 15 secvențe. Acestea au fost supuse unei alinieri multiple împreună cu alte secvențe aparținând unor tulpini diferite de *Microcystis* (toxice și netoxice) din Colecția AICB (AICB 318, AICB 619, AICB 679, AICB 680, AICB 748, AICB 826). Pe baza alinierii au fost construiți 2 arbori de distanță, prin metodele Neighbour Joining și Minimum Evolution (fig 26, 27).

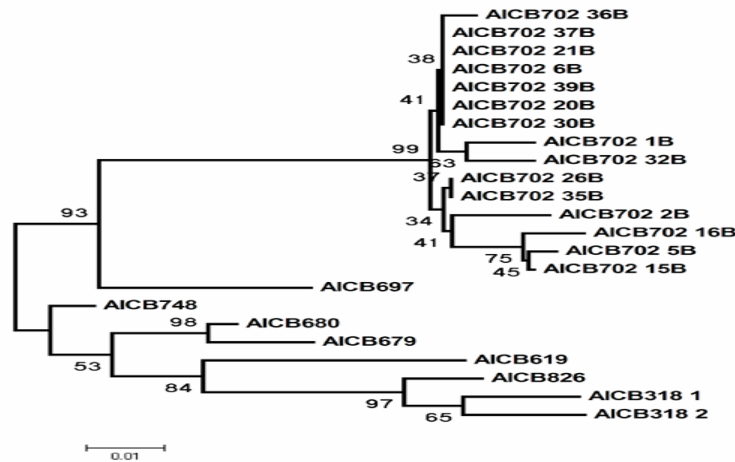


Fig. 26 Arborele de distanță construit pe baza algoritmului Neighbour Joining folosind 15 secvențe ITS de la tulpina AICB 702 împreună cu alte secvențe provenind de la tulpini de *Microcystis* din Colecția AICB. Testul Bootstrap a fost aplicat în 500 de replicate. Soft – MEGA4.

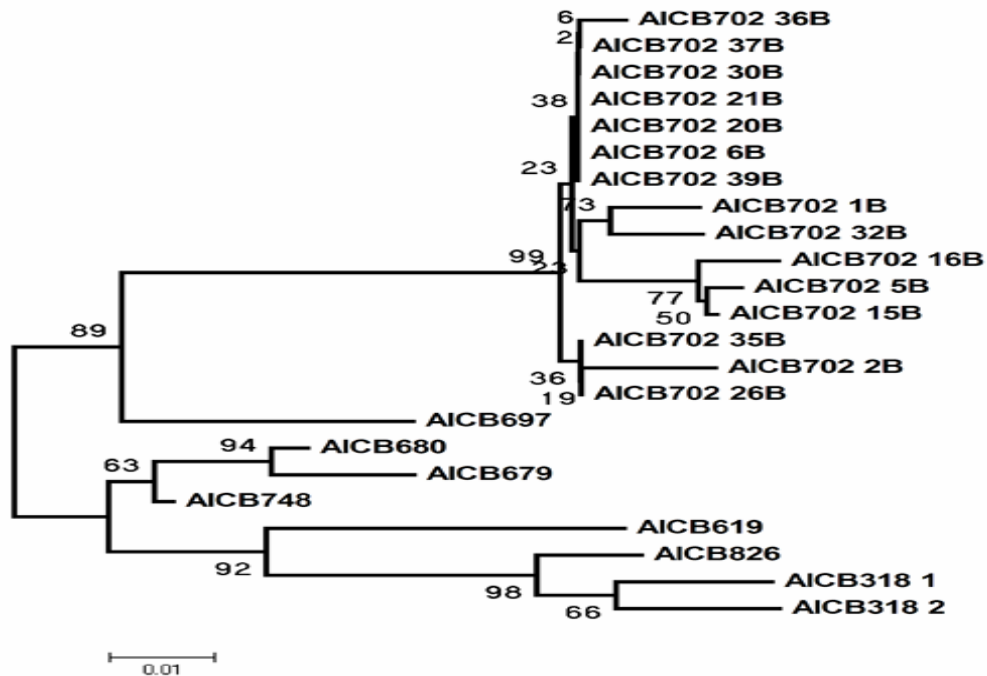


Fig. 27 Arborele de distanță construit pe baza algoritmului Minimum Evolution folosind 15 secvențe ITS de la tulpina AICB 702 împreună cu alte secvențe provenind de la tulpini de *Microcystis* din Colecția AICB. Testul Bootstrap a fost aplicat în 500 de replicate. Soft – MEGA4.

Ambii arbori atestă faptul că secvențele AICB 702 sunt foarte asemănătoare, acestea grupându-se în cazul fiecărui arbore separat de restul tulpinilor. În ambele cazuri, cluster-ul care grupează cele 15 secvențe AICB 702 este asigurat de o valoare Bootstrap de 99, ceea ce înseamnă că acest grup este prezent în 99% din totalul arborilor generați de computer, și din care au rezultat cei doi arbori prezentați mai sus. În schimb, în interiorul acestui cluster cele 15 secvențe grupate împreună prezintă valori Bootstrap mici, între 2 și 77. Aceasta înseamnă că cele 15 secvențe sunt foarte similare, astfel încât aproape orice grupare între ele este posibilă. O simplă interogare cu serviciul BLAST a bazei de date publice NCBI a confirmat că toate cele 15 secvențe aparțin tuplinii AICB 702.

Restul tulpinilor de *Microcystis* se grupează separat de cluster-ul AICB 702, iar valorile Bootstrap mari certifică faptul că acestea sunt tulpini diferite.

5. Concluzii

- Secvențele genelor pentru ARNr 16S / ITS și arborele filogenetic generat demonstrează apartenența tuturor tulpinilor studiate la genul *Microcystis*, iar analiza secvențelor repetare de tipul HIP a permis diferențierea tulpinilor de *Microcystis* din Colecția AICB.
- A fost identificată o nouă combinație de 3 amorse oligonucleotidice care au permis secvențarea integrală a genei pentru ARNr 16S, spre deosebire de 5 câte se foloseau anterior.
- În Colecția AICB există 5 tulpini de *Microcystis* producătoare de microcistine-LR și -RR.
- Noile amorse (originale) obținute permit identificarea facilă atât a tulpinilor de *Microcystis* producătoare de microcistine din Colecția AICB, cât și a cianobacteriilor toxice din mediul natural.
- Tulpina AICB 702 (probabil aparținând speciei *Microcystis wesenbergii*) produce microcistina-RR, această specie fiind considerată netoxică până în momentul de față.

6. Mulțumiri

Cu acest prilej, îi mulțumesc în mod deosebit prof. dr. Nicolae Dragoș care m-a ajutat enorm în ultimii 5 ani în încercarea mea de a deveni un om responsabil, cu o gândire corectă, inovatoare, trăsături indispensabile cuiva care se dorește a fi un cercetător.

De asemenea, îi mulțumesc prof. dr. Corneliu Tarba, cel care mi-a fost îndrumător în primii doi ani de studii doctorale, oferindu-mi sprijin și sfaturi utile ori de câte ori am avut nevoie. Mulțumirile mele se adresează de asemenea referenților științifici care au acceptat să analizeze această teză de doctorat, și anume domnilor prof. dr. Iacob Checiu și prof. dr. Dumitru Cojocaru, precum și președintelui comisiei, în persoana doamnei conf. dr. Cristina Dobrotă.

Efectuarea întregului program de cercetare nu ar fi fost posibilă fără ajutorul unor persoane care mi-au fost nu doar colegi de muncă, ci în primul rând buni prieteni pe care m-am bazat în nenumărate rânduri atât în ceea ce privește unele probleme profesionale, cât și personale:

Colectivul de Algologie de la Institutul de Cercetări Biologice, și anume CP II Ana Nicoară, CP I Victor Bercea, drd. Adriana Bica, drd. Cristian Coman și tehn. pr. Dorina Moldovan, persoane foarte dragi mie alături de care am petrecut multe momente deosebite atât în laboratorul de cercetare, cât și în afara acestuia.

Centrul de Microscopie Electronică al Universității Babeș-Bolyai: prof. dr. Constantin Crăciun, Șef. Lucrări dr. Lucian Barbu-Tudoran.

Prof. dr. Octavian Popescu, care mi-a oferit posibilitatea de a folosi secvențiatorul de la Institutul de Cercetări Experimentale Interdisciplinare din cadrul Universității Babeș-Bolyai.

Șef lucrări dr. Manuela Banciu, șef lucrări dr. Horia Banciu, dr. Alina Sesărman pentru ajutorul în laborator și pentru sfaturile utile care au avut rolul de a îmbunătăți calitatea rezultatelor obținute în urma acestor studii.

Dr. Martin Welker de la Universitatea Tehnică din Berlin și drd. Bogdan Frențiu de la Facultatea de Fizică din cadrul Universității Babeș-Bolyai pentru suportul oferit în analiza toxinelor cianobacteriene.

Am lăsat la urmă mulțumirile mele pentru cea mai importantă persoană pentru mine: mama mea. Sunt conștient de sacrificiile pe care le-a facut pentru mine, și pentru care îi voi fi recunoscător toată viața. Îi dedic realizarea acestei teze, în încercarea de a-i răsplăti într-o oarecare măsură efortul deosebit depus.

7. Bibliografie selectivă

- Carmichael, W. W., (1994). The toxins of cyanobacteria, *Sci. Am.*, 270:78-86.
- Carmichael, W. W. (1997). The cyanotoxins, *Adv. Bot. Res.*, 27: 211-256.
- Dragoș, N., Peterfi, L. Ș., Momeu, L., Popescu, C., (1997). An introduction to the algae and the Culture Collection of Algae at the Institute of Biological Research, Cluj-Napoca, Cluj Univ. Press.
- Ito, E., Kondo, F., Terao, K., Harada, K-I., (1997). Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR, *Toxicon.*, 35:1453-1457.
- Jungblut, A-D., Neilan, B., (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin synthetase genes in three orders of cyanobacteria, *Arch. Microbiol*, 185:107-114.
- Kaebnick, M., Neilan, B. A., Borner, T., Dittmann, E., (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthetic gene cluster, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3387-3392.
- Neilan, B. A., Dittman, E., Rouhiainen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., Börner, T. (1999). Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 4089-4097.
- Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H., Codd, G. A., (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, *Brazil. Lancet.*, 352:47-55.

Cuvinte cheie

Microcystis, microcistine, MALDI-TOF MS, PCR