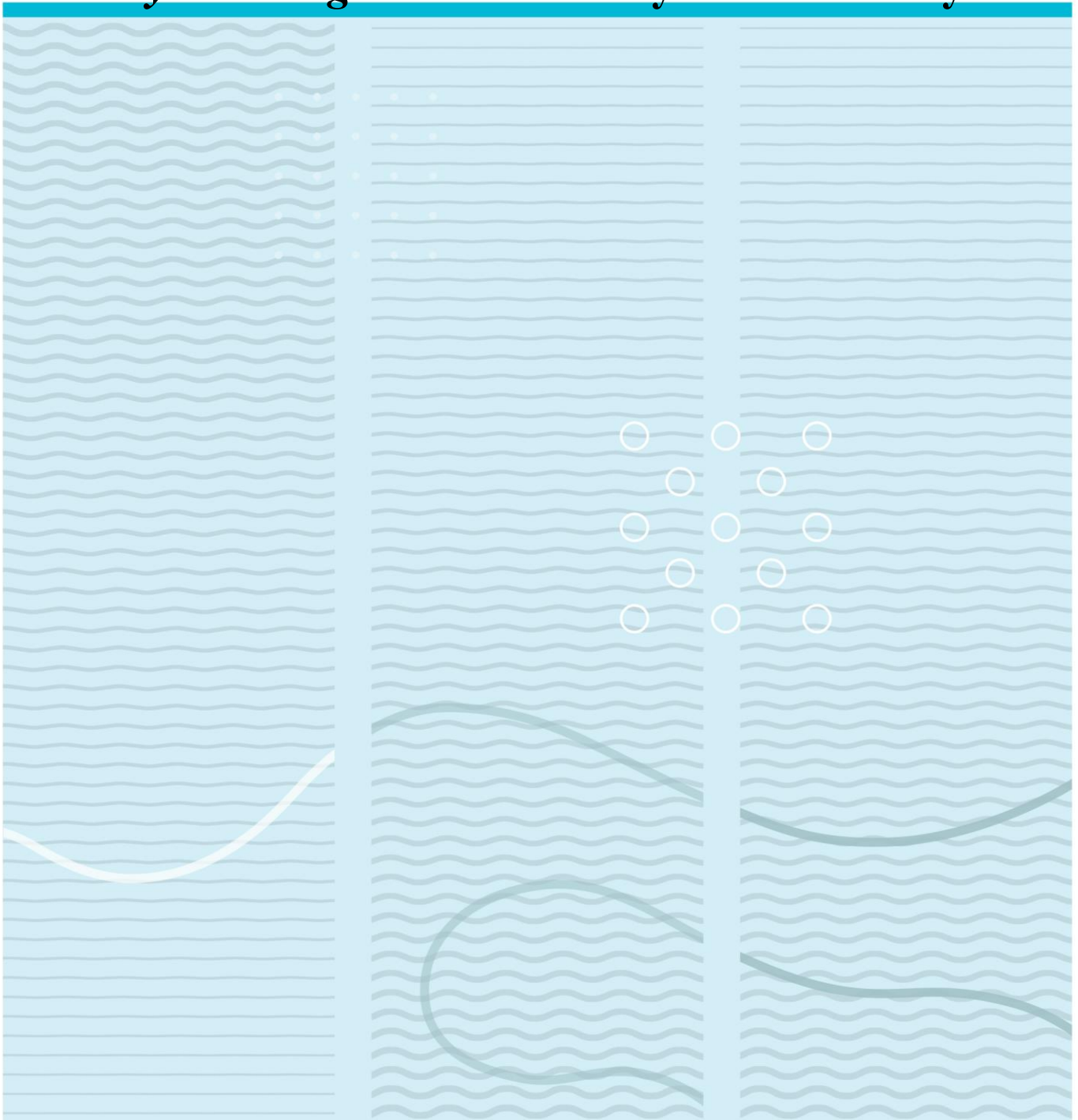


Kaja Christine Andersen

Kan heterotrofe kontaminanter isolert fra en *Microcystis aeruginosa* kultur bryte ned microcystin?



Høgskolen i Sørøst-Norge
Fakultet for teknologi, naturvitenskap og maritime fag
Institutt for natur-, helse- og miljøvern fag
Postboks 235
3603-Kongsberg

<http://www.usn.no>

© 2016 Kaja Christine Andersen

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Cyanobakterier og deres cyanotoksiner er et økende forurensningsproblem i vannforekomster på verdensbasis. Microcystiner (MC) er de mest utbredte og hyppigst forekommende cyanotoksinene i ferskvann. MC er hepatotoksiner (levertoksiner) som kan være helseskadelige for mennesker og dyr. World Health Organization (WHO) har satt en grense på 1 µg MC/L for drikkevann. Det fryktes at konvensjonelle renseprosesser kan være mangelfulle og ikke tilstrekkelig vil kunne fjerne MC fra drikkevann. MC er svært stabile molekyler, og i naturen er det trolig heterotrofe bakterier som står for mesteparten av MC-nedbrytningen. Hypotesen i denne studien er at heterotrofe kontaminanter isolert fra en *Microcystis aeruginosa* (PCC7806) kultur kan bryte ned MC i kulturen.

Tre heterotrofe bakterier ble isolert fra en *M. aeruginosa* (PCC7806) kultur. Bakteriene ble identifisert som *Staphylococcus saprophyticus* og *Arthrobacter sp.* ved Maldi-Toff biotyping. Den siste bakterien lot seg ikke identifisere, og ble gramfarget og mikroskopert. Den ukjente bakterien er en gram negativ, aerob, bevegelig kokke i rette kjeder med gul pigmentering. Det ble gjennomført 5 ulike nedbrytningsforsøk hvor bakteriene ble undersøkt individuelt og samlet i miks for deres evne til å bryte ned MC. MC-konsentrasjonen ble målt ved ELISA-microcystin (Adda) analyse ved forsøksstart og forsøksslutt.

Ingen av bakteriene i denne studien viste MC-nedbrytning under forsøkene. Bakteriell nedbrytning av MC er tidligere vist å være avhengig av en rekke ulike faktorer som pH, MC-konsentrasjon, temperatur, tilvenningsfase, vekstmedium og om bakteriene har egenskaper som gjør nedbrytningen mulig. Optimal pH for MC nedbrytning ved bakterier er vist å være 7-8,5. Høy MC-konsentrasjon er vist å gi høyere nedbrytningsprosent, mens optimal temperatur ser ut til å være mellom 20-37 °C. Om bakteriene trenger en tilvenningsfase før MC-nedbrytning finner sted varierer med hvilke bakterier som er undersøkt. Temperatur er vist å ha en innvirkning på noen bakteriers behov for tilvenning. Lave temperaturer kan føre til lengre tilvenningsfase. Natriumnitrat (NaNO₃) er vist å forlenge tilvenningsfasen med opptil 7 dager. Når det gjelder bakterienes egenskaper til nedbrytning er det enda mye forskning som trengs. Det er per i dag oppdaget rundt 20

arter av bakterier som kan bryte ned MC. Men kun en nedbrytningsvei ved *Sphingomonas sp* er karakterisert. Denne nedbrytningsmekanismen styres av en gensamling kalt mrl-gener. Disse mrl-genene er de eneste genene som er påvist å styre en bakteriell MC-nedbrytning. Men trolig finnes det mange ulike mekanismer og gener som styrer den bakterielle nedbrytningen av MC.

Under denne studien er ikke pH målt, men av sannsynlige årsaker kan det antas at pH i MC-stamløsningen er i nærheten av optimal pH. Temperaturen i denne studien har vært innenfor optimal temperatur med 25° C. Trolig har inkubasjonstiden under forsøkene vært for kort. NaNO₃ er en av hovedbestanddelene i O₂-mediet som er benyttet under studien og dette kan ha ført til en tilvenningsfase som er lengre enn inkubasjonstiden. Det er ikke undersøkt om de heterotrofe bakteriene i denne studien har mrl-genene, så det kan ikke utelukkes at bakteriene kan ha disse eller andre egenskaper for MC-nedbrytning. Det er derfor viktig å ta med seg at disse bakteriene kanskje kan bryte ned MC under andre forhold enn det som har forekommet i denne studien.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	8
2.	Material og Metode.....	10
2.1.	Heterotrofe bakterier i en PCC 7806 <i>M. aeruginosa</i> kultur	10
2.1.1.	Isolering av bakterier	10
2.1.2.	Identifisering av bakterier	10
2.1.3.	Oppbevaring av bakteriekulturer	11
2.2.	Microcystin stamløsning.....	11
2.3.	Bakteriell vekst.....	11
2.4.	Nedbrytningsforsøk	13
2.5.	Analyser	15
2.6.	Databehandling.....	15
2.7.	Feilkilder	16
3.	Resultater.....	17
3.1.	Identifisering av bakteriene.....	17
3.2.	Bakteriell vekst	18
3.3.	Bakteriell nedbrytning av microcystin	19
3.3.1.	Forsøk 1: De isolerte bakterienes evne til å bryte ned MC	19
3.3.2.	Forsøk 2: Evne til å bryte ned MC, tilvenningsfase og samarbeid om MC- nedbrytning.....	20
3.3.3.	Forsøk 3: Evne til å bryte ned MC, tilvenningsfase og effekt av NB på MC- konsentrasjonen i kontroll.....	20
3.3.4.	Forsøk 4: Endring i MC-konsentrasjonen i kontroll.....	21
3.3.5.	Forsøk 1 (50 x): Ny analyse av forsøk 1 ved lavere fortykning	23
3.3.6.	Forsøk 5: Bekreftelse på resultater fra tidligere MC-nedbrytningsforsøk....	25
3.4.	Refleksjon over metode og funn.....	26
3.4.1.	pH.....	26
3.4.2.	MC-konsentrasjon.....	27
3.4.3.	Temperatur og tilvenningsfase	27
3.4.4.	Vekstmedium	28
3.4.5.	Bakterienes egenskaper	28
4.	Konklusjon	33

5.	Referanser	34
6.	Internett referanser	38
7.	Oversikt over tabeller og figurer	39
8.	Vedlegg.....	40
8.1.	Vedlegg 1: O2-medium (Van Liere & Mur, 1978) brukt til MC stamløsning.	40
8.2.	Vedlegg 2: Metodebeskrivelse fra Abraxis, ELISA Microcystin-analyse.....	41
8.3.	Vedlegg 3: Resultater fra Biotyping ved Unilabs, Skien	43
8.4.	Vedlegg 4: Rådata fra ELISA Microcystin (Adda) analyser. MC konsentrasjon i µg/L.	44

Forord

Masteroppgaven er en 60 studiepoengsoppgave utført i forbindelse med Masterstudiet natur-, helse- og miljøvern fag ved Høyskolen i Sørøst-Norge. Førsteamanuensis Synne Kleiven og professor Hans Christian Utkilen har vært veiledere, og fortjener en stor takk for god veiledning og hjelp på laboratoriet og under skrivingen. Jeg vil også takke overingeniør Karin Brekke Li for gode råd ved laboratoriearbeidet. Professor Andrew Jenkins og Monica Kollstrøm (bioingeniør ved Unilabs, skien) fortjener takk for hjelp til identifisering av bakteriene. Til sist vil jeg takke samboer og familie for konstruktive tilbakemeldinger og korrekturlesning.

Dalen, 13.05.2016

Kaja Christine Andersen

1 Innledning

Vann vil trolig bli en begrensende faktor for videre økonomisk utvikling og fremtidig menneskelig helse (Kalff, 2001). Et betydelig forurensningsproblem på verdensbasis er oppblomstringer av cyanobakterier som reduserer vannkvaliteten og frigjør giftige sekundærmetabolitter til vannmassen (Rastogi, Sinha, & Incharoensakdi, 2014). Det er identifisert rundt 40 arter av cyanobakterier som har evne til å produsere en type giftige sekundærmetabolitter, kalt cyanotoksiner (Westrick, Szlag, Southwell, & Sinclair, 2010). Cyanotoksiner kan grovt deles inn i tre grupper. Neurotoksiner (blokkerer nerveimpulser), hepatotoksiner (skader lever) og dermatoksiner (hudirritasjoner og liknende) (Boopathi & Ki, 2014). Det er ved flere anledninger beskrevet hendelser hvor cyanobakterier og deres toksiner er årsak til dødsfall og sykdom hos både mennesker og dyr (Azevedo, et al., 2002; Merwe, et al., 2012).

Hepatotoksiner er de mest forekommende cyanotoksinene. De består av to ulike grupper toksiner, Microcystin (MC) og Nodularin (NOD) (Sivonen & Jones, 1999). MC finnes i mange varianter og er den mest utbredte og best studerte gruppen av alle cyanotoksinene (Westrick, Szlag, Southwell, & Sinclair, 2010). MC er sykliske heptapeptider som produseres av cyanobakterier som blant annet *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*, og *Planktothrix* (Kupier-Goodman, Falconer, & Fitzgerald, 1999; Nybom, Salminen, & Meriluoto, 2008). MC er fosfatasehemmere og kan gi stor skade på lever (Gjølme, Krogh, & Utkilen, 2010). De hemmer prosesser der fosfor fjernes fra aminosyrer og proteiner i cellene, dette kan føre til celledød. MC tas opp av galletransportsystemet og fraktes til lever hvor toksinene kan forårsake sirkulatorisk sjokk (Gjølme, Krogh, & Utkilen, 2010). Mennesker blir eksponert for MC via blant annet hudkontakt, inhalasjon og svelging (Codd, et al., 1999). MC i drikkevann er et økende globalt problem og utsetter mennesker for helserisiko. World Health Organization (WHO) har satt en grense på 1 µg MC/L som anbefalt øvre grense for daglig inntak av MC via drikkevann (WHO, 2016).

Ved fravær av heterotrofe bakterier eller fotosyntetiske pigmenter fra cyanobakterieceller (β-karoten, klorofyll-a osv.), er MC svært kjemisk stabile (Tsuji, et al., 1994). MC finnes hovedsakelig intracellulært i cyanobakteriene, men frigis

ekstracellulært til vannmassen når cyanobakteriecellen ødelegges eller dør (Westrick, Szlag, Southwell, & Sinclair, 2010). Intracellulært MC kan effektivt fjernes ved å filtrere vannmassen og ta bort hele cyanobakterieceller (Ho, Sawade, & Newcombe, 2011). Ekstracellulært MC er vanskeligere å fjerne og det fryktes at konvensjonelle renseprosesser for drikkevann kan være mangelfulle (de la Cruz, et al., 2011; Ho, Sawade, & Newcombe, 2011). Flere metoder som adsorpsjon, fotolyse, klorering og ozonering kan bryte ned eller redusere toksisiteten til MC (Rastogi, Sinha, & Incharoensakdi, 2014).

Trolig er bakteriell nedbrytning den avgjørende faktoren for reduksjon av MC-konsentrasjonen i naturlige vannforekomster (Chen, et al., 2008; Corbel, Mougín, & Bouaïcha, 2014). Det er oppdaget flere bakterier med evne til MC-nedbrytning. Man vet fortsatt lite om hvordan nedbrytningsprosessen foregår, og hvilke bakterier som har denne egenskapen (Kormas & Lympelopoulou, 2013). Mye tyder på at bakteriell nedbrytning kan være en viktig og god metode for å kontrollere og redusere MC-forekomsten i vann som brukes til drikkevann og rekreasjon (Rastogi, Sinha, & Incharoensakdi, 2014).

Ved Høgskolen i Sørøst-Norge (HSN), institutt for natur-, helse- og miljøvern (INHM) gjennomføres det ulike undersøkelser på cyanotoksiner og MC. Hypotesen for denne studien var at heterotrofe bakterier som kontaminanter instituttets *Microcystis aeruginosa* (PCC7806) kultur kunne bryte ned MC i kulturen. Denne informasjon er nyttig for å kunne bekrefte eller utelukke bakteriell nedbrytning av MC i kulturer som blir benyttet til annen MC-forskning.

2. Material og Metode

Nedbrytningsforsøk og MC-analyser er gjennomført ved INHM, HSN, Bø. Identifisering av de isolerte heterotrofe bakterieriene ble utført av Monica Kollstrøm ved Unilab i Skien og ved hjelp av Andrew Jenkins ved INHM.

2.1. Heterotrofe bakterier i en PCC 7806 *M. aeruginosa* kultur

Bakteriene benyttet i denne studien er isolert fra en *M. aeruginosa* PCC7806 kultur fra Pasteur instituttet i Paris. Kulturene er dyrket ved INHM og har vært oppbevart på HSN i et par år.

2.1.1. Isolering av bakterier

100 µl fra en PCC 7806 kultur ble fordelt over en agarskål med Nutrient Broth nr. 2 (NB-agar). Bakteriekolonier med ulik pigmentering ble høstet med plastøser (inoculating loops, Nunc) etter 3 dagers inkubering i et Termaks konstantskap ved 25 ± 1 °C. Bakteriekoloniene ble overført i flytende Nutrient Broth nr 2 (Oxoid Microbiology Products) (NB-løsning) og videre inkubert ved 25 ± 1 °C til blakket kultur. De ulike bakteriekulturene ble strøket ut ved bruk av plastøser på NB-agar i samsvar med metode (streak plate) beskrevet i Essential Microbiology (Hogg, 2013). Prosessen med å stryke ut bakteriene på NB-agar ble gjentatt til ren bakteriekultur ble oppnådd.

2.1.2. Identifisering av bakterier

Det ble isolert tre antatt ulike heterotrofe bakterier fra *M. aeruginosa* kulturen. De ble forsøkt identifisert med Bruker Daltonik Maldi-Toff Biotyper, ved Unilabs i Skien. Klassifiseringsresultatene fra Bruker gir tre kategorier «High Confidence Identification (score value 2.00-3.00)», «Low Confidence Identification (score value 1.70-1.99)» og «No Organism Identification Possible (score value <1.70)». Verdier over 2.00 regnes som en god identifikasjon på artsnivå (Bruker Daltonik Inc, 2014).

Gramfarging og mikroskopering ble gjennomført på den gule bakterien, da identifikasjon ikke var mulig med «biotyping». Gramfarging ble gjennomført etter fargemetoden beskrevet av Christian Gram (1853-1938) i 1884. Bakteriene ble omtalt under forsøkene som gul, hvit og grå etter bakterienes pigmentering, frem til de ble identifisert.

2.1.3. Oppbevaring av bakteriekulturer

Bakteriene ble kultivert og oppbevart både i NB-løsning og på NB-agar ved 25 ± 1 °C i et Termaks konstantskap. Den gule bakterien vokste kun i overflaten av kulturen (obligat aerob) (Hogg, 2013), og sedimenterte celler i bunnen av kulturen var ikke egnet for videre kultivering eller isolering. Den gule bakterien ble tilført luft (boblet) under oppbevaring og ved forsøkene. Boblingen gir en mer homogen kultur, hvor alle organismene har tilnærmet like forhold i motsetning til en stillestående kultur hvor cellene kan sedimentere og ha helt andre vekstvilkår enn resten av kulturen (pers med Hans C. Utkilen). Boblingen foregikk ved at luft ble ført gjennom et filter (sterilt 0,2 µm cellulose Acetate Membrane filter) ned i en steril glasspipette som var plassert med spissen i bunnen av kulturen.

2.2. Microcystin stamløsning

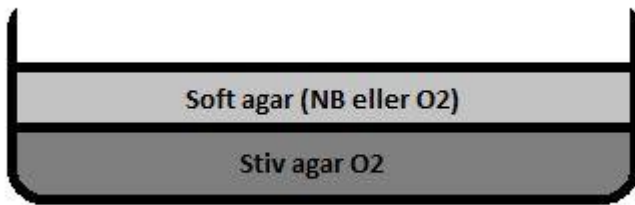
M. aeruginosa kultur dyrket på O2-medium (Van Liere & Mur, 1978) ble benyttet som kilde til MC under studien (vedlegg 1). MC-stamløsningen ble fremstilt ved å vakumfiltrere en *M. aeruginosa* PCC7806 kultur gjennom et glassmicrofiberfilter (GF/C 47 mm Whatman filter), etterfulgt av en sterilfiltrering gjennom et 0,2 µm cellulose nitrat filter (Sartorius AG). MC-stamløsningen ble autoklavert ved 121 °C i 20 min. Etter filtrering og autoklaving hadde MC-stamløsningen en MC-konsentrasjon på 140 µg/. MC-stamløsningen ble oppbevart i mørkt kjølerom (4 °C) for å unngå MC-nedbrytning ved sollys (Welker & Steinberg, 1999).

2.3. Bakteriell vekst

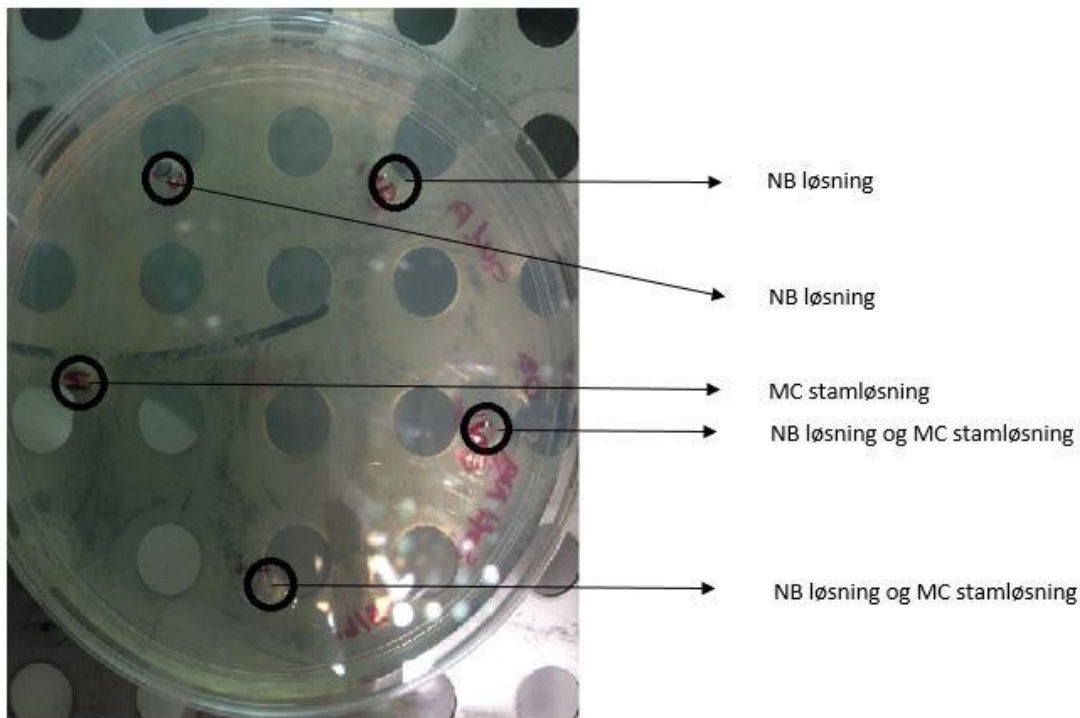
Ved forberedende forsøk på bakteriell vekst i MC-stamløsningen forekom ingen vekst (blakket kultur) av bakteriene i ren MC-stamløsning. NB-løsning ble tilsatt MC-stamløsningen for å forbedre vekstvilkår for bakteriene, og i alle nedbrytningsforsøkene er derfor 5 % av totalt væskevolum NB-løsning.

For å undersøke om veksten av de tre isolerte bakteriene ble påvirket av MC, ble det gjennomført en diffusjonstest. To ulike typer agarskåler ble laget etter agarbrønn diffusjonmetoden som vist i figur 2-1 og 2-2. De tre isolerte bakteriene ble individuelt tilsatt i soft agar, som ble fordelt over et lag med stiv agar. Fem brønner ble laget i agaren

og fylt med ulike medier. To brønner ble fylt med NB-løsning, to brønner ble fylt med NB-løsning blandet med MC-stamløsning, og én brønn ble fylt med ren MC-stamløsning. Formålet var at de isolerte bakteriene skulle kunne vokse i softagaren der hvor forholdene skulle være optimale.



Figur 2-1 Oppbygning av petriskål til diffusjonstest ved agarbrønn diffusjon metode.



Figur 2-2 Petriskål for diffusjonstest før inkubasjon. Bakteriene er tilsatt i NB-softagar. Fem brønner ble fylt med ulike medier. To med ren NB-løsning, to med NB-løsning tilsatt MC-stamløsning og en med ren MC-stamløsning. Foto: Kaja C Andersen

Vekst av gul bakterie på NB-agar viste seg å være lav. Derfor ble det i tillegg forsøkt tilsetning av MC-stamløsning i NB-agarskåler for å undersøke om dette hadde effekt på vekst av bakterien.

2.4. Nedbrytningsforsøk

Bakteriene ble testet individuelt og samlet (Miks) for deres evne til å bryte ned MC. Utstyr benyttet til forsøkene ble sterilisert i autoklav ved 121 °C i 20 min eller i varmeovn ved 110 °C i 24 timer. Alt arbeid ble utført med aseptisk teknikk (Hogg, 2013) i et Holten LaminAir (HH48) sterilkammer. Forsøkene ble gjennomført i erlenmeyerkolber (50ml), reagensrør (15ml) eller i flasker (250ml).

I forsøk 1. ble de tre bakteriene undersøkt individuelt for deres evne til å bryte ned MC. I forsøk 2. og 3. ble den gule bakterien prioritert på bakgrunn av resultatene fra forsøk 1. En miks av de ulike bakteriekulturene ble også laget, for å undersøke om bakteriene kan samarbeide om nedbrytningen slik som Ramani, et al., (2012) har vist i sin undersøkelse. I forsøk 2. og 3. var også målet å undersøke om bakteriene trenger en tilvenningsfase (lagphase) til MC før MC-nedbrytning forekommer. For å undersøke dette ble gul bakteriekultur inkubert med ulike behandlinger før forsøksstart. En bakteriekultur med gul bakterie ble inkubert som tidligere med kun NB-løsning, og en bakteriekultur ble inkubert med NB løsning tilsatt MC-stamløsning. Hensikten var å sammenlikne de ulike behandlingene ved eksperiment slutt for å se om gul bakterie inkubert MC-stamløsning, var mer effektiv som MC-nedbryter enn gul bakterie inkubert på kun NB.

Forsøk 4. ble gjennomført fordi det forekom ukjente endringer i MC-konsentrasjonen i kontrollene i de tidligere forsøkene. Forsøk 5. ble gjennomført for å få en bekreftelse på resultatene fra tidligere forsøk. For en mer detaljert oversikt over forsøkene se tabell 2-1. De ulike behandlingene (bortsett fra første forsøk) ble pakket inn i aluminiumsfolie for å unngå lys som nedbrytningsfaktor (Welker & Steinberg, 1999). Behandlingen sto på ristebord, eller med bobling (gul bakterie) for å unngå sedimentering av bakteriene.

Alle kontroller er uten bakteriekultur. MC-konsentrasjonen i kontrollene er derfor høyere enn i prøvene, hvor konsentrasjonen er noe fortynnet på grunn av væskevolumet fra tilsatt bakteriekultur. MC-konsentrasjonen i kontrollene fra forsøk 1-4 ble korrigert for dette volumet i etterkant (kalkulert konsentrasjon). I forsøk 5 ble det i kontrollen tilsatt sterilisert, destillert vann (dH₂O) for å korrigere for manglende volum av bakteriekultur. Prøver (500-1000 µl) av bakterieblandingene og kontroller ble tatt ut for analyse ved

eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt. Prøvene ble oppbevart i glassrør og plassert i fryser (-18 °C) for senere analyse.

Tabell 2-1 Oversikt over forsøk 1-5 som er gjennomført i denne studien. Tabellen inneholder informasjon om hvilke bakterier som er testet, innholdet i prøvene og andre faktorer som lyseksponering, temperatur, omrøring og lengde på eksperiment.

Eksperiment	Prøver	Innhold	Lys eksponering	Temp. °C	Roterende bordplate	Eksperiment lengde
Forsøk 1 Ernmeyerkolbe	1. Gul bakterie	Totalt volum 26 ml <u>Prøver:</u> 23,75 ml MC stamløsning	JA	25 ± 1	NEI	8 Dager
	2. <i>Arthrobacter sp.</i>	1,25 ml NB løsning 1,00 ml Bakteriekultur				
	3. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>Kontroll:</u> 23,75 ml MC stamløsning				
	4. Kontroll	1,25 ml NB løsning				
Forsøk 2 Erlmeyerkolbe	1. Gul bakterie	Totalt volum 26 ml <u>Prøver:</u> 23,75 ml MC stamløsning	NEI	25 ± 1	JA	10 Dager
	2. Gul bakterie inkubert m/ MC stamløsning	1,25 ml NB løsning 1,00 ml Bakteriekultur				
	3. Miks	(Miks 0,33 ml Gul, 0,33 ml Grå, 0,33 ml Hvit) <u>Kontroll:</u>				
	4. Kontroll	23,75 ml MC stamløsning 1,25 ml NB løsning				
Forsøk 3 Reagensrør	1. Gul bakterie inkubert m/ MC stamløsning	Totalt volum 13 ml <u>Prøver:</u> 11,85 ml MC stamløsning	NEI	25 ± 1	JA	6 Dager
	2. Gul bakterie	0,625 ml NB løsning 0,500 ml Bakteriekultur				
	3. Miks	(Miks 0,166 ml Gul, 0,166 ml Grå, 0,166 ml Hvit) <u>Kontroll NB+MC:</u>				
	4. Kontroll + NB	11,85 ml MC stamløsning 0,624 ml NB løsning				
	5. Kontroll	<u>Kontroll MC:</u> 11,85 ml MC stamløsning				
Forsøk 4 Reagensrør	1-2. Ufiltrert kontroll m/NB	Totalt volum 10-10,5 ml <u>m/NB inneholder:</u> 10 ml MC stamløsning	NEI	25 ± 1	JA	5 Dager
	3-4. Ufiltrert kontroll u/NB	0,5 ml NB løsning <u>u/NB inneholder:</u>				
	5-6. Filtrert kontroll m/NB	10 ml MC stamløsning				
	7-8. Filtrert kontroll u/NB					
Forsøk 5 Flasker	1A. Gul bakterie	Total volum 21,5 ml <u>Prøver:</u> 20 ml MC stamløsning	NEI	25 ± 1	Bobling	8 Dager
	1B. Gul bakterie	1 ml NB løsning 0,5 ml Bakteriekultur				
	2A. Kontroll	<u>Kontroll:</u> 20ml MC stamløsning				
	2B. Kontroll	1ml NB løsning 0,5 ml dH2O				

2.5. Analyser

Alle prøvene ble analysert med «Enzyme-Linked Immunosorbent Assay» (ELISA) Microcystins/Nodularins (ADDA) ELISA kit (PN520011) fra Abraxis. Metodebeskrivelse vedlagt kittet (vedlegg 2) ble fulgt, med unntak av oppsett av standarder og bruk av kontroll. Standard 0 (0.0 µg/L MC) og 5 (5.0 µg/L MC) ble oppført i duplikater, mens standard 1-4 ble oppført single. Medfølgende kontroll (0,75 µg/L MC) fra kit ble ikke benyttet. Dette er et fast analyseoppsett som blir benyttet ved INHM, HSN. Analyseoppsettet er satt opp med tanke på økonomiske aspekter (redusere bruken av brønner), og metoden er godt innkjørt ved instituttet. Tabell 2-2. viser oppsett av standarder og prøver som ble benyttet under analysene i denne studien.

Tabell 2-2 Oppsett av brønner med standarder og prøver for ELISA Microcystin (Abraxis) analyse ved INHM. Standard 0 og 5 oppføres i duplikat, standard 1-4 oppføres enkle. Alle prøver er analysert med minst ett duplikat.

H	G	F	E	D	C	B	A
St 5	St 5	St 4	St 3	St 2	St 1	St 0	St 0
5,0 µg/L	5,0 µg/L	2,0 µg/L	1,0 µg/L	0,40 µg/L	0,15 µg/L	0,0 µg/L	0,0 µg/L
Prøve 4	Prøve 4	Prøve 3	Prøve 3	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 1	Prøve1

Alle prøver med MC-konsentrasjon under standard 1 (0,15 µg/L) skal sies å inneholde < 0,15 µg/L MC, og alle prøver med MC-konsentrasjoner over standard 5 (5,0 µg/L) må fortynnes for å ligge innenfor standardkurven og gi nøyaktige resultater. Deteksjonsgrensen for testen er 0,10 µg/L basert på MC-LR (Abraxis LLC). Fortynningsrekker med MC-stamløsningen ble analysert for å bestemme MC-konsentrasjonen i MC-stamløsningen, og for å finne rett fortynning til analyse av prøver fra nedbrytningsforsøkene. Prøvene fra nedbrytningsforsøkene ble fortynnet 50x og 250x.

2.6. Databehandling

Resultatene ble avlest med ELISA Accu Reader model 965 med en absorbans på 450nm. Programmet M965 Grabber ble benyttet til avlesningen og resultatene ble overført til et Excel regneark med forhåndskrevne formler. Excel-regnearket for ELISA microcystin er

utarbeidet av Ralph Stålberg ved HSN. Regnearket gir en standardkurve samt ferdig kalkulerte resultater i $\mu\text{g/L}$.

2.7. Feilkilder

Ved bruk av ELISA som analyseverktøy er falske positiver eller negativer viktige feilkilder. I metodebeskrivelse fra Abraxis, står det tydelig at dette ikke kan utelukkes. Feilhåndtering av testen, som for kort eller for lang inkubasjonstid, pipetteringsfeil og ekstreme temperaturer kan føre til falske resultater. Samt at andre stoffer i prøvene kan reagere med testen.

Fortynningsfeil kan forekomme. Feil kan bli gjort ved unøyaktighet, eller utilstrekkelig homogenisering. Prøvene fra forsøk 1-3 er fortynnet 250 x. Dette er en høy fortynning som har ført til en viss usikkerhet rundt resultatene.

Ved bruk av kun èt duplikat av hver prøve i MC-analysen er grunnlaget for statistiske analyser begrenset. Det er regnet gjennomsnitt og standard avvik for resultatene i denne studien. Men merk at noen av resultatene er kun beregnet fra to verdier.

3. Resultater

3.1. Identifisering av bakteriene

Bakteriene benyttet i denne studien ble identifisert ved bruk av en Maldi-Toff biotyper ved Unilabs i Skien. Den «hvite bakterien» ble identifisert som *Staphylococcus saprophyticus*. Den «grå bakterien» ble identifisert som *Arthrobacter polychromogenes*, men kan kun sies å tilhøre slekten *Arthrobacter* på grunn av de lave score verdiene (tabell 3-1). Den siste bakterien «gul bakterie» ble ikke identifisert (vedlegg 3.).

Tabell 3-1 Resultater fra identifisering av bakteriene ved Maldi-Toff Biotyper.

ID	Organisme (mest lik)	Score value	Organisme (nest mest lik)	Score value
Grå bakterie	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1,769	Ikke sikker identifikasjon	1,548
Grå bakterie	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1,862	Ikke sikker identifikasjon	1,668
Grå bakterie	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1,837	Ikke sikker identifikasjon	1,614
Hvit bakterie	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,883	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,818
Hvit bakterie	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,114	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,872
Hvit bakterie	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,925	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,865
Gul bakterie	Ikke sikker identifikasjon	1,395	Ikke sikker identifikasjon	1,290
Gul bakterie	Ikke sikker identifikasjon	1,419	Ikke sikker identifikasjon	1,338
Gul bakterie	Ikke sikker identifikasjon	1,380	Ikke sikker identifikasjon	1,280

På grunn av manglende identifisering av gul bakterie ved biotyping, ble det gjennomført mikroskopering og gramfarging for denne bakterien. «Gul bakterie» er en «Gram negativ, aerob, bevegelig kokke i rette kjeder med gul pigmentering». Maldi-Toff Biotyper ved Unilabs benytter en medisinsk database og den «gule bakterien» er derfor trolig ikke en bakterie kjent i forbindelse med human medisin. Det ble ikke gjort noen ytterligere forsøk på å identifisere den gule bakterien.

Det er ved litteratursøk så langt man kjenner til, ikke utført vitenskapelig arbeid som viser forbindelse mellom MC-nedbrytning og *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus saprophyticus* finnes i luft, støv, mat og i vann. Hos mennesker er det i huden og i slimhinnene man finner bakterien, og den kan forårsake urinveisinfeksjon hos yngre kvinner (Widerström, Wiström, Sjösedt, & Monsen, 2012). *Arthrobactene* tilhører rekken aktinobakterier. *Arthrobactene* er en corynebakterie, som betyr at bakterien er gram positiv, stavformet, oftest aerob og for det meste ufarlig (Kenyon college, 2015). Slekten *Arthrobacter* er tidligere vist å bryte ned MC (Manage, Edwards, Singh, & Lawton, 2009; Lawton, Welgamage, Manage, & Edwards, 2011).

3.2. Bakteriell vekst

Det ble utført diffusjonstest for å undersøke om bakteriene viste preferanse for eller ble hemmet av å vokse med MC-stamløsning. I agarskålen med NB-soft agar ble jevn teppevekst oppnådd over hele skålen av både *Staphylococcus saprophyticus* og *Arthrobacter sp*. Det er mulig at det var for mye næring i soft-agaren med NB, og at dette var årsaken til at det ikke forekom noen forskjell rundt de ulike brønnene. Verken *Staphylococcus saprophyticus* eller *Arthrobacter sp* ble hemmet av MC-stamløsningen, da det ikke forekom dårligere vekst rundt brønnene som inneholdt MC. Den gule bakterien viste ingen vekst, og dette er trolig et resultat av at bakterien er strengt aerob og ikke fikk nok luft inne i softagaren.

I agarskålene med O2-soft agar viste ingen av bakteriene tegn til vekst. Disse skålene inneholdt svært lite næring for heterotrofe bakterier, og trolig var ikke de ulike mediene i brønnene nok til å frembringe vekst av bakteriene.

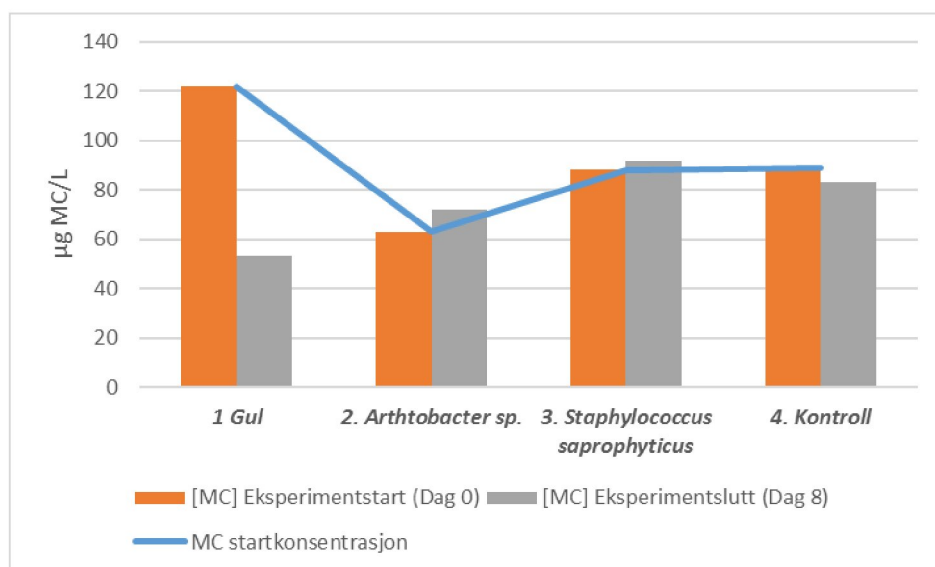
Det ble også testet om den gule bakterien vokste bedre på agarskåler tilsatt MC-stamløsning, da bakterien ikke vokste godt på rene NB-agar skåler. Det ble ikke registrert bedre vekst av gul bakterie på agarskålene tilført MC-stamløsning.

3.3. Bakteriell nedbrytning av microcystin

Forsøk for å påvise reduksjon i MC-konsentrasjon ved tilsetning av de ulike bakteriene ble gjennomført. MC-konsentrasjonen ble målt med ELISA teknikk ved eksperimentstart og eksperimentslutt.

3.3.1. Forsøk 1: De isolerte bakteriernes evne til å bryte ned MC

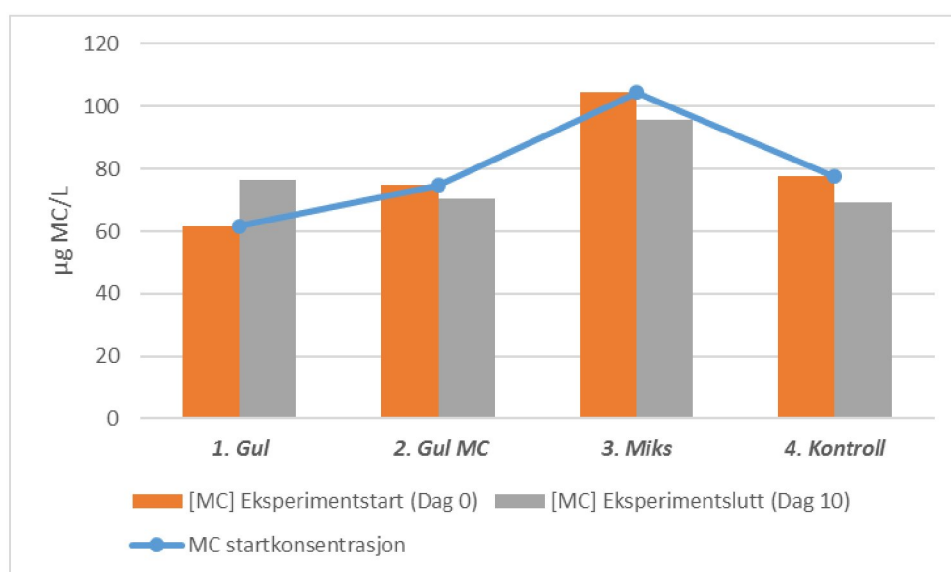
Behandlingen med gul bakterie viste mer enn 50 % reduksjon i MC-konsentrasjonen etter 8 dagers inkubasjon (Dag 0: $122 \pm 73 \mu\text{g MC/L}$, Dag 8: $53 \pm 14 \mu\text{g MC/L}$) (figur 3-1). Behandlingene med de to andre bakteriene viste liten forskjell i MC-konsentrasjon fra dag 0 til dag 8. Gjennomsnittskonsentrasjon av MC dag 0 var $90,5 \pm 24 \mu\text{g MC/L}$. Variasjonen i startkonsentrasjonen av MC er tydelig til tross for at konsentrasjonen burde vært lik i alle behandlingene, da den samme mengden MC-stamløsning er tilsatt ved dag 0.



Figur 3-1 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 8) for forsøk 1 ved 250 x fortykning.

3.3.2. Forsøk 2: Evne til å bryte ned MC, tilvenningsfase og samarbeid om MC-nedbrytning

Figur 3-2 viser startkonsentrasjon av MC ved de forskjellige behandlingene gul bakterie inkubert med NB (1. Gul) og MC (2. Gul MC) før forsøksstart, og behandlingen med miks av alle de isolerte bakteriene. Gjennomsnittlig startkonsentrasjon for forsøk 2 var 80 ± 18 $\mu\text{g MC/L}$. Variasjonen i MC-konsentrasjonen ved dag 0 er tydelig. Det er vanskelig å si om inkubering med MC-stamløsning før forsøksstart gjør den gule bakterien mer effektiv til å bryte ned MC, og om det eventuelt reduserer en mulig tilvenningsfase. Ingen av behandlingene viser noen større endring i MC-konsentrasjon i løpet av forsøksperioden og trolig har ingen nedbrytning funnet sted.

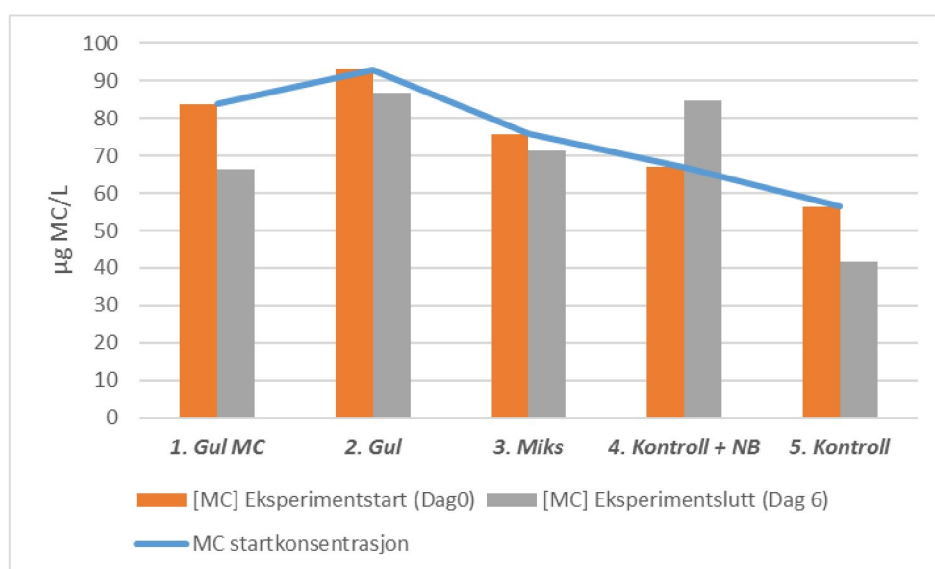


Figur 3-2 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 10) for forsøk 2 ved $250 \times$ fortykning.

3.3.3. Forsøk 3: Evne til å bryte ned MC, tilvenningsfase og effekt av NB på MC-konsentrasjonen i kontroll

Det ble benyttet flere replikater under ELISA-analysen som et forsøk på å jevne ut variasjonen i startkonsentrasjonen av MC. I forsøk 3 ble det benyttet 6 replikater istedenfor 2 som i de andre forsøkene.

Figur 3-3 viser stor variasjon i startkonsentrasjonen av MC til tross for at flere replikater av hver prøve er analysert under ELISA analysen. Gjennomsnittlig MC-startkonsentrasjon i prøvene er $75 \pm 21 \mu\text{g MC/L}$. Prøve 1. gul bakterie preinkubert med MC viser en konsentrasjonsendring (20% reduksjon). Dette kan indikere nedbrytning og eventuelt en reduksjon i tilvenningsfase for bakterien. Men siden prøve 5. kontroll viser liknende konsentrasjonsendring (25% reduksjon), er trolig ikke bakteriell nedbrytning årsaken til endringen i MC-konsentrasjonen i prøve 1. Det er uvisst om bakteriene trenger en tilvenningsfase i prøvene før nedbrytning kan finne sted. Det ble analysert to ulike behandlinger av kontroller. En kontroll med ren MC-stamløsning og en kontroll med MC-stamløsning tilsatt NB. Begge kontrollene viser konsentrasjonsendring fra dag 0 til dag 6. Kontrollen tilsatt NB viser en økning i konsentrasjonen, mens kontrollen uten NB viser en reduksjon. Hva dette kommer av er usikkert. Trolig er det variasjon og usikkerhet i datasettet som fører til denne konsentrasjonsendringen.

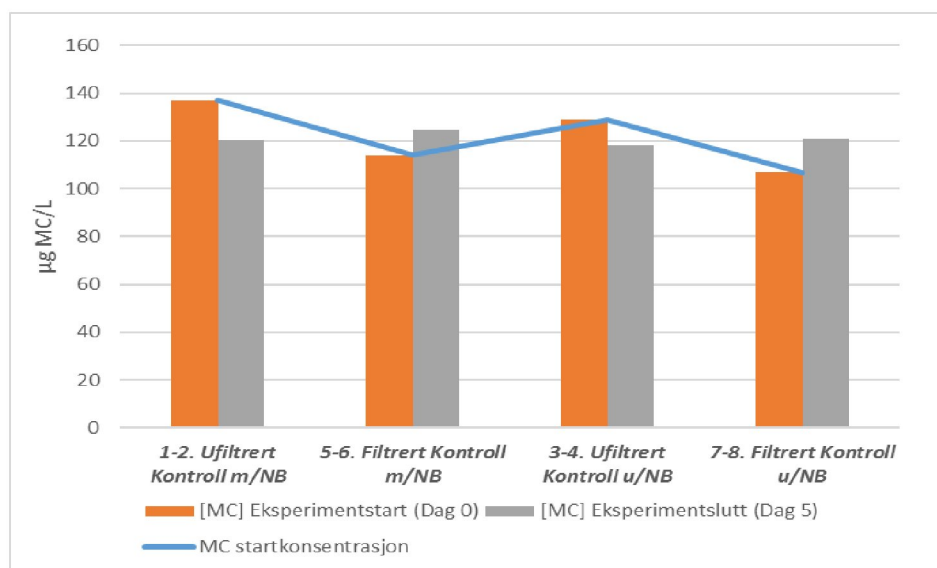


Figur 3-3 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 6) ved forsøk 3 ved 250 x fortytning.

3.3.4. Forsøk 4: Endring i MC-konsentrasjonen i kontroll

Forsøk 4 ble gjennomført for å undersøke stabiliteten av MC-konsentrasjonen over tid. Variasjon i MC-konsentrasjon i kontrollene gjør det vanskelig å trekke klare slutninger fra nedbrytningsforsøkene. Partikkelbinding med NB-løsningen kan være en mulig årsak til reduksjonen i MC-konsentrasjon som er synlig i noen av forsøkene (forsøk 1 og 2). Det

ble laget prøver av MC-stamløsning med og uten NB-løsning, hvor halvparten av prøvene ble filtrert gjennom et 0,2 µm cellulose filter etter blanding. Hvis partikkelbinding til NB-løsningen har funnet sted, ville partiklene bli igjen i filteret mens MC-konsentrasjonen i



Figur 3-4 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen (µg/L) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimetslutt (Dag 5) for forsøk 4 ved 50 x fortyning.

prøvene med NB-løsning reduseres. Resultatet av forsøket ble at MC-startkonsentrasjonen i de filtrerte prøvene ble noe lavere ved eksperimentstart enn hos de ufiltrerte prøvene (figur 3-4). Resultatet var uavhengig av om prøven inneholdt NB eller ikke. Trolig hadde ikke NB-løsningen noen innvirkning på MC-konsentrasjonen i prøvene.

Sannsynligvis forekom binding av MC til filteret i dette forsøket. I protokollen for ELISA microcystin-analysen fra Abraxis er det nevnt at prøver kan filtreres med glassfiberfilter før analyse, men at alternative filtre kan gi lavere konsentrasjoner i prøvene ved at MC bindes til filteret (Abraxis LLC). En studie av MC-holdige aerosoler har vist at cellulosefilter er det filteret som binder MC best (Cheng, Zhou, Irvin, Kirkpatrick, & Backer, 2007). Derfor er det kanskje uheldig at et cellulosefilter ble benyttet ved filtreringen i forsøk 4.

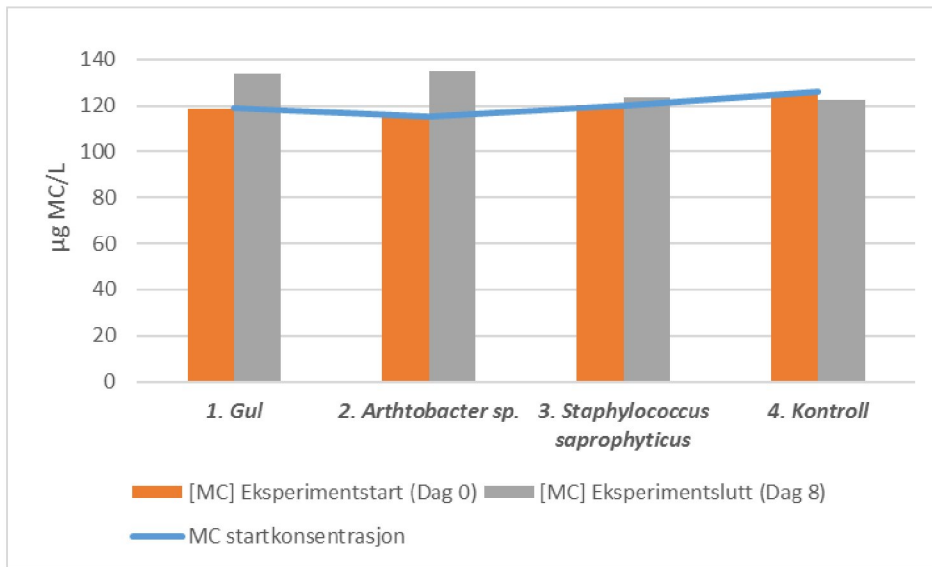
Prøve 3-4 ufiltrert kontroll uten NB har en noe lavere MC-startkonsentrasjon enn prøve 1-2 ufiltrert kontroll med NB. Årsaken til dette kan være at MC-konsentrasjonen til prøve 3-4 er justert matematisk etter analyse. MC-konsentrasjonen er målt ved ELISA og

deretter justert for å korrigere for fortynningen av MC-stamløsningen benyttet i prøve 1-2 da den er tilsatt NB. Den samme korreksjonen er utført for prøve 7-8 filtrert kontroll u/NB (figur 3-4). Gjennomsnittskonsentrasjonen for alle prøvene ved eksperimentstart er $122 \pm 15 \mu\text{g MC/L}$, mens gjennomsnittskonsentrasjonen for alle prøvene ved eksperimentslutt er $121 \pm 12 \mu\text{g MC/L}$. Det er ingen endring i gjennomsnittlig MC konsentrasjon fra eksperimentstart til eksperimentslutt.

Årsaken til variasjonen i MC konsentrasjonen skyldes mest sannsynlig fortynningen av prøvene. Prøvene fra forsøk 1-3 er betydelig fortynnet (250 x), og en høy fortynning kan føre til unøyaktige resultater. Resultatene lå også nær nedre deteksjonsgrense for ELISA-analysen som er $0,10 \mu\text{g/L}$ (Abraxis LLC). ELISA analysen kan kun benyttes for å analysere MC-konsentrasjoner i intervallet $0,10\text{-}5,00 \mu\text{g/L}$. I denne studien var MC-konsentrasjonen i MC-stamløsningen langt over $5,00 \mu\text{g/L}$ og prøvene måtte fortynnes. ELISA resultatene fra forsøk 1-3 gav MC-konsentrasjoner på ca. $0,2\text{-}0,4 \mu\text{g/L}$ etter 250 x fortynning og er innenfor deteksjonsområdet til testen. Men usikkerheten i resultatene blir generelt større jo nærmere nedre deteksjonsgrense en resultatene er (pers. med. Synne Kleiven). Prøvene ble trolig fortynnet for mye, og det ble for store variasjoner i resultatene. Ved å endre fortynningen til 50 x i de senere forsøkene (forsøk 4,5 og 1(50 x)) ble startkonsentrasjonen av MC jevnere, og standardavvikene mindre (Figur 3-5 og 3-7).

3.3.5. Forsøk 1 (50 x): Ny analyse av forsøk 1 ved lavere fortynning

Forsøk 1 ble analysert på nytt med en 50 x fortynning siden dette forsøket best representerer alle bakteriene. Forsøk 1 vil videre bli omtalt som Forsøk 1 (50 x) eller Forsøk 1 (250 x) etter hvilken fortynning som omtales. Figur 3-5 viser en mer jevn startkonsentrasjon (gjennomsnittlig $120 \mu\text{g MC/L} \pm 5$), og at ingen nedbrytning har funnet sted hos noen av bakteriene ved 50 x fortynning. En liten økning i MC-konsentrasjonen i prøve 1 og 2 (henholdsvis 13 % og 17 %) observeres i forsøk 1 (50 x). Hva denne økningen skyldes er usikkert. Det skal ikke finnes levende *M. aeruginosa*-celler i prøvene (sterilfiltrert og autoklavert) så MC-produksjon skal være utelukket. ELISA teknikken er sårbar for feilkilder. Falske positive kan forekomme (andre stoffer i prøvene som kan gi positive resultater). ELISA metoden for MC er også en strengt tidsavhengig analyse og for en uerfaren bruker av metoden kan dette være en viktig feilkilde.

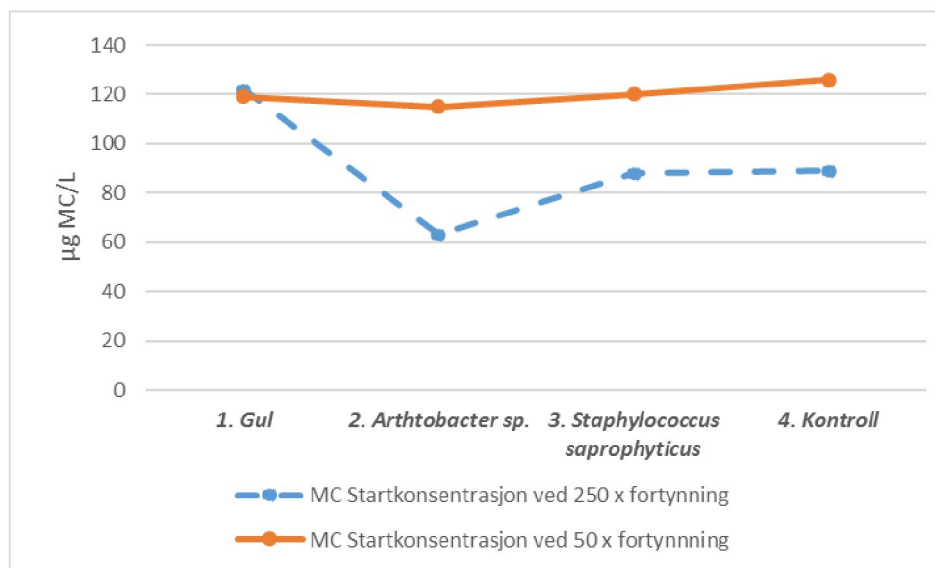


Figur 3-5 Gjennomsnittsverdier for MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 8) ved forsøk 1 ved 50 x fortytning.

En annen mulig forklaring kan være ustabilitet i Termaks konstantskapet. Prøvene kan ha fordampet, og MC-mengden kan ha blitt oppkonsentrert. Det har i løpet av undersøkelsen vært problemer med Termaks konstantskapet hvor kjølingssystemet har vært ustabil.

Figur 3-6 viser en sammenlikning mellom MC-konsentrasjonen ved eksperimentstart for forsøk 1 ved de to fortytningene (50 x og 250 x). MC-startkonsentrasjonen er jevnere for de ulike prøvene ved 50 x fortytning enn ved 250 x fortytning. MC-konsentrasjonen er også konsistent høyere ved 50 x fortytning enn ved 250 x fortytning. Dette indikerer at MC-konsentrasjonen i prøvene fra forsøk 1 (250 x) kan være noe underestimert sammenlignet med resultatene fra forsøk 1 (50 x). Forsøk 1 (250 x) har en MC-startkonsentrasjon på gjennomsnittlig $90,5 \pm 24 \mu\text{g MC/L}$, mens forsøk 1 (50 x) har MC-konsentrasjon på gjennomsnittlig $120 \pm 5 \mu\text{g MC/L}$ ved eksperimentstart. Resultatene fra denne sammenlikningen viser at konsentrasjoner som nærmer seg yttergrensene for hva

ELISA analysen kan detektere kan være usikre. Konsentrasjonen kan være underestimert, variasjonen i resultatene kan bli store, og troverdigheten til resultatene kan være lavere.



Figur 3-6 Sammenlikning av MC-startkonsentrasjon forsøk 1(250 x) og forsøk 1(50 x).

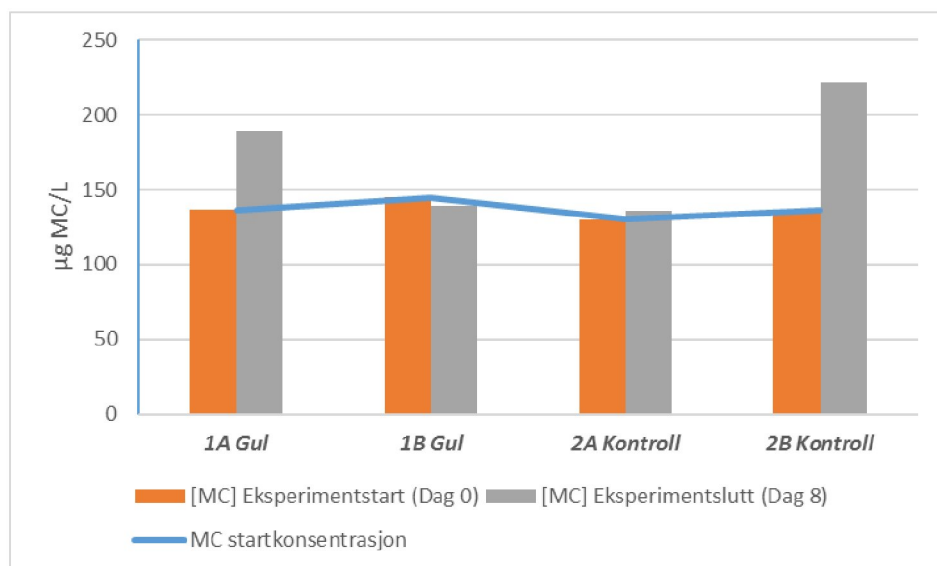
3.3.6. Forsøk 5: Bekreftelse på resultater fra tidligere MC-nedbrytningsforsøk

Forsøk 5 ble utført for å konstatere om den gule bakterien bryter ned MC i kulturene eller ikke, siden det er denne bakterien som har vist antydning til nedbrytende aktivitet i forsøk 1 (250 x) og forsøk 3. To parallelle prøver med gul bakterie og to parallelle kontroller ble benyttet.

Startkonsentrasjonen av MC i prøvene var relativ lik, med et gjennomsnitt på 137 ± 6 µg MC/L (figur 3-7). Den høye MC-konsentrasjonen i forhold til de tidligere forsøkene skyldes blandeforholdet i prøven. MC-stamløsningen står for en større andel av blandingen enn i de tidligere forsøkene (tabell 2-1).

Det er ikke vist noen nedbrytning av MC i noen av prøvene i dette forsøket. Resultatene viser en økning i MC-konsentrasjonen i prøve 1A Gul og 2B Kontroll. Dette skyldes trolig at Termaks konstantskapet ikke virket som det skulle under inkubasjonstiden. Prøve 1A og 2B sto lengst bak i skapet og de er trolig blitt for varme og væske kan ha fordampet. Prøve 1B og 2A sto lengre frem i skapet og er trolig blitt kjølt ned ved at døren på skapet

har stått på gløtt for å ikke bli for varmt. Ideelt sett burde prøvebeholderne ha stått med lik avstand fra døren. Dette ble det ikke tatt hensyn til ettersom temperaturforholdet i skapet skal være omtrent det samme uavhengig hvor i skapet prøvene står når kjølingssystemene fungerer optimalt.



Figur 3-7 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 8) for forsøk 5 ved 50 x fortyning.

3.4. Refleksjon over metode og funn

Det er ikke påvist MC-nedbrytning av betydning i noen av forsøkene gjennomført i denne studien. Det er mulig at forholdene under forsøkene ikke har vært optimale for bakteriell nedbrytning av MC. Studier viser at faktorer som pH, MC-konsentrasjon, temperatur, tilvenningsfase og vekstmedier kan ha betydning for bakteriell nedbrytning av MC. Trolig er det også visse egenskaper som må være tilstede for at heterotrofe bakterier skal kunne bryte ned MC.

3.4.1. pH

Okano, et al. (2009) undersøker aktiviteten til MC-nedbrytende bakterier ved ulike pH, har vist at det er forskjell på hvilke forhold som gir bakteriell vekst, og hvilke forhold som fremmer nedbrytende aktivitet. *Sphingopyxis* sp. C-1 vokser ved pH helt opp til 11,0, men viser lite eller ingen nedbrytende aktivitet ved pH > 8,5. Trolig er pH mer avgjørende for

nedbrytningsaktivitet enn for vekst av bakterien (Okano, et al., 2009). Zhang, et al., (2015) viste at nedbrytningsaktiviteten til *Bacillus nanhaiensis* JZ-2013 økte når pH ble justert fra 6 til 8, og at nedbrytningsaktiviteten ble redusert når pH ble endret fra 8 til 9. De oppnådde høyest nedbrytning ved pH 8. Ma, et al., (2014) har også vist at optimal pH for nedbrytning under anoxiske forhold er 8.

pH er ikke kontrollert under forsøkene i denne studien og kanskje har ikke pH vært optimal for nedbrytningsaktivitet. Vekstmediet som er benyttet, Nutrient Broth nr 2, skal ha en pH på $7,5 \pm 0,2$ når det er ferdig blandet. En *M. aeruginosa* kultur i O₂-medium laget ved Høgskolen i Telemark (i dag HSN) har pH på ca 8,5 (Sørensen, 2015). Det er derfor sannsynlig at pH under dette forsøket har vært rundt 7-8,5 og innenfor optimal pH for MC-nedbrytning.

3.4.2. MC-konsentrasjon

Nybom, et al., (2007) har vist at MC-konsentrasjon kan ha en innvirkning på nedbrytning. De viste høyere nedbrytningsprosent ved høyere MC-konsentrasjon. Shimizu, et al., (2011) har vist at MC inducerer aktivitet av MC-nedbrytende enzymer. Trolig vil derfor MC-konsentrasjonen i prøven ha betydning for nedbrytning av MC også under denne studien.

MC-konsentrasjonen under forsøkene i denne studien har vært ca 120 µg MC/L, og har i følge undersøkelsene til Nybom, et al., (2007) hatt en MC-konsentrasjon som er høy nok til å inducere nedbrytningsaktivitet.

3.4.3. Temperatur og tilvenningsfase

Temperatur er vist å ha en innvirkning på MC-nedbrytning. Fra ulike undersøkelser ser en at temperaturer mellom 20 °C og 37 °C er de optimale temperaturene for nedbrytning (Nybom, Salminen, & Meriluoto, 2007; Chen, et al., 2010; Ho, et al., 2010; Ma, et al., 2014; Zhang, et al., 2015).

Temperaturen under forsøkene i denne studien skulle vært $25 \text{ °C} \pm 1$ som innenfor det intervallet som er optimal temperatur for nedbrytningsaktivitet. Med problemer med

kjølingssystemet på termaksskapet er det uvisst eksakt hvilken temperatur skapet har hatt, og temperaturen kan ha oversteget 25 °C.

Ho, et al., (2010) og Ma, et al., (2014) har vist at bakterienes tilvenningsfase kan være avhengig av temperatur. Ho, et al., (2010) har vist at MC-nedbrytning ved 22 °C krever tilnærmet ingen tilvenningsfase, mens nedbrytning med samme bakterie ved 10 °C har en tilvenningsfase på rundt 9 dager. Ma, et al., (2014) viser en 4 dagers tilvenning ved 15 °C og kun 1 dag ved 35 °C.

Ved en temperatur på 25 °C er det derfor mulig at det kreves en slik tilvenningsfase, og med lengste inkubasjon på kun ti dager vil kanskje eksperiment lengden ha vært for kort. Trolig burde forsøkene i denne studien hatt lengre inkubasjonstid.

3.4.4. Vekstmedium

Vekstmedium og næringsinnhold kan være av betydning for bakteriell nedbrytning av MC. Zhang, et al., (2015) tilførte glukose ($C_6H_{12}O_6$) og ammoniumklorid (NH_4Cl) i M9 medium og økte nedbrytningsprosenten med 10 % i prøvene, samt at den bakterielle veksten ble bedre. Chen, et al., (2010) tilførte glukose, ammoniumklorid og natriumnitrat ($NaNO_3$) i anaerobt sterilisert deionisert vann tilsatt innsjøsediment. Glukose hadde i denne undersøkelsen ingen signifikant virkning på nedbrytningen i prøvene. Ammoniumklorid i høye konsentrasjoner hadde en negativ virkning på nedbrytningsaktiviteten. Natriumnitrat viste negativ effekt og utsatte MC-nedbrytningen ved alle konsentrasjoner testet (0, 20, 100 og 1000 mg/L^{-1}). Natriumnitrat forlenget tilvenningsfasen med 7 dager.

Vekstmediet som er benyttet i denne undersøkelsen (O₂-medium) inneholder 500 mg $NaNO_3/L$. Natriumnitrat i O₂-mediet kan ha utsatt nedbrytning og ført til at tilvenningsfasen til bakteriene ble lengre enn inkubasjonstiden på eksperimentene.

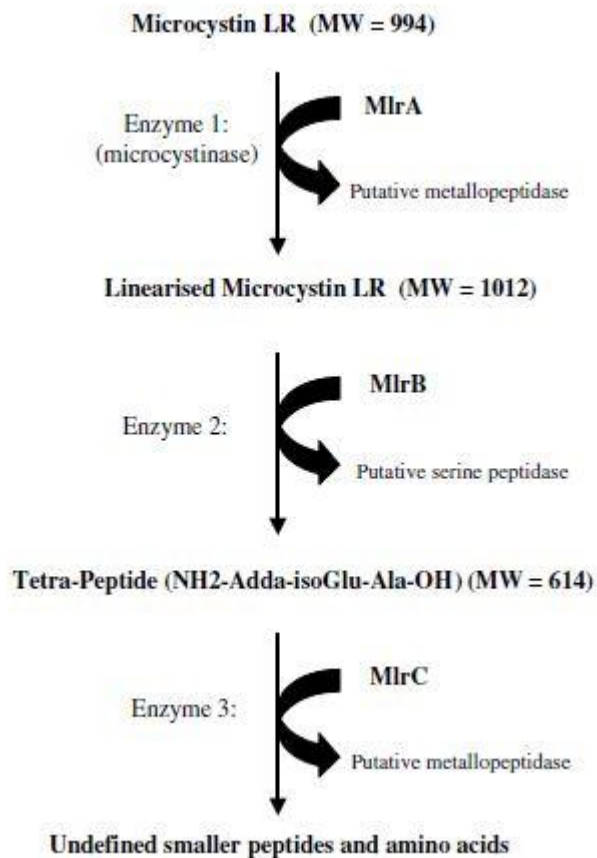
3.4.5. Bakterienes egenskaper

En annen årsak til at nedbrytning ikke er funnet sted under denne studien, kan også være at bakteriene ikke har de egenskapene som trengs for å bryte ned MC.

I dag kjenner vi rundt 20 arter av bakterier som er vist å kunne bryte ned MC. De fleste av bakteriene tilhører α -proteobakteriene, β -proteobakteriene og actinobakteriene (Kormas & Lympelopoulou, 2013). Lite er kjent om hvordan selve prosessen foregår, og hvilke mekanismer som står bak nedbrytningen (Shimizu, et al., 2011).

Bourne, et al., (1996) forsøkte å beskrive nedbrytningsruten til MC-LR ved bakterien *Sphingomonas*. De finner to mellomprodukter de kaller nedbrytningsprodukt A og B. Nedbrytningsprodukt A er hydrolysert MC-LR (lineært MC-LR), mens nedbrytningsprodukt B er et tetrapeptid. De mener at tre forskjellige enzymer står bak mekanismen til selve nedbrytningen. Enzym 1, microcystinase, katalyserer omdanningen av MC-LR til nedbrytningsprodukt A (syklisk MC-LR til lineært MC-LR). Enzym 2, peptidase 2, katalyserer omdanningen av nedbrytningsprodukt A til nedbrytningsprodukt B (lineært MC-LR til tetrapeptid). Enzym 3, peptidase 3, katalyserer videre nedbrytning av produkt B (mindre peptider og aminosyrer). Enzym 1 ansees som det viktigste enzymet, ettersom dette er det enzymet som åpner den stabile ringstrukturen og gir en 160-gangers reduksjon i giftigheten av molekylet. Bourne, et al., (2001) har sett videre på nedbrytningsproduktene og enzymene som er med på nedbrytningen (figur 3-8).

De har oppdaget en samling gener de har kalt mlr-gener. Dette er gener som koder for de ulike enzymene som står for nedbrytningen. De har gitt enzymene nye navn etter genene som koder for dem. Genet mlrA koder for enzymet MlrA (tidligere kalt microcystinase), mlrB koder for MlrB (tidligere peptidase 2) og mlrC koder for MlrC (tidligere peptidase 3). I denne gensamlingen er det også oppdaget et 4. gen mlrD som koder for proteinet MlrD. Dette proteinet er antatt å være et transporterprotein, som står for å transportere MC og dets nedbrytningsprodukter inn i cellene. Bourne, et al., (2001) konkluderer med at enzymene MlrA, MlrB og MlrC trolig utfører aminolyse, mens MlrD antageligvis forenkler opptak av små peptider som dannes. Funksjonen av MlrD er enda uklar.



Figur 3-8 Nedbrytningsprosessen til MC-LR beskrevet av Bourne et. al. (2001)

I andre undersøkelser har man i tillegg til de to mellomproduktene kommet fram til et sluttprodukt. Bourne, et al., (2001) viser at tetrapeptidet brytes ned til mindre peptider og aminosyrer. Fra disse mindre peptidene og aminosyrene er Adda blitt isolert som sluttprodukt (Harada, et al., 2004; Imanishi, Kato, Mizuno, Tsuji, & Harada, 2005).

Shimizu, et al., (2011) har undersøkt hva som fremkaller nedbrytningsaktivitet hos utvalgte MC-nedbrytende bakterier (*Paucibakter toxinivorans* og *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2). De har kommet fram til at MC stimulerer aktiviteten til de MC-nedbrytende enzymene. De antyder også at det antakeligvis bare er hos de gramnegative bakteriene at mlr-genene er ansvarlige for MC-nedbrytning. De fleste MC-nedbrytende bakteriene som er oppdaget tilhører de gramnegative bakteriene, men det er også funnet grampositive bakterier med MC-reduserende egenskaper (Nybom, Salminen, & Meriluoto, 2007; Manage, Edwards, Singh, & Lawton, 2009; Nybom, et al., 2012). Mlr-genene er ikke så langt påvist hos noen av de grampositive MC-nedbrytende bakteriene

(Nybom, et al., 2012) med unntak av *Bacillus sp. EMB* (Hu, Zhang, Liu, & Wang, 2012). I undersøkelsen til Hu, et al. (2012) ble *mlrA* påvist, men antakeligvis er dette ett tilfelle av horisontal overføring av genet fra en annen slekt siden det ikke tidligere er bekreftet funn av dette genet hos *Bacillus sp* (Hu, Zhang, Liu, & Wang, 2012). MC-nedbrytning ved fravær av *mlr*-genene tyder på at det trolig finnes andre nedbrytningsmekanismer som enda ikke er karakterisert (Manage, Edwards, Singh, & Lawton, 2009).

MC-nedbrytning under anaerobe forhold er også dokumentert (Chen, et al., 2010; Ma, et al., 2014). Chen, et al., (2010) har vist at MC-LR effektivt kan brytes ned uten oksygen tilstede. I undersøkelsen er det benyttet stedeagne bakteriesamfunn fra innsjøsediment som bryter ned MC-LR og reduserer toksisiteten. De påviste Adda som sluttprodukt slik som annen forskning har vist, men fant ingen andre mellomprodukter som inneholdt Adda. Bakteriesamfunnet ble undersøkt for *mlr*-genene men det ble ikke påvist. Hva som driver nedbrytningsprosessen eller hvordan den foregår når *mlr*-genene ikke er til stede er foreløpig ukjent.

Nybom, et al., (2012) har gjennomført MC-nedbrytningsforsøk med probiotiske melkesyrebakterier. De har undersøkt i GenBank om det forekommer *mrl*-gener hos melkesyrebakterier, men har ikke funnet noen bakterier med denne gen-samlingen. Til tross for at bakteriene ikke har *mlr*-genene bryter de ned MC. Nybom, et al., (2012) har ikke oppdaget de nedbrytningsproduktene som andre tidligere har beskrevet, men har heller ikke klart å identifisere noen nye. De har motbevist fysisk absorpsjon til bakteriecellene som kilde til MC reduksjon, ettersom de oppnådde høyest reduksjon med levedyktige bakterier. De viser at MC-nedbrytningsprosessen hos probiotiske bakterier er en biologisk prosess, hvor intracellulær protease (spalting av protein/peptid inne i bakteriecellen) er utelukket (Nybom, Salminen, & Meriluoto, 2007; Nybom, et al., 2012). Dette betyr at de har oppdaget en nedbrytningsmekanisme som skiller seg fra den Bourne, et al., (2001) beskriver. Nybom, et al., (2012) antyder at enzymer bundet til cellens yttervegg er med på MC-nedbrytningen og at det ikke foregår intracellulært slik som hos *Sphingomonas sp.*

Det er tydelig at det er gode muligheter for å kunne benytte en rekke bakterier som MC-nedbrytere. Det er enda mye en ikke vet om prosessene, men en vet at de prosessene som er karakterisert trolig ikke er de eneste. Trolig finnes det mange ulike gener og mekanismer bak den bakterielle nedbrytningen av MC.

4. Konklusjon

Hypotesen for denne studien var at kontaminanter i en *M. aeruginosa* kultur kunne bryte ned MC. Etter denne studien kan det hevdes at det sannsynligvis ikke foregår nedbrytning av MC i disse kulturene, under de forholdene kulturene er undersøkt. Hypotesen må derfor avvises.

Nedbrytning av MC er avhengig av en rekke faktorer som pH, MC-konsentrasjon, temperatur, vekstmedium og at bakteriene har egenskaper som er nødvendige for MC-nedbrytning. Trolig har ikke forholdene vært ideelle for nedbrytning under forsøkene.

Vekstmediet som er brukt i denne studien inneholder NaNO_3 , som er vist å utsette bakteriell nedbrytning av MC og forlenge tilvenningsfasen til bakteriene. Kanskje kan dette ha ført til at bakteriene har trent en tilvenningsfase i prøvene som har vært lengre enn inkubasjonstiden i forsøkene. Siden bakteriene ikke er undersøkt for mrl-gener kan det ikke utelukkes at bakteriene kan ha disse genene, eller andre mekanismer som kan føre til MC-nedbrytning. Det er derfor viktig å ta med seg at nedbrytning kanskje kan forekomme med disse bakteriene under andre forhold. Bakterieslekten *Arthrobacter sp.* er tidligere vist å ha MC nedbrytende egenskaper.

Det er sannsynligvis flere ulike gener og mekanismer som kan indusere bakteriell nedbrytning av MC. Det kunne vært interessant å undersøke om noen av bakteriene i denne studien har mrl-genene, og gjennomført forsøkene igjen ved lavere fortykning, et annet vekstmedium og med lengre inkubasjonstid.

5. Referanser

- Azevedo, S. M., 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, ss. 441-446.
- Boopathi, T., & Ki, J.-S. (2014). Impact of Environmental Factors on the Regulation of Cyanotoxin Production. *Toxins*, 6, ss. 1951-1978.
- Bourne, D. G., Jones, G. J., Blakeley, R. L., Jones, A., Negri, A. P., & Riddles, P. (1996). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl Environ Microbiol*, 62 (11), 4086-4094.
- Bourne, D. G., Riddles, P., Jones, G. J., Smith, W., & Blakeley, R. L. (2001). Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology*, 16 (6), ss. 523-534.
- Chen, W., Song, L., Peng, L., Wan, N., Zhang, X., & Gan, N. (2008). Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions. *Water Research*, 42, ss. 763-773.
- Chen, X., Yang, X., Yang, L., Xiao, B., Wu, X., Wang, J., & Wan, H. (2010). An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. *Water Research*, 44, ss. 1884-1892.
- Cheng, Y. S., Zhou, Y., Irvin, C. M., Kirkpatrick, B., & Backer, L. C. (2007, 5). Characterization of Aerosols Containing Microcystin. *Marine Drugs*, ss. 136-150.
- Codd, G. A., Bell, S. G., Kaya, K., Ward, C. J., Beattie, K. A., & Metcalf, J. S. (1999). Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 34, ss. 405-415.
- Corbel, S., Mougin, C., & Bouaïcha, N. (2014). Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phtytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96, ss. 1-15.
- de la Cruz, A. A., Antoniou, M. G., Hiskia, A., Pelaez, M., Song, W., O'Shea, K. E., . . . Dionysion, D. D. (2011). Can we effectively degrade microcystins? - implications on human health. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11 (1), ss. 19-37.

- Gjølme, N., Krogh, T., & Utkilen, H. C. (2010). *Cyanobakterier (blågrønnalger) - Oppblomstring og toksinproduksjon, 2014:4*. Oslo: Nasjonalt Folkehelseinstitutt - avdeling for vannhygiene.
- Harada, K.-i., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., & Tsuji, K. (2004). Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, *44*, ss. 107-109.
- Ho, L., Hoefel, D., Palazot, S., Sawade, E., Newcombe, G., Saint, C. P., & Brookes, J. D. (2010). Investigation into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, *180*, ss. 628-633.
- Ho, L., Sawade, E., & Newcombe, G. (2011). Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal - A review. *Water Research*, *46*, ss. 1536-1548.
- Hogg, S. (2013). *Essential Microbiology*. West Sussex: Wiley-Blackwell a Jhon Wiley & Sons, Ltd Publication.
- Hu, L., Zhang, F., Liu, C., & Wang, M. (2012). Biodegradation of Microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. *Energy Procedia*, *16*, ss. 2054-2059.
- Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Tsuji, K., & Harada, K.-i. (2005). Bacterial Degradation og Microcystins and Nodularin. *Chemical Research in Toxicology*, *18*, ss. 591-598.
- Kalff, J. (2001). Kap 4: Water Resources, Water Pollution, and Inland Waters. I J. Kalff, & J. Kalff (Red.), *Limnology : Inland Water Ecosystems* (ss. 41-52). New Jersey: Prentice HALL.
- Kormas, K. A., & Lympelopoulou, D. S. (2013). Cyanobacterial Toxin Degrading Bacteria: Who Are They? *BioMed Research International*, ss. 1-12.
- Kupier-Goodman, T., Falconer, I., & Fitzgerald, J. (1999). Kap 4 Human Health Aspects. I I. Chorus, J. Bartram, I. Chorus, & J. Bartram (Red.), *Toxic Cyanobakteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* (ss. 125-160). London: F & FN Spon.
- Lawton, L. A., Welgamage, A., Manage, P. M., & Edwards, C. (2011). Novel bacterial strains of the removal of microcystins from drinking water. *Water & science Technology*, *63*, ss. 1137-1142.
- Ma, G., Pei, H., Hu, W., Xu, X., Ma, C., & Li, X. (2014). The Removal of Cyanobacteria and Their Metabolotes Through Anoxic Biodegradation in Drinking Water Sludge. *Bioresource Technology*, *165*, ss. 191-198.

- Manage, P. M., Edwards, C., Singh, B. K., & Lawton, L. A. (2009). Isolation and Identification of Novel Microcystin-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (21), ss. 6924-6928.
- Merwe, D. v., Sebbag, L., Nietfeld, J. C., Aubel, M. T., Foss, A., & Carney, E. (2012). Investigations of a *Microcystis aeruginosa* cyanobacterial freshwater harmful algal bloom associated with acute microcystin toxicosis in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, ss. 679-687.
- Nybom, S. M., Salminen, S. J., & Meriluoto, J. A. (2007). Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 270, ss. 27-33.
- Nybom, S. M., Salminen, S. J., & Meriluoto, J. A. (2008). Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. *Toxicon*, 52, ss. 214-220.
- Nybom, S., Dziga, D., Heikkilä, J., Kull, T., Salminen, S., & Meriluoto, J. (2012). Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria. *Toxicon*, 59, ss. 171-181.
- Okano, K., Shimizu, K., Kawauchi, Y., Maseda, H., Utsumi, M., Zhang, Z., . . . Sugiura, N. (2009). Characteristics of a Microcystin-Degrading Bacterium under Alkaline Environmental Conditions. *Journal of Toxicology*, ss. 1-8.
- Ramani, A., Rein, K., Shetty, K. G., & Jayachandran, K. (2012). Microbial degradation of microcystin in Florida's freshwaters. *Biodegradation*, 23, ss. 35-45.
- Rastogi, R. P., Sinha, R. P., & Incharoensakdi, A. (2014). The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 13, ss. 215-249.
- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K., Itayama, T., Kawauchi, Y., Chen, R., . . . Sugiura, N. (2011). How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity. *Lakes & Reservoirs - Research and Management*, 16, ss. 169-178.
- Sivonen, K., & Jones, G. (1999). Kap 3: Cyanobacterial Toxins. I I. Chorus, J. Bartram, I. Chorus, & J. Bartram (Red.), *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* (ss. 55-124). London: E & FN Spon.

- Sørensen, T. (2015). Vekst og toksinnhold hos *Microcystis aeruginosa* i batch kultur, som funksjon av lysintensitet og fosfatmengder - Masteroppgave. Bø i Telemark: Høgskolen i Telemark.
- Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Suzuki, M., & Harada, K. (1994). Stability of microcystin from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environmental Science & Technology*, 28, ss. 173-177.
- Van Liere, L., & Mur, L. R. (1978, 21). Light limited cultures of the blue-greenalgae *Oscillatoria agardhii*. *Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie*, ss. 158-167.
- Welker, M., & Steinberg, C. (1999). Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Water Research*, 33 (5), ss. 1159-1164.
- Westrick, J. A., Szlag, D. C., Southwell, B. J., & Sinclair, J. (2010). A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, ss. 1705-1714.
- Widerström, M., Wiström, J., Sjösedt, A., & Monsen, T. (2012). Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, ss. 7-20.
- Zhang, J., Shi, H., Liu, A., Cao, Z., Hao, J., & Gong, R. (2015). Identification of a New Microcystin-Degrading Bacterium Isolated from Lake Chaohu, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94, ss. 661-666.

6. Internett referanser

- Abraxis LLC. (u.d.). *Microcystins-ADDA (Microliter Plate): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Congener-Independent* Determination of Microcystins and Nodularins in Water Samples*. Hentet April 18, 2016 fra <http://www.abraxiskits.com/wp-content/uploads/2014/08/Microcystin-PL-ADDA-Users-Guide-ETV-R082714.pdf>
- Bruker Daltonik Inc. (2014). *MALDI Biotyper CA System - Clinical Application for Identification of Microorganisms*. Hentet Mai 4, 2016 fra https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/MALDI_Biotyper_C_A_brochure_03-2015_eBook.pdf
- Kenyon college. (2015, September 14). *Microbe Wiki*. Hentet Mai 4, 2016 fra <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrobacter>
- WHO. (2016). *Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water - Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water*. Hentet Mai 13, 2016 fra http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/cyanobactoxins.pdf

7. Oversikt over tabeller og figurer

Figur 2-1 Oppbygning av petriskål til diffusjonstest ved agarbrønn diffusjon metode.

Tabell 2-1 Oversikt over forsøk 1-5 som er gjennomført i denne studien. Tabellen inneholder informasjon om hvilke bakterier som er testet, innholdet i prøvene og andre faktorer som lyseksposering, temperatur, omrøring og lengde på eksperiment.

Figur 2-2 Petriskål for diffusjonstest før inkubasjon. Bakteriene er tilsatt i NB-softagar. Fem brønner ble fylt med ulike medier. To med ren NB-løsning, to med NB-løsning tilsatt MC-stamløsning og en med ren MC-stamløsning.

Tabell 2-2 Oppsett av brønnerader med standarder og prøver for ELISA Microcystin (Abraxis) analyse ved INHM. Standard 0 og 5 oppføres i duplikat, standard 1-4 oppføres enkle. Alle prøver er analysert med minst ett duplikat.

Figur 3-1 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 8) for forsøk 1 ved 250 x fortynning.

Tabell 3-1 Resultater fra identifisering av bakteriene ved Maldi-Toff Biotyper.

Figur 3-2 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 10) for forsøk 2 ved 250 x fortynning.

Figur 3-3 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 6) ved forsøk 3 ved 250 x fortynning.

Figur 3-4 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 5) for forsøk 4 ved 50 x fortynning.

Figur 3-5 Gjennomsnittsverdier for MC-konsentrasjonen ($\mu\text{g/L}$) ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 8) ved forsøk 1 ved 50 x fortynning.

Figur 3-6 Sammenlikning av MC-startkonsentrasjon forsøk 1(250 x) og forsøk 1(50 x).

Figur 3-7 Gjennomsnittsverdier av MC-konsentrasjonen ved eksperimentstart (Dag 0) og eksperimentslutt (Dag 8) for forsøk 5 ved 50 x fortynning.

Figur 3-8 Nedbrytningsprosessen til MC-LR beskrevet av Bourne et. al. (2001).

8. Vedlegg

8.1. Vedlegg 1: O₂-medium (Van Liere & Mur, 1978) brukt til MC-stamløsning.

(Tabellen er omskrevet)

O ₂ -medium	
NaNO ₃	500 mg/L
K ₂ HPO ₄	25 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	13 mg/L
Mikroelementløsning	1 ml/L tilsatt medium før autoklaving
Fe- Løsning	10 ml/L tilsatt medium etter autoklaving
NaHCO ₃ -Løsning	5 ml/L tilsatt medium etter autoklaving
Mikroelementløsning (skal ikke autoklaveres, sett kaldt)	
H ₃ BO ₃	2,86 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81 g/L
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ ·4H ₂ O	0,002 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08 g/L
Fe-Løsning (Autoklaver løsningen)	
10 ml FeCl ₃ -løsning	2,80 g FeCl ₃ løst i 100 ml 0,1 N HCl
9,5 ml EDTA-løsning	3,90 g EDTA-Na ₂ løst i 100 ml 0,1 N NaOH
1000 ml dH ₂ O	
NaHCO ₃ -Løsning	
Lag en blanding med 20 mg NaHCO ₃ /ml	
Sterilt filtreres i passende flaske.	

8.2. Vedlegg 2: Metodebeskrivelse fra Abraxis, ELISA Microcystin-analyse



Microcystins-ADDA ELISA (Microtiter Plate)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Congener-Independent* Detection of Microcystins and Nodularins in Water Samples

Product No. 520011

1. General Description

The Abraxis Microcystins-ADDA ELISA is an immunoassay for the quantitative and sensitive congener-independent* detection of Microcystins and Nodularins in water samples. This test is suitable for the quantitative and/or qualitative detection of Microcystins and Nodularins in water samples. Please refer to the appropriate technical bulletins for sample collection, handling, and treatment of drinking (treated and untreated) and recreational water samples. If necessary, positive samples can be confirmed by HPLC, protein phosphatase assay, or other conventional methods.

2. Safety Instructions

The standard solutions in the test kit contain small amounts of Microcystins. The substrate solution contains tetramethylbenzidine (TMB) and the stop solution contains diluted sulfuric acid. Avoid contact of the TMB and stopping solution with skin and mucous membranes. If these reagents come in contact with skin, wash with water.

3. Storage and Stability

The Microcystins-ADDA ELISA kit should be stored in the refrigerator (4–8°C). The solutions must be allowed to reach room temperature (20–25°C) before use. Reagents may be used until the expiration date on the box. Consult state, local, and federal regulations for proper disposal of all reagents.

4. Test Principle

The test is an indirect competitive ELISA for the congener-independent detection of Microcystins and Nodularins. It is based on the recognition of Microcystins, Nodularins, and their congeners by specific antibodies. Toxin when present in a sample and a Microcystins-protein analogue immobilized on the plate compete for the binding sites of the anti-Microcystins/Nodularins antibodies in solution. The plate is then washed and a second antibody-HRP label is added. After a second washing step and addition of the substrate solution, a color signal is generated. The intensity of the blue color is inversely proportional to the concentration of Microcystins present in the sample. The color reaction is stopped after a specified time and the color is evaluated using an ELISA reader. The concentrations of the samples are determined by interpolation using the standard curve constructed with each run.

5. Limitations of the Microcystins-ADDA ELISA, Possible Test Interference

Numerous organic and inorganic compounds commonly found in water samples have been tested and found not to interfere with this test. However, due to the high variability of compounds that may be found in water samples, test interferences caused by matrix effects cannot be completely excluded.

Samples containing methanol must be diluted to a concentration < 5% methanol to avoid matrix effects.

Seawater samples must be diluted to a concentration $\leq 2.5\%$ to avoid matrix effects. Alternately, if a lower detection limit is required, interfering compounds can be removed from seawater or brackish water samples prior to analysis. Please see the Microcystins in Brackish Water or Seawater Sample Preparation for the Microcystins-ADDA ELISA Technical Bulletin (available upon request).

No matrix effects have been observed with samples which have been treated with sodium bisulfate at concentrations ≤ 1 mg/mL or ascorbic acid at concentrations ≤ 1 mg/mL.

Mistakes in handling the test kit can cause errors. Possible sources for such errors include: inadequate storage conditions of the test kit, incorrect pipetting sequence or inaccurate volumes of the reagents, too long or too short incubation times during the immune and/or substrate reaction, and extreme temperatures during the test performance (lower than 10°C or higher than 30°C).

As with any analytical technique (GC, HPLC, etc.), positive results requiring regulatory action should be confirmed by an alternative method.

Importance of Microcystins/Nodularins Determination

Most of the world's population relies on surface freshwaters as its primary source for drinking water. The drinking water industry is constantly challenged with surface water contaminants that must be removed to protect human health. Toxic cyanobacterial blooms are an emerging issue worldwide due to increased source water nutrient pollution caused by eutrophication. Microcystins and Nodularins are cyclic non-peptides. Microcystins (of which there are many structural variants, or congeners) have been found in fresh water throughout the world. To date, approximately 80 variants of Microcystin have been isolated. The most common variant is Microcystin-LR. Other common Microcystin variants include YR, RR, and LW. These toxins are produced by many types of cyanobacteria (blue-green algae), including *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, and terrestrial *Hapalosiphon*. Nodularins are produced by the genus *Nodularia* and are found in marine and brackish water.

Acute poisoning of humans and animals constitutes the most obvious problem from toxic cyanobacterial blooms, and in several cases has led to death. Human and animal exposure to these toxins occurs most frequently through ingestion of water, through drinking or during recreational activities in which water is swallowed. These toxins mediate their toxicity by inhibiting liver function and are potent inhibitors of the serine/threonine protein phosphatases, and therefore may act as tumor promoters.

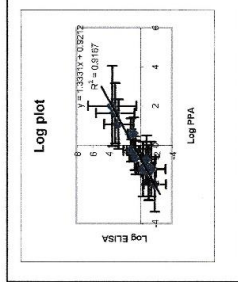
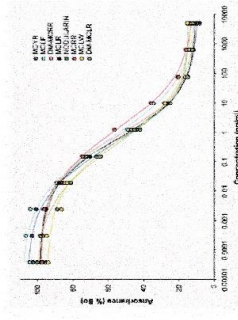
To protect consumers from adverse health effects caused by these toxins, the World Health Organization (WHO) has proposed a provisional upper limit for Microcystin-LR of 1.0 ppb ($\mu\text{g/L}$) in drinking water.

Performance Data

The detection limit for this assay, based on MC-LR, is 0.10 ppb ($\mu\text{g/L}$).

Test reproductibility: Coefficients of variation (CVs) for standards: <10%; for samples: <15%.

Selectivity*: The assay exhibits very good cross-reactivity with all cyanobacterial cyclic peptide toxin congeners listed to date (see cross-reactivity illustration below).



Samples: Sample correlation between HPLC, PPA, and ELISA methods showed a good correlation (see ELISA and PPA correlation above).

General Limited Warranty/Disclaimer: Abraxis LLC warrants the products manufactured by the Company, against defects and workmanship when used in accordance with the applicable instructions for a period not to extend beyond the product's printed expiration date. Abraxis LLC makes no other warranty, expressed or implied. There is no warranty of merchantability or fitness for a particular purpose. The performance of commercial ready technologies under specific criteria, testing conditions, and other factors may vary. The Company does not warrant the performance of this product, nor does it make any explicit or implied warranties or guarantees as to product performance. www.abraxiskits.com

For ordering or technical assistance contact:

Abraxis LLC
54 Stearnsville Drive
Stearnsville, PA 15784
Tel: (412) 357-4314
Fax: (412) 357-4322
Email: info@abraxiskits.com
WEB: www.abraxiskits.com



R082714

F. Assay Procedure

1. Add 50 μ L of the standard solutions, control, or samples into the wells of the test strips according to the working scheme given. Analysis in duplicate or triplicate is recommended.
2. Add 50 μ L of the antibody solution to the individual wells as successively using a multi-channel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with paraffin or tape and mix the contents by moving the strip holder in a circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill the contents. Incubate the strips for 10 minutes at room temperature.
3. Remove the covering and decant the contents of the wells into a sink. Wash the strips three times using the 1X wash buffer solution. Please use at least a volume of 250 μ L of wash buffer for each well and each washing step. Remaining buffer in the wells should be removed by patting the plate dry on a stack of paper towels.
4. Add 100 μ L of the enzyme conjugate solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with paraffin or tape and mix the contents by moving the strip holder in a circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill the contents. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature.
5. Remove the covering and decant the contents of the wells into a sink. Wash the strips three times using the 1X wash buffer solution. Please use at least a volume of 250 μ L of wash buffer for each well and each washing step. Remaining buffer in the wells should be removed by patting the plate dry on a stack of paper towels.
6. Add 100 μ L of substrate (color) solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with paraffin or tape and mix the contents by moving the strip holder in a circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill the contents. Incubate the strips for 20-30 minutes at room temperature. Protect the strips from sunlight.
7. Add 50 μ L of stop solution to the wells in the same sequence as for the substrate (color) solution using a multi-channel pipette or a stepping pipette.
8. Read the absorbance at 450 nm using a microplate ELISA photometer within 15 minutes after the addition of the stopping solution.

G. Evaluation

The evaluation of the ELISA can be performed using commercial ELISA evaluation programs such as 4-Parameter (preferred) or 5-Parameter (optional) for a manual evaluation, calculate the mean absorbance value for each of the standards and %B/B₀ for each standard by dividing the mean absorbance value for each standard by the %B/B₀ of the Standard (Standard 0) mean absorbance. Construct a standard curve by plotting the %B/B₀ for each standard on the vertical axis (Y) against the corresponding Microcystins concentration on the horizontal logarithmic (X) axis on graph paper. Adjust for the control and samples with their yield levels in ppb of Microcystins by interpolation along the standard curve. Results can also be determined using a spreadsheet macro available from Abraxis upon request.

The concentrations of the samples are determined using the standard curve run with each test. Samples showing a lower concentration of Microcystins than standard 1 (0.15 ppb) should be reported as containing < 0.15 ppb of Microcystins. Samples showing a higher concentration than standard 5 (5.0 ppb) must be diluted to obtain accurate results. The concentration of the positive control provided should be 0.75 \pm 0.185 ppb.

Semi-quantitative results can be derived by simple comparison of the sample absorbances to the absorbances of the calibrators. Samples with lower absorbances than a calibrator will have concentrations of Microcystins greater than that calibrator. Samples which have higher absorbances than a calibrator will have concentrations of Microcystins less than that calibrator.

H. References

- (1) W.J. Fischer, J. Garthwaits, C.O. Miles, K.M. Ross, J.B. Aggen, A.R. Chamberlin, N.A. Towers, and D.R. Dietrich. Congener-independent Immunassay for Microcystins and Nodularins. Environ. Sci. Technol. 35: 2001-4949-4956.
- (2) Worldwide Patenting PCT WO 01/18059 A2.
- (3) U.S. Patent Number 6,967,240.

A. Materials Provided

1. Microtiter plate (12 X 6 strips) coated with an analog of Microcystins conjugated to a protein
2. Standards (6) and Control (1): 0, 0.15, 0.40, 1.0, 2.0, 5.0 ppb; Control at 0.75 \pm 0.185 ppb
3. Sample Diluent (for dilution of samples above the range of the curve)
4. Antibody Solution
5. Anti-Sheep-HRP Conjugate Solution
6. Wash Solution (5X) Concentrate, must be diluted prior to use, see Test Preparation (Section D)
7. Substrate (Color) Solution (TMB)
8. Stop Solution

B. Additional Materials (not delivered with the test kit)

1. Micro-pipettes with disposable plastic tips (20-200 μ L)
2. Multi-channel pipette (50-300 μ L) or stepper pipette with plastic tips (50-300 μ L)
3. Deionized or distilled water
4. Paper towels or equivalent absorbent material
5. Timer
6. Tape or paraffin
7. Microtiter plate reader (wavelength 450 nm)
8. Microtiter plate washer (optional)

C. Sample Collection and Handling

Collect water samples in glass or PETG containers and test within 24 hours. Drinking water samples should be treated with sodium thiosulfate immediately after collection (refer to appropriate technical bulletin). If samples must be held for longer periods (up to 5 days), samples should be stored refrigerated. For storage periods greater than 5 days, samples should be stored frozen.

If total Microcystins concentration (free and cell bound) is required, an appropriate cell lysis procedure (freeze and thaw, QuikLyse™, etc.) must be performed prior to analysis. *Note: The use of sonication in cell lysis can negatively affect toxin concentrations, producing falsely low sample results. Please see the appropriate sample preparation technical bulletin for additional information on cell lysis.*

Samples may be filtered prior to analysis using glass fiber filters (Environmental Express 1.2 μ m syringe filters (Environmental Express part number SF0125) are recommended). If determining total Microcystins concentration, samples should be lysed prior to filtration to prevent the removal of cell-bound Microcystins, which would cause inaccurate (falsely low) results. *Note: The use of alternate filter types (non-glass fiber filters) may produce falsely low sample results, as Microcystins may bind to the filter material, removing it from the sample.*

D. Test Preparation

Micro-pipetting equipment and pipette tips for pipetting the standards and the samples are necessary. A multi-channel pipette or a stepping pipette is recommended for the addition of the antibody, enzyme conjugate, substrate, and stop solutions in order to equalize the incubation periods on the entire microtiter plate. Please use only the reagents and standards from one kit in one test, as they have been adjusted in combination.

1. Allow the reagents and samples to reach ambient temperature before use.
2. Remove the number of microtiter plate strips required from the resealable pouch. The remaining strips are stored in the pouch with the desiccant (tightly sealed).
3. The standards, control, sample diluent, antibody, enzyme conjugate, substrate, and stop solutions are ready to use and do not require any further dilutions.
4. Dilute the Wash Solution (5X) Concentrate at a ratio of 1:5 with deionized or distilled water. If using the entire bottle (100 mL), add to 400 mL of deionized or distilled water and mix thoroughly.

E. Working Scheme

The microtiter plate consists of 12 strips of 8 wells, which can be used individually for the test. The standards must be run with each test. Never use the values of standards which have been determined in a test performed previously.

A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
C	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
D	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
E	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
F	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
G	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
H	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
I	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
J	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
K	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
L	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank

Sd1 0-Std5: Standards
 Contr.: Control
 Samp1, Samp2, etc: Samples

8.3. Vedlegg 3: Resultater fra Biotyping ved Unilabs, Skien

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: 20150924-B-MK
 Project Description:
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2015-09-24T13:31:00.075
 Project Analyte Count: 31
 Project Type: Development
 Validation: not present
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
D3 (+)(B)	GREY BIG	Arthrobacter polychromogenes	<u>1.769</u>	not reliable identification	<u>1.548</u>
D4 (+)(B)	GREY BIG	Arthrobacter polychromogenes	<u>1.862</u>	not reliable identification	<u>1.668</u>
D5 (+)(B)	GREY BIG	Arthrobacter polychromogenes	<u>1.837</u>	not reliable identification	<u>1.614</u>
D6 (+)(B)	HVIT	Staphylococcus saprophyticus	<u>1.883</u>	Staphylococcus saprophyticus	<u>1.818</u>
D7 (++)(A)	HVIT	Staphylococcus saprophyticus	<u>2.114</u>	Staphylococcus saprophyticus	<u>1.872</u>
D8 (+)(B)	HVIT	Staphylococcus saprophyticus	<u>1.925</u>	Staphylococcus saprophyticus	<u>1.865</u>
D9 (-)(C)	GUL	not reliable identification	<u>1.395</u>	not reliable identification	<u>1.29</u>
D10 (-)(C)	GUL	not reliable identification	<u>1.419</u>	not reliable identification	<u>1.338</u>
D11 (-)(C)	GUL	not reliable identification	<u>1.38</u>	not reliable identification	<u>1.28</u>

8.4. Vedlegg 4: Rådata fra ELISA Microcystin (Adda) analyser. MC konsentrasjon i µg/L.

Forsøk 1	250 x [MC] Dag 0	250 x [MC] Dag 8	[MC] Dag 0	[MC] Dag 8
1. Gul bakterie	0,28	0,17	70	42,9
	0,70	0,25	174	63
Gjennomsnitt	0,49	0,21	122,01	53,21
Standard avvik	0,29	0,06	73,45	14,52
2. <i>Arthrobacter sp.</i>	0,25	0,24	63	59
	0,25	0,34	63	85
Gjennomsnitt	0,25	0,29	63,09	71,81
Standard avvik	0,00	0,07	0,55	18,19
3. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,42	0,50	105	124
	0,29	0,24	72	59
Gjennomsnitt	0,35	0,37	88,41	91,54
Standard avvik	0,10	0,18	23,88	46,09
4. Kontroll	0,33	0,32	84	80
	0,38	0,34	94	86
Gjennomsnitt	0,35	0,33	88,74	82,99
Standard avvik	0,03	0,02	7,22	3,86

Forsøk 2	250 x [MC] Dag 0	250 x [MC] Dag 10	[MC] Dag 0	[MC] Dag 10
1. Gul bakterie	0,28	0,28	70,29	69,98
	0,21	0,33	53,06	82,92
Gjennomsnitt	0,25	0,31	61,68	76,45
Standard avvik	0,05	0,04	12,19	9,15
2. Gul bakterie inkubert m/ MC	0,33	0,30	82,92	74,16
	0,27	0,27	66,63	66,63
Gjennomsnitt	0,30	0,28	74,78	70,40
Standard avvik	0,05	0,02	11,52	5,33
3. Miks	0,44	0,27	109,86	67,83
	0,40	0,50	99,14	123,93
Gjennomsnitt	0,42	0,38	104,50	95,88
Standard avvik	0,03	0,16	7,58	39,67
4. Kontroll	0,35	0,29	87,04	72,80
	0,27	0,26	68,09	65,41
Gjennomsnitt	0,31	0,28	77,56	69,11
Standard avvik	0,05	0,02	13,40	5,23

Vedlegg 4 fortsetter

Forsøk 3	250 x [MC] Dag 0	250 x [MC] Dag 6	[MC] Dag 0	[MC] Dag 6
1. Gul bakterie	0,38	0,21	96,09	52,06
inkubert m/ MC	0,32	0,24	79,63	59,01
	0,26	0,25	64,53	61,99
	0,49	0,27	121,80	68,40
	0,26	0,31	64,24	77,87
	0,31	0,32	76,49	79,28
Gjennomsnitt	0,34	0,27	83,80	66,43
Standard avvik	0,09	0,04	22,00	10,78
2. Gul bakterie	0,24	0,42	60,61	105,51
	0,49	0,29	121,26	71,55
	0,29	0,37	72,17	92,82
	0,39	0,28	96,96	69,57
	0,40	0,38	98,96	95,46
	0,43	0,34	108,08	86,02
Gjennomsnitt	0,37	0,35	93,01	86,82
Standard avvik	0,09	0,06	22,63	14,08
3. Miks	0,28	0,31	70,13	77,83
	0,29	0,33	72,13	81,33
	0,27	0,38	67,38	94,95
	0,33	0,22	82,98	54,45
	0,38	0,35	94,32	87,63
	0,27	0,12	67,92	31,23
Gjennomsnitt	0,30	0,28	75,81	71,24
Standard avvik	0,04	0,10	10,71	23,91
4. Kontroll + NB	0,26	0,41	64,71	102,49
	0,24	0,29	60,69	73,18
	0,24	0,45	59,09	112,24
	0,38	0,34	94,59	85,45
	0,33	0,25	82,76	63,68
	0,16	0,28	40,21	70,87
Gjennomsnitt	0,27	0,34	67,01	84,65
Standard avvik	0,08	0,08	19,16	19,19
5. Kontroll	0,17	0,14	42,01	33,77
	0,24	0,18	60,82	44,92
	0,20	0,15	50,89	38,43
	0,23	0,17	58,16	42,20
	0,27	0,19	67,68	48,24
	0,24	0,17	58,95	43,15
Gjennomsnitt	0,23	0,17	56,42	41,78
Standard avvik	0,04	0,02	8,87	5,08

Vedlegg 4 fotsetter

Forsøk 4	50 x [MC] Dag 0	50 x [MC] Dag 5	[MC] Dag 0	[MC] Dag 5
1-2. Ufiltrert kontroll m/NB	2,70	2,20	135,16	110,05
	2,66	1,99	132,93	99,35
	2,65	2,52	132,38	126,13
	2,94	2,90	146,87	145,17
Gjennomsnitt	2,74	2,40	136,83	120,17
Standard avvik	0,14	0,40	6,80	19,97
3-4. Ufiltrert kontroll u/NB	2,46	2,36	122,97	118,09
	2,49	2,07	124,51	103,48
	2,48	2,57	124,00	128,60
	2,88	2,44	144,01	122,19
Gjennomsnitt	2,58	2,36	128,87	118,09
Standard avvik	0,20	0,21	10,11	10,66
5-6. Filtrert kontroll m/NB	2,34	2,47	116,86	123,47
	2,14	2,18	107,09	109,11
	2,20	2,65	109,79	132,74
	2,44	2,65	121,82	132,74
Gjennomsnitt	2,28	2,49	113,89	124,52
Standard avvik	0,13	0,22	6,70	11,16
7-8. Filtrert kontroll u/NB	1,96	2,43	97,84	121,67
	1,96	2,36	97,84	118,09
	2,32	2,48	116,02	123,76
	2,31	2,40	115,54	120,12
Gjennomsnitt	2,14	2,42	106,81	120,91
Standard avvik	0,21	0,05	10,36	2,40

Forsøk 1 (50 x)	50 x [MC] Dag 0	50 x [MC] Dag 8	[MC] Dag 0	[MC] Dag 8
1. Gul bakterie	2,48	2,51	124,24	125,29
	2,26	2,86	113,21	142,81
Gjennomsnitt	2,37	2,68	118,72	134,05
Standard avvik	0,16	0,25	7,79	12,39
2. <i>Arthrobacter sp.</i>	2,19	2,69	109,45	134,61
	2,42	2,72	121,13	135,76
Gjennomsnitt	2,31	2,70	115,29	135,19
Standard avvik	0,17	0,02	8,26	0,81
3. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,50	2,47	124,76	123,71
	2,32	2,47	116,12	123,71
Gjennomsnitt	2,41	2,47	120,44	123,71
Standard avvik	0,12	0,00	6,11	0,00
4. Kontroll	2,55	2,45	127,60	122,33
	2,48	2,45	123,89	122,33
Gjennomsnitt	2,51	2,45	125,74	122,33
Standard avvik	0,05	0,00	2,63	0,00

Vedlegg 4 fortsetter

Forsøk 5	50 x [MC] Dag 0	50 x [MC]Dag 8	[MC] Dag 0	[MC] Dag 8
	2,68	3,54	134,23	177,22
1A. Gul bakterie	2,77	4,03	138,43	201,54
Gjennomsnitt	2,73	3,79	136,33	189,38
Standard avvik	0,06	0,34	2,98	17,20
	2,96	2,81	148,01	140,59
1B. Gul Bakterie	2,84	2,75	142,04	137,72
Gjennomsnitt	2,90	2,78	145,03	139,16
Standard avvik	0,08	0,04	4,22	2,03
	2,80	2,70	139,87	134,92
2A. Kontroll	2,41	2,73	120,48	136,31
Gjennomsnitt	2,60	2,71	130,17	135,62
Standard avvik	0,27	0,02	13,71	0,99
	2,74	4,63	137,02	231,58
2B. Kontroll	2,70	4,24	134,92	212,18
Gjennomsnitt	2,72	4,44	135,97	221,88
Standard avvik	0,03	0,27	1,48	13,72