

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

# Výskyt neurotoxinu BMAA ve stojatých vodách

Vypracovala: Lenka Kosová

Školitel: RNDr. Petr Znachor, Ph.D

České Budějovice, 2016

Kosová L. 2016: Výskyt BMAA ve stojatých vodách [Occurrence of neurotoxin BMAA in fresh waters. Bc. Thesis, in Czech] – 31 p., Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace:**

Tato bakalářská práce shrnuje poznatky o sinicích a jejich produktu neurotoxické aminokyselině BMAA. Práce je koncipována jako grantová žádost na financování projektu, jehož cílem je zkoumat stojaté vody v České republice na přítomnost neurotoxinu BMAA v závislosti na množství a složení fytoplanktonu.

### **Annotation:**

This bachelor thesis summarizes knowledge about cyanobacteria and their neurotoxic second metabolite non-protein amino acid  $\beta$ -N-methyl-L-alanine (BMAA). The thesis includes a project proposal to study amount of neurotoxin BMAA in fresh waters depending on amount and composition of phytoplankton.

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 13. prosince 2016

.....

Lenka Kosová

## Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Petrovi Znachorovi, Ph.D. za to, že jsem s ním mohla pracovat, za vedení této práce, veškerou pomoc, čas, cenné připomínky, vstřícný a upřímný přístup a hlavně trpělivost.

Chci rovněž poděkovat RNDr. Pavlu Rychteckému, Ph.D. za ochotu, věnovaný čas čtení mé práce, podporu a pozitivní energii.

Děkuji také RNDr. Jiřímu Káňovi, Ph.D., který mi vždy velmi ochotně pomohl a poradil, našel si čas na čtení práce a její zhodnocení.

Dále mé poděkování patří Prof. Ing. Janu Třískovi, CSc za pomoc, věcné rady a připomínky.

Na závěr děkuji všem, kteří si přečetli mou práci a své rodině.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Cíle práce .....	1
1.2.	Ekosystémy stojatých vod.....	1
1.3.	Fytoplankton .....	2
1.3.1.	<i>Sinice ve stojatých vodách .....</i>	<i>3</i>
1.3.2.	<i>Vodní květy.....</i>	<i>5</i>
<b>2</b>	<b>Sekundární metabolity .....</b>	<b>7</b>
2.1.	Biologická funkce sekundárních metabolitů.....	8
2.2.	Rozdělení cyanotoxinů.....	8
2.2.1.	<i>Neurotoxiny.....</i>	<i>10</i>
2.3.	BMAA .....	10
2.3.1.	<i>Výzkum BMAA ve sladkých vodách .....</i>	<i>13</i>
2.3.2.	<i>Zhodnocení metodických možností .....</i>	<i>14</i>
<b>3</b>	<b>Návrh projektu.....</b>	<b>15</b>
3.1.	Cíle projektu.....	15
3.2.	Hypotézy – Očekávané výstupy projektu .....	15
3.3.	Způsob dosažení cílů.....	15
3.3.1.	<i>Výběr lokalit.....</i>	<i>15</i>
3.3.2.	<i>Terénní měření a odběr vzorků.....</i>	<i>15</i>
3.3.3.	<i>Laboratorní analýzy.....</i>	<i>17</i>
3.3.4.	<i>Statistické vyhodnocení dat.....</i>	<i>19</i>
3.3.5.	<i>Časový plán.....</i>	<i>19</i>
3.3.6.	<i>Finanční plán.....</i>	<i>19</i>
3.4.	Závěr .....	22
<b>4</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>23</b>

# 1 Úvod

$\beta$ -N-methyl-L-alanin (BMAA) je nově objevený toxin, u něhož je velmi málo známé jeho rozšíření v životním prostředí, a rovněž je poměrně málo známé působení na organismy, které s tímto toxinem přijdou do kontaktu. Ve větších koncentracích je spouštěčem řady neurodegenerativních onemocnění, např. amyotrofické laterální sklerózy (ALS), parkinsonovy choroby (PD) (Rao *et al.*, 2006) anebo také demence známé jako ALS-PCD (Bradley & Mash, 2009).

Jedná se o sekundární metabolit některých sinic, často nacházený tam, kde probíhá symbióza s rostlinou. Např. sinicovní symbionti rodu *Nostoc* produkují BMAA v kořenech a hlízách cykasů (Garruto & Yase., 1986; Spencer *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1989). Poprvé byla přítomnost tohoto toxinu prokázána v roce 1967 u druhu *Cycas micronesica* (Vega & Bell, 1967). Znalosti ohledně produkce BMAA symbiotickými sinicemi byly záhy podnětem pro analýzy volně žijících sinic (Cox *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2005). Výzkumy vedou až do vodních ekosystémů, jelikož vody obsahují značné množství sinic, které mohou být zdrojem BMAA a ohrožovat tak lidské zdraví, stejně tak jako zdraví jiných organismů (Faassen *et al.* 2012; Lage *et al.*, 2015; Hammerschlag *et al.*, 2016; Popova & Koksharova, 2016). K vážným účinkům BMAA na organismy dochází kvůli schopnosti bioakumulace BMAA potravními řetězci. Tímto způsobem může BMAA končit i v potravě, kterou konzumují lidé (Jonasson *et al.*, 2010).

Většina odborných článků týkajících se BMAA se zabývá výskytem a biakumulací v mořích nebo terestrických ekosystémech, zatímco množství studií zkoumající výskyt ve stojatých vodách je stále značně omezené (Cox *et al.*, 2003; Lage *et al.*, 2015).

## 1.1. Cíle práce

- 1) Literární shrnutí problematiky sinic a produkce sekundárních metabolitů s užším zaměřením na  $\beta$ -N-methyl-L-alanin (BMAA).
- 2) Návrh projektu zaměřeného na zjištění přítomnosti BMAA ve stojatých vodách v závislosti na množství a složení fytoplanktonu.

## 1.2. Ekosystémy stojatých vod

Stojaté vody jsou na rozdíl od řek význačné absencí jednosměrného proudění vody (*Adámek et al., 2010*). Z hlediska koloběhu látek jsou stojaté vody izolovanějším systémem než vody tekoucí, jelikož nedochází k tak časté výměně vody (*Kalff, 2001*).

Je rozlišováno několik typů stojatých vod. Nejčastěji jsou to rybníky, jezera a přehradní nádrže. Mezi stojaté vody je možné také zahrnout močály a rašeliniště, rovněž tůně, jezírka a menší periodicky se vyskytující stojaté vody, které ovšem tato práce nenavrhuje k výzkumu.

V České republice se nachází jen několik přírodních jezer. Nalézáme zde však četné člověkem vytvořené ekosystémy stojatých vod, zejména rybníky a přehrady (*Patera, 2002*). Rybníky vznikaly na našem území již od středověku a do dnešních dob slouží především k chovu ryb (*Adámek et al., 2010*). V mnoha případech se jedná o mělké polymiktické nádrže, jejichž velikost může být menší než jeden hektar nebo naopak dosahovat i několika km<sup>2</sup>. Hloubka rybníků bývá v průměru 0,6 m a nejhlubší místo u výpustě nedosahuje často ani 1,5 m (*Patera, 2002*).

Přehradní nádrže vznikají zpravidla přehrazením původního říčního údolí (*Adámek et al., 2010*). Na rozdíl od přírodních jezer, nádrže mají většinou podlouhlý tvar, proto hovoříme o tzv. kaňonovitém typu nádrží. Využívají se např. jako zdroje pitné vody, k zadržení vody při povodních, jako vyhledávané rekreační lokality a k výrobě elektrické energie (*Patera, 2002*).

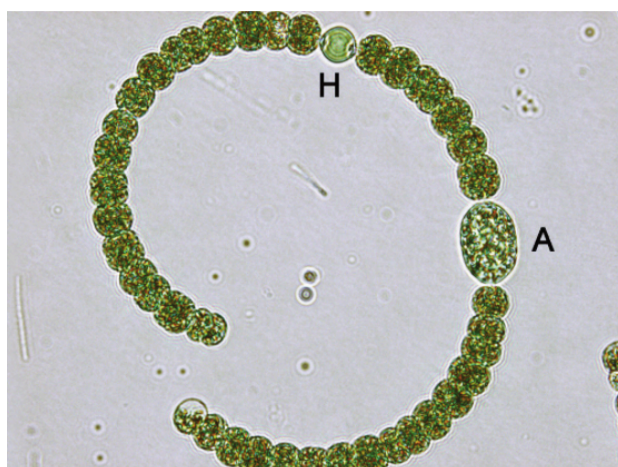
## 1.3. Fytoplankton

Fytoplanktonem rozumíme společenstvo mikroskopických řas a sinic přizpůsobených životu ve vodním sloupci (*Anneville et al., 2004*). Z ekologického hlediska jsou řasy a sinice primárními producenty, kteří s pomocí světla a fotosyntetických pigmentů přeměňují oxid uhličitý na organické látky, které jsou dostupné ostatním článkům potravního řetězce. Představují tak základ potravních řetězců ve vodních ekosystémech (*Reynolds, 2006*). Důležitým parametrem pro rozvoj fytoplanktonu je obsah živin. Živiny mohou přicházet do vodního ekosystému v organické i anorganické podobě (*Jeppensen et al., 2007*). Proces, při kterém dochází k obohacování vody živinami, se nazývá eutrofizace (*Vollenweider, 2001*) a z velké části souvisí s lidskou činností (*Anderson et al., 2002*). Eutrofizace může vést k masivnímu rozvoji sinic.

### 1.3.1. Sinice ve stojatých vodách

Sinice jsou skupinou prokaryotických organismů a nejstaršími fotoautotrofními organismy na Zemi. Vznik sinic je datován do období před 3,5 mld let (*Holland et al., 2013; Schopf, 2000*). Sinice jsou rozšířeny po celém světě (*Badger et al., 2006*). Vyznačují se svou přizpůsobivostí extrémním podmínkám. V eutrofních vodních ekosystémech často dominují (*Pizzolon et al., 1999*).

Sinice se určují zejména mikroskopicky. Pro určení je důležitým znakem morfologie stélek. Mohou mít několik typů stélek, jednobuněčné a mnohobuněčné (*Whitton, 2012*). Vlákňité sinice se rozlišují na větvené a nevětvené, kde se rozlišují ještě typy větvení na pravé a nepravé. Ve všech případech se sinice mohou vyskytovat jednotlivě, nebo vytvářet kolonie. Solitérní planktonní sinice i kolonie mohou být obaleny slizem (*Whitton, 2012*).



Obr. č.1: Rod *Dolichospermum* (dříve *Anabaena*): heterocyt (H) a akineta (A), ostatní buňky jsou vegetativní (*Šejnohová a Maršálek; 2005*).

Stélky sinic se mohou skládat z několika specifických typů buněk - vegetativních buněk, akinet a heterocytů (viz.obrázek č.1). Akinety jsou klidová stádia sinic, bývají ze všech buněčných typů největší a zajišťují sinicím přežití nepříznivých období (*Kaplan-Levy et al., 2010*). Jsou typické například pro skupinu *Nostocales* (*Kalina & Váňa; 2005*).

Heterocyty jsou dalšími typy buněk a právě díky přítomnosti heterocytů bývají vláknité formy sinic řádu *Nostocales*, *Stigonematales* (např. *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*) schopny fixace rozpuštěného dusíku (*Oliver & Ganf, 2000; Wood et al., 2010*). K vytvoření heterocytů dochází z vegetativních buněk v reakci na nízký obsah dusíkatých látek ve



vodním prostředí (Wood et al., 2010). Heterocyty jsou názorným příkladem prostorového oddělení fixujících buněk od buněk produkujících kyslík (Paerl, 1996). Kyslík působí inhibičně na enzym nitrogenázu, která je k fixaci dusíku potřebná a proto není možné, aby fixace probíhala aerobně.

Vyjma fixace dusíku za pomoci heterocytů existuje u sinic ještě druhý způsob. Využívají jej sinice řádu *Oscillatoriales* (Agawin et al., 2007). Mezi takové patří např. rod *Trichodesmium* anebo *Lyngbya aestuarii* (Kalina & Váňa; 2005). *Oscillatoriales* využívají časové oddělení doby produkce kyslíku od doby, kdy je syntetizována a využívaná nitrogenáza. Fixace dusíku se zde uskutečňuje v noci (Stal et al., 2010).

Dusík ale není jediný prvek, který si dokáží sinice samy obstarat. Uzpůsobené jsou taktéž nedostatku volného CO<sub>2</sub>, který dokáží uvolnit z aktivně přijímaného hydrogenuhlíčitanového iontu pomocí enzymu karboanhydrázy (Shapiro, 1997). Tento proces probíhá v karboxyzómech, což jsou útvary, které obsahují sinice uvnitř svých buněk. V karboxyzómech se nalézá také enzym RuBisCo, který je nezbytný pro fixaci CO<sub>2</sub> (Badger & Price, 2003). U sinic se obecně vyvinula kromě těchto ekofyziologických adaptací celá řada dalších (Litchman et al., 2010), jako například adaptace na příjem živin, ke které dochází při nízkých koncentracích fosforu ve vodě, kdy sinice uplatňují svou vysokou afinitu k příjmu fosforu (Healey, 1982). Pokud je fosforu ve vodě nadbytek, sinice jsou schopné si vytvářet vnitrobuněčné zásoby, které po vyčerpání fosforu v prostředí postačují na několik buněčných dělení (Reynolds, 2006).

Oproti ostatním skupinám bakterií, mají sinice jakožto fotosyntetické bakterie výhodu ve své schopnosti fotosyntézy. Uvnitř buněk se vedle dalších buněčných organel nacházejí velké nápadné membrány označované jako thylakoidy, které obsahují fotosyntetický aparát. Fotosyntetické pigmenty jsou uloženy v bílkovinných strukturách na povrchu thylakoidů (Osborne & Raven, 1986). Kromě chlorofylu-a mají sinice i řadu doplňkových fotosyntetických pigmentů např. modrý fykocyanin a červený fykoerythrin. Fotosyntetické pigmenty zvyšují účinnost fotosyntézy a díky nim mohou sinice fotosyntetizovat i ve velkých hloubkách. Tyto pigmenty je chrání také proti škodlivému slunečnímu UV záření. U sinic byly zjištěny i další pigmenty nacházející se uvnitř thylakoidu např. karotenoidy a xanthofyly (v závislosti na druhu např. zeaxanthin, echinenon, kantaxantin, myxoxantofyl). Je nutné zmínit, že existuje u sinic i výjimka, u které thylakoidy chybí - rod *Gloeobacter*. Fykobilizómy se pak nacházejí na plazmatické membráně (Kalina & Váňa; 2005).

Další výraznou kompetiční výhodou sinic označujeme výrazem alelopatie. Pod tímto pojmem chápeme toxický a zároveň inhibující efekt sinic na zooplankton nebo i na jiné druhy fytoplanktonu (*Wiegand et al., 2005*).

Kromě toho planktonní sinice mají zpravidla vyšší růstové teplotní maximum než většina eukaryotních řas (*Whitton, 2012*). Teplota, kromě přímého vlivu na rychlost růstu sinic, významně ovlivňuje stabilitu vodního sloupce, což souvisí se zřejmě nejvýznamnější adaptací sinic k planktonnímu způsobu života. Tato adaptace je spojena s využitím plynových měchýřků sdružujících se do aerotopů. Aerotopy jsou válcovité struktury, které mají sinice uvnitř svých buněk. Aerotopy udržují buňky ve vznosu a zpomalují jejich sedimentaci (*Walsby, 1994*). Sinice mohou pomocí nich měnit dle potřeby svou pozici ve vodním sloupci. Mohou využívat jak eufotickou vrstvu pro světlo, tak hypolimnion pro dostatek živin (*Bormans et al., 1999*).

Za vhodných podmínek (stratifikace, teplé počasí) se opakuje často stejný vzorec chování sinic daný omezenou funkčností plynových měchýřků. Po nějaké době dochází k zhroucení měchýřků, tím jak sinice fotosyntetizují, čerpají a shromažďují živiny z prostředí, tak rostou a vzrůstá v buňkách i tlak. Měchýřky podléhají hydrostatickému tlaku 200-1000 Pa (*Kalina & Váňa; 2005*). Zhroucení měchýřků doprovází často vyčerpání živin a může k němu dojít i společně s inhibicí fotosyntézy doprovázenou přehřátím buněk při příliš intenzivním světelném záření (*Kinsman et al; 1991*). Nemusí tím být zasažena celá populace, ale jen část, která kvůli neschopnosti nadnášení se klesne do větších hloubek. Ve vrstvách vody, kam takto klesne, není dostatek světla pro fotosyntézu. V této situaci využijí sinice své vnitrobuněčné zásoby (*Kromkamp & Walsby, 1990*). Po čase se plynové měchýřky a jejich funkce opět obnoví. Pak mohou sinice znovu vystoupat s pomocí aerotopů k hladině. Aerotopy vlastní často právě koloniální druhy sinic, které tvoří vodní květy (*Dokuli & Teubner, 2000*).

### 1.3.2. Vodní květy

#### **Vznik vodního květu**

Vodní květ definujeme jako hromadné přemnožení sinic či řas viditelné pouhým okem (*Kaff, 2001*).

Hlavní příčinou častého výskytu vodních květů sinic je nadměrné množství živin ve vodě, zejména fosforu (*Fott et al., 1980*). Hlavním zdrojem fosforu bývají nedostatečně

vyčištěné komunální odpadní vody, fosfor se však do povrchových vod může dostávat také z plošných zdrojů, např. erozí půdních částic (*Hellsten et al., 2007*). Pokud dojde k vyčerpání kyslíku u dna, může se fosfor uvolňovat i ze sedimentu (*Nürnberg et al., 1986*). Kromě vysokých koncentrací fosforu ve vodě se na masovém rozvoji sinic podílí i řada dalších faktorů jako teplota a teplotní stratifikace vodního sloupce, struktura potravních sítí, počasí, doba zdržení vody v systému a intenzita průtoku (*Schreurs, 1992; Kaff, 2001, Mayer et al., 1997*).

Jezera a nádrže jsou v našich klimatických podmínkách pravidelně míchány, přičemž míchání se uskutečňuje dvakrát ročně, na jaře a na podzim. Tento jev je významným faktorem ovlivňujícím míru růstu populace sinic během roku (*Anneville et al., 2004*). Zima je obdobím, ve kterém sinice přečkávají v sedimentu, ale mohou se nacházet i ve volné vodě a jejich biomasa je obvykle v sezonním minimu (*Visser et al.; 2005*). Díky vzestupu teplot se vodní sloupec začíná míchat, protože zahřívání horní vrstva vody postupuje do nižších vrstev vodního sloupce v důsledku vyrovnání energie. Pozvolné jarní míchání pomáhá sinicím dostat se do volné vody. V tomto období ale nejsou tolik konkurenčně silné, aby se staly hlavní a převažující složkou fytoplanktonu. Větší příležitost pro populaci sinic nastává při letní stratifikaci (*Paerl et al., 2011*). Stratifikace se začíná zlehka ustalovat již po překonání anomálie vody o teplotě 3,94°C. Teplejší voda získává nižší hustotu a zůstává nahoře. Rysem konkrétně letní stratifikace je, že studenější voda vespod je izolována od vrstvy teplé vody u hladiny (*Kaff, 2001*). Během období stabilní teplotní stratifikace v létě dochází při nadbytku živin k nárůstu populace sinic. Jestliže v období letní stratifikace sinice převládají ve vodním ekosystému nad ostatním fytoplanktonem, často přetrvávají až do období podzimního míchání, během kterého sinice ztrácí svoji kompetiční výhodu, jelikož klesá teplota a rozrušuje se stratifikace vodního sloupce. Sinice jsou na podzim nahrazeny jinými skupinami fytoplanktonu (*Anneville et al., 2004*).

V ekosystému stojatých vod existuje několik trofických úrovní, od mikrobiálního společenstva, přes řasy a sinice, zooplankton, bezobratlé, obojživelníky, ryby, až po ptáky a savce. Trofie souvisí se strukturou potravních sítí (*Mayer et al., 1997*). Příkladem mohou být některé menší rybniční nádrže, kde je vyvíjen poměrně silný predanční tlak na zooplankton a zoobentos planktivorními rybami, což vede k přítomnosti pouze malých druhů zooplanktonu, který nedokáže filtrovat větší druhy fytoplanktonu. Následně může docházet k abnormálnímu nárůstu sinic (*Fott et al., 1980*). Doba zdržení vody v systému a intenzita průtoku může měnit ve vodním ekosystému skladbu společenstva, ale například i chemismus vody (*Kalff, 2001*).

## Vliv vodního květu na ekosystém

Výskyt vodního květu hned z několika důvodů výrazně narušuje fungování dotčeného vodního ekosystému (*Reynolds, 1991*). První zjevný důsledek ke kterému ve vodě s vodním květem často dochází je kromě snížené průhlednosti razantní úbytek kyslíku ve vodě během noci (*Schreurs, 1992*). Jelikož přes den bývá v jezeře či nádrži množství kyslíku značně závislé na množství fotosyntetizujících organismů, přítomností mnoha sinic dochází k naprostému nasycení vody kyslíkem ve dne. S pozdním odpolednem, kdy slunce zapadá, jeho produkce klesá. Množství kyslíku zůstávajícího s koncem dne ve vodě závisí pouze na rozpustnosti kyslíku ve vodě při dané teplotě. Organismy, které přijímají v noci kyslík rozpuštěný ve vodě, včetně sinic, v tu chvíli kyslík spotřebovávají na respiraci. Než začnou fotosyntetické organismy dalšího dne produkovat opětovně kyslík, může se stát, že vlivem poklesu jeho množství již dochází nejen k odumírání buněk sinic ve spodních vrstvách květu, ale mohou pod vodním květem hynout ryby a jiné organismy, které jsou na rozpuštěném kyslíku ve vodě závislé (*Reynolds, 1991*).

S fotosyntézou sinic souvisí i další procesy jako například změny rovnováhy mezi jednotlivými formami kyseliny uhličitě (hydrogenuhličitanů a uhličitanů). Fotosyntetickou aktivitou vodního květu dochází během dne k posunu pH směrem k zásadité oblasti (pH 10 i více). Za těchto podmínek se rozpuštěné amonné ionty mění na nedisociovanou formu (NH<sub>3</sub>), která naleptává sliznice vodních organismů, zejména žábry (*Chorus & Bartram, 1999*).

Důsledkem vodního květu je přirozeně rovněž výrazná redukce biodiverzity (*Andersen, 1997*). Neopomenutelným problémem spojeným s výskytem vodního květu je produkce celé řady sekundárních metabolitů. Některé působí toxicky na organismy včetně člověka (*Hallegraef, 1993; Lindholm et al., 1989*). Typickými představiteli sladkovodních toxických planktonních sinic jsou rody *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* (dříve *Anabaena*), *Cylindrospermopsis* a *Planktothrix* (*Welker & von Dohren, 2006; Berg et al., 1986*).

## 2 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou biologicky aktivní sloučeniny, jejichž produkce je ovlivněna podmínkami prostředí (*Lukac & Aegerter, 1993*). Sinice produkují celou řadu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají pro člověka škodlivé účinky (*Lindholm et al., 1989*).

Sekundárních metabolity sinic s nežádoucími účinky jsou v literatuře často zmiňovány jako cyanotoxiny a jejich produkce bývá spojována právě s vodními květy (*Sivonen et al., 2008*). Cyanotoxiny bývají toxické na mnoha trofických úrovních – bakterie, protozoa, zooplankton, ryby, ptáci a savci (*Christoffersen, 1996*). Člověk a živočichové mohou být cyanotoxinům vystaveni dermálním kontaktem, pozřením anebo inhalací (*Campos & Vasconcelos, 2010*).

## 2.1. Biologická funkce sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity jsou syntetizované nejen sinicemi, řasami, rostlinami ale i mikroorganismy, a často slouží k ochraně a vznikají jako reakce na stres (u rostlin je stresem například sucho nebo napadení hmyzem). Co se týče biologické funkce u sinic není v mnoha případech zcela pochopena. Sekundární metabolity mohou vznikat z velké části už při samotném růstu organismu (*Neilan et al., 2012*). Pravděpodobně slouží jako ochrana proti predaci (*Demott, 1991*). Některé z metabolitů mají i antibiotické účinky, tudíž zřejmě slouží k ochraně proti parazitům. Další uvažovanou funkcí sekundárních metabolitů je zajištění přísunu živin, udržení homeostáze (*Gan et al., 2012*) nebo neutralizace oxidativního stresu (*Zilliges et al., 2011*). Také se odhaduje, že některé metabolity slouží k regulaci exprese genů a metabolických kaskád (*Kaebnick & Neilan, 2001*). Metabolity mohou představovat přizpůsobení se životnímu prostředí a umožňovat organismům, kteří je produkují, vyrovnat se změnami životního prostředí kolem nich (*Holland et al., 2013*). Pak mohou sloužit také k signalizaci mezi buňkami - přítomnost látek ostatním buňkám zřejmě naznačuje, že nastala stresová situace a je třeba se přizpůsobit (*Kaebnick & Neilan, 2001*).

## 2.2. Rozdělení cyanotoxinů

Cyanotoxiny jsou toxické sekundární metabolity, které je možné rozdělit na základě chemické struktury nebo mechanismu účinku (Tab.1; *Jones et al., 2009*). Hepatotoxiny primárně způsobují poškození jater, dermatotoxiny, mohou způsobit podráždění kůže (*Chorus, 1993; 1995*) a neurotoxiny mohou poškozovat nervový systém u lidí a živočichů (*Paerl et al., 2011*). Jednotlivé druhy sinic často mohou produkovat více toxických látek s odlišnými účinky, ale zároveň jeden určitý toxin je zpravidla produkován více druhy. Na povrchu buněk všech sinic jsou lipopolysacharidy, které mohou také působit jako toxin (*Zanchett & Oliveira-Filho, 2013*).

Tabulka č. 1: Základní rozdělení toxinů podle mechanismu účinku a chemické struktury  
(Zanchett & Oliveira-Filho, 2013).

Cyanotoxiny	Chemická struktura	Rody hlavních sinicových producentů
Hepatotoxiny		
Mikrocystiny	Cyklické heptapeptidy	<i>Microcystis</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaenopsis</i>
Nodulariny	Cyklické pentapeptidy	<i>Nodularia</i>
Cylindrospermopsiny	Guanidinové alkaloidy	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon</i> <i>ovalisporum</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
Dermatotoxiny		
Lyngbyatoxin-a	Alkaloid	<i>Lyngbya</i>
Aplysiatoxin	Alkaloid	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Neurotoxiny		
Anatoxin-a	Alkaloid	<i>Dolichospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Planktothrix</i>
Anatoxin-a(s)	Organofosfát	<i>Dolichospermum</i>
Saxitoxiny	Alkaloidy	<i>Anabaena circinalis</i> , <i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Aphanizomenon gracile</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i> , <i>Lyngbya wollei</i>

### 2.2.1. Neurotoxiny

Mezi neurotoxické cyanotoxiny řadíme anatoxin-a , anatoxin-a (s), a dále saxitoxiny. Tyto látky poškozují nervovou tkáň zpravidla tím, že blokují přenos nervových signálů. Konkrétní účinky závisí na typu organismu, na který působí, typu toxinu a jeho koncentraci (Landsberg, 2002). Na zooplankton neurotoxiny mohou působit tak, že omezují jeho pohyb, mohou zabránit růstu a množení populace a také způsobit kompletní paralýzu. Působení saxitoxinů na druh *Daphnia carinata* vystavením sinicím rodu *Aphanizomenon* způsobuje negativní změny v rychlosti pohybu hrudních nožek, což má za následek pomalejší růst a rozmnožování, kvůli nižšímu příjmu potravy (Haney et al., 1995).

Kromě působení na zooplankton byl zkoumán i vliv na jiné organismy. Vliv anatoxinu-a byl zkoumán na mladých tří měsíčních jedincích kaprů *Cyprinus carpio*. Byly zaznamenány změny v chování, které negativně ovlivňovaly interakce při hledání potravy. Při zkoumání velkých koncentrací anatoxinu-a na rybách dokonce zemřely všechny ryby po 24 až 29 hodinách (Osswald et al., 2007). To ukazuje, že neurotoxiny jsou velmi toxické (Mankiewicz et al., 2003). Při pokusech na myších neurotoxiny působily paralýzu dýchacích svalů a smrt selháním dýchacího ústrojí během několika minut (Mankiewicz et al., 2003).

Významným faktem je, že tyto toxiny jsou schopné se akumulovat v organismech a napříč potravními řetězci. U lidí mohou působit některé neurotoxiny velmi závažné otravy. Nejznámější je otrava saxitoxiny, která je známá jako paralytická otrava měkkýši. Efekt byl popsán z otravy lidí po konzumování kontaminovaných mlžů (Landsberg, 2002). Poprvé byly tyto toxiny izolovány z mořských obrněnek. Co se týče sladkých vod, nebyly zaznamenány otravy lidí saxitoxiny (Ferrao-Filho et al., 2010). V současnosti probíhá intenzivní výzkum neurotoxických látek a jsou objevovány stále nové toxiny.

### 2.3. BMAA

$\beta$ -N-methyl-L-alanin (BMAA) patří mezi nedávno objevené a doposud málo prostudované neurotoxiny. Je původcem neurodegenerativních onemocnění v Guamu, což bylo také potvrzeno tím, že BMAA byl nalezen ve vysokých koncentracích v mozkových tkání mrtvých osob v Guamu, které na neurodegenerativní onemocnění zemřely (Hirano et al., 1996; Lobner et al., 2007). U osob z Guamu, které neurodegenerativní onemocnění

neměly, BMAA v mozkových tkáních nalezen nebyl (*Hirano et al., 1966; Karlsson et al., 2009*). Tyto onemocnění svými projevy připomínají amyotrofickou laterální sklerózu (ALS), parkinsonovu chorobu (PD) nebo demenci (ALS-PCD) (*Rao et al., 2006; Bradley & Mash, 2009*). Do těl lidí se BMAA dostal potravním řetězcem.

BMAA produkují sinice rodu *Nostoc* v kořenech cykasů *Cycas micronesica* (také uváděného pod názvem *Cycas circinalis*) (*Vega & Bell, 1967*), ale toxin není přítomný pouze v místě produkce, ale v celé rostlině. V infikovaných kořenech cykasů byly nalezeny nízké koncentrace BMAA (2 µg/g), zatímco v listech a semenech byly koncentrace řádově vyšší (*Murch et al., 2004*). BMAA je často prokazatelný taktéž v malých koncentracích v promyté mouce, která se vyrábí z cykasových semen (*Duncan et al., 1990*). Toxin se také z cykasových semen dostává do těl mikronésijských kaloňů (*Pteropus mariannus*), kteří se semeny cykasů živí (*Cox & Sacks, 2002*). Při požití organismem je vyloučení BMAA z těla pro organismus velmi obtížné (*Murch et al., 2004*). Tradiční strava lidí z Guamu skládající se z mouky z cykasů, kaloňů ale i jiných zvířat krmnými cykasovými semeny obsahuje již relativně velké dávky toxinu přijímané v jejich potravě (*Cox et al., 2003*).

BMAA je neesenciální aminokyselinou a mechanismus působení spočívá v chybném zabudování BMAA do bílkovinných molekul místo L-serinu. To poté neumožňuje správnou fosforylaci mnoha proteinů v buňkách a způsobí jejich nefunkčnost. Mechanismus je umocněn bioakumulací v organismech, nicméně je zde dlouhá doba latence než se následky konzumace projeví, mohou to být roky i desetiletí, proto byl tento toxin Spencerem (2000) nazván jako tzv. „pomalý toxin“.

Od roku 2000 přibylo čteně studií zabývajících se spojitostí BMAA s neurodegenerativními onemocněními. Některé studie zvažují jiné zdroje neurotoxinu než jsou cykasy, jelikož přítomnost BMAA v mozkových tkáních byla zjištěna také u pacientů s Alzeihemerovou chorobou mimo západopacifický Guam, v zemích, kde se cykasy nenacházejí v tamní flóře (*Cox et al., 2005*), například u devíti kanadských pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (*Murch et al., 2004*). V mozkových tkáních těchto pacientů byly nalezeny vysoké koncentrace BMAA, zatímco u čtrnácti osob, které zemřely jinými příčinami než neurodegenerativními onemocněními BMAA nalezen nebyl. Tyto výsledky potvrdily další studie provedené u severoamerických pacientů (*Pablo et al., 2009*).

Nedávná studie také ukazuje, že u kočkodanů (*Chlorocebus pygerythrus*) krmných dávkami BMAA po dobu 140 dní došlo k poškození mozkových buněk, stejně jako je to možné vidět u pacientů s neurodegenerativními onemocněními jako jsou ALS nebo Alzheimerova choroba (*Cox et al., 2016*).



Znalosti ohledně produkce BMAA symbiotickými sinicemi byly záhy podnětem pro analýzy volně žijících sinic. Výzkumy vedou až do vodních ekosystémů, jelikož vody obsahují značné množství sinic a jiného fytoplanktonu, který by mohly být zdrojem BMAA. Poněkud snadnější a prokazatelnější detekce BMAA než ve sladkých vodách byla od počátku v oceánech a mořích (Cox et al., 2005; Jonasson et al., 2010; Mondo et al., 2012; Richardson, 2004). Jako první mimo Guam prokázal přítomnost a biakumulaci BMAA v životním prostředí výzkum proběhlý v Baltském moři. Ve vodách Baltského moře v letních měsících převládají sinice rodů *Nodularia* a *Aphanizomenon*, které fixují dusík. Hrají tak významnou roli v potravních řetězcích (Jonasson et al., 2010). V Baltském moři je na primárních producentech závislé značné množství zooplanktonu, a též ryb. Analýzami na kulturách bylo zjištěno, že sinice *Nodularia* a *Aphanizomenon* v Baltském moři produkují BMAA (Cox et al., 2005). BMAA zde bylo detekované v několika běžně lovených druzích ryb pro komerční trh. V jedné další studii z jižní Floridy byl BMAA nalezen přímo v organismu krabů druhu *Callinectes sapidus*, v mořských plžích a mlžích a i v dalších organismech na nižších trofických úrovních (Brand et al., 2010). Bioakumulaci toxinu v parybách na vrcholu potravních řetězců zase potvrzují výsledky výzkumů na žralocích (Hammerschlag et al., 2016). Akumulace toxinu v orgánech a svalech žraloků je velmi logická vzhledem k tomu, že se jedná o dlouhověké organismy. Největší koncentrace byla nalezena u kladivounů (Hammerschlag et al., 2016). Jejich kořistí jsou primárně krabi druhu *Callinectes sapidus*, kteří obsahovaly nejvyšší koncentrace toxinu zaznamenané u zvířat již podle studií Branda v roce 2010 (Hammerschlag et al., 2016). Žraloci jsou ale navíc častou pochoutkou lidí (hlavně asijských národů). Toxin byl také detekován v koloniích sinic jak v Jižní Africe (Esterhuizen & Downing, 2008), tak v Peru (Johnson et al., 2008), Číně (Li et al., 2010), USA (Brand et al., 2010), Německu (Contardo-Jara et al., 2014), Portugalsku (Cervantes et al., 2012), na Havaii (Banack et al., 2007), ale i v Indii a Austrálii (Cox et al., 2003). Kromě toho bylo zjištěno, že BMAA produkují nejen prokaryotické sinice, ale i eukaryotické řasy – rozsivky a obrněnky (Richardson, 2004; Lage et al., 2014). Spojení produkce BMAA s rozsivkami potvrzuje výzkum z oblasti Florida Bay, kde jsou v dominanci vodního květu právě rozsivky a kde byl toxin nalezen opakovaně (Richardson, 2004). Do souvislosti s obrněnkami je dán BMAA např. výzkumem z Portugalska, kde byl prokázán u mořské obrněnky *Gymnodinium catenatum* (Lage et al., 2014).

### 2.3.1. Výzkum BMAA ve sladkých vodách

O rozšíření toxinu BMAA ve sladkých vodách je dostupné mnohem menší množství odborné literatury než o jeho výskytu v mořských a terestrických ekosystémech.

Jedna velmi přehledná studie o přítomnosti toxinu ve Švédských jezerech byla zveřejněna nedávno (*Lage et al., 2015*). Pro výzkum bylo vybráno eutrofní jezero Finjasjön, z něhož byly na jaře a na podzim odebrány vzorky a také loveny ryby pro výzkum. Tři ze čtyřech odebraných vzorků vody BMAA obsahovaly - v průměru ve množství 0,003 µg na g sušiny. V této studii byl BMAA nalezen také v mozcích 50% zkoumaných jedinců cejnů velkých (*Abramis brama*), 28% v okounech říčních (*Perca fluviatilis*), 14% ve štikách obecných (*Esox lucius*), 14% v candátech obecných (*Sander lucioperca*) a 38% v ploticích obecných (*Rutilus rutilus*). Dva druhy ryb s největším množstvím BMAA v mozcích mají v jezeře obdobný styl života a podobnou potravu. Největší detekované množství 0.0283 µg/g bylo nalezeno v mozku samice okouna říčního chycené na jaře roku 2012. Ale ze všech zkoumaných ryb převládali samci, kteří měli v mozcích vyšší koncentraci BMAA ze všech zkoumaných. Obdobné je to s výsledkem, že ryby chytané na podzim měly větší výskyt BMAA v mozcích (37% všech zkoumaných ryb), zatímco na jaře menší (26 % všech zkoumaných ryb), ovšem největší koncentraci ze všech zkoumaných měla ona samice chycená na jaře. V ostatních orgánech bylo množství BMAA velmi nízké anebo nebylo přítomno vůbec, přičemž nález největších množství v ostatních orgánech nekoreloval s nálezy největšího množství v mozcích ryb stejných druhů (*Lage et al., 2015*).

### **Problémy s nepřesnou detekcí v minulosti**

Ve výzkumech se v minulosti objevovaly určité nesrovnalosti (*Cox et al., 2005, Esterhuizen & Downing, 2008; Jonasson et al., 2010; Metcalf et al., 2008; Rosén & Hellenäs, 2008*), zejména příliš vysoké koncentrace BMAA nacházené u fytoplanktonu. Např. ve studii Coxe v roce 2005 byl BMAA zjištěn v relativně velkých množstvích u 95 % všech analyzovaných sinic, ať už symbiotických (ve vodních rostlinách) tak volně žijících (*Cox et al., 2005*). Taktéž další výzkum temperátních stojatých sladkých vod podle Jonassona *et al.* (2009) ukazoval přítomnost BMAA ve všech studovaných vodních ekosystémech. Naopak řada dalších studií přítomnost toxinu nepotvrdila (*Faassen, 2014; Faassen et al., 2012; Faassen et al. 2009; Jonasson et al. 2010; Kruger et al. 2010; Esterhuizen & Downing 2008; Metcalf et al. 2008; Rosén & Hellenäs 2008*). Studie ukazující na celkem velké koncentrace

způsobily velké obavy, ale také pochyby. Nejednoznačnost výsledků mezi jednotlivými studii byla zpočátku přisuzována nestejněměrnému rozšíření toxinu v životním prostředí, stejně tak jako specifickým podmínkám při kterých by měl být toxin produkován. Později se studie začaly přiklánět k názoru, že nekonzistence výsledků vyplývá pravděpodobně spíše z rozdílné metodiky, než aby vyplývala z konkrétních ekologických a biologických podmínek. Je tedy důležité rozlišovat, kdy mají takové nesrovnalosti biologický původ a kdy naopak metodický (*Lage et al., 2015*).

### 2.3.2. Zhodnocení metodických možností

Pro detekci BMAA existuje celá řada metod, z jejichž vzájemného porovnání metod bylo zjištěno, že kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS), případně vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) jsou po derivatizaci vzorků dvěma z nejpřesnějších metod pro tento účel (*Faassen et al. 2012; Mondo et al, 2014; Jiang et al, 2012*).

Chromatografické stanovení je finančně náročné, naopak cenově dostupné a rychlé je imunologické stanovení pomocí ELISA kitu, které však patří k těm metodám, jež výsledky nadhodnocují (*Faassen et al., 2013*).

Obecně u většiny používaných metod bylo v minulosti přisouzení míry spolehlivosti značně problematické. V nynější době je známo, že u některých metod dochází k falešně negativním výsledkům, u jiných jsou zase výsledky falešně pozitivní či nadhodnocené (*Beach et al., 2015*). Chromatografické metody HPLC-FLD a LS-MS/MS nadhodnocovaly množství BMAA ve vzorcích, jelikož docházelo k záměnám toxinu s jinými, častěji se vyskytujícími aminokyselinami (*Faassen, 2014; Rosén & Hellenäs, 2008; Faassen et al., 2012*). Přesnost metod HPLC-FLD a LS-MS/MS je značně vyšší, pokud vlastnímu stanovení předchází derivatizační krok, který v některých dřívějších postupech chyběl (*Popova & Koksharova, 2016*). Podle všeho ovšem odlišné výsledky výzkumů nezáleží jen na typu chromatografie a derivatizaci, ale mohou být ovlivněny také zvolenou metodou odběru anebo typem extrakce (*Rosén et al., 2016*).

## 3 Návrh projektu

### 3.1. Cíle projektu

Cílem projektu je zjistit jaké jsou koncentrace BMAA v našich stojatých vodách, jak se tyto koncentrace mění během vegetační sezóny a jaké faktory je ovlivňují. Bude provedena pilotní studie mapující výskyt BMAA na několika desítkách vytipovaných nádrží, které jsou v letních měsících opakovaně postiženy nadměrným výskytem sinicového vodního květu. Zahrnuty budou i lokality s nepravidelným výskytem vodního květu, které jsou významné z hygienického hlediska (nádrže sloužící jako zdroje pitné vody).

### 3.2. Hypotézy – Očekávané výstupy projektu

1. BMAA se kromě mořských ekosystémů vyskytuje běžně také ve sladkých vodách.
2. Výskyt BMAA závisí na množství a složení fytoplanktonu, přičemž nejvyšší koncentrace BMAA jsou očekávány v silně eutrofních systémech s masovým výskytem vodního květu sinic.
3. Během sezóny se mění koncentrace BMAA v závislosti na podmínkách prostředí (např. teplota, trofie apod.)

### 3.3. Způsob dosažení cílů

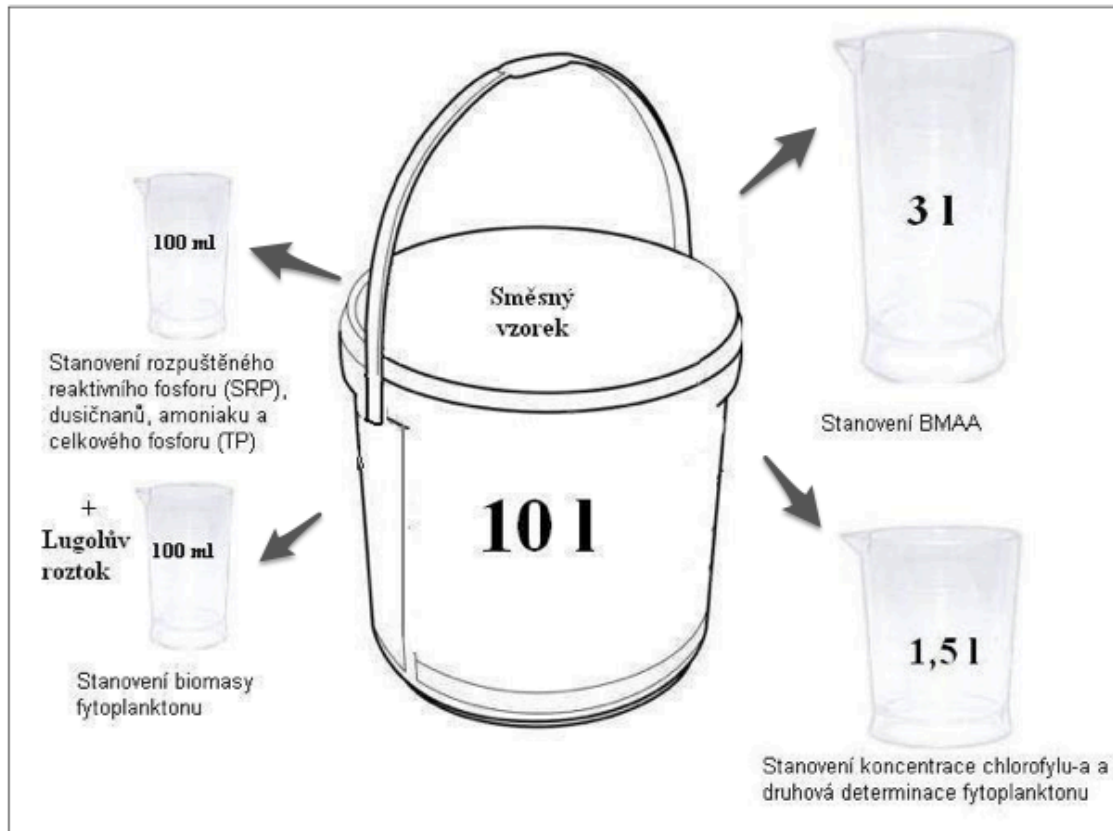
#### 3.3.1. Výběr lokalit

Lokality budou vybrané tak, aby rovnoměrně pokrývaly Českou republiku a přinesly data z většiny oblastí ČR. Výzkum se bude soustředit na nádrže s častým výskytem vodního květu sinic, kde lze důvodně předpokládat zvýšené koncentrace BMAA a také nejvýznamnější vodárenské nádrže, kde by případný zvýšený výskyt BMAA představoval riziko pro zdraví obyvatel (*Znachor et al, 2006*).

#### 3.3.2. Terénní měření a odběr vzorků

Příprava na odběr vzorků zahrnuje domluvu se správcí povodí (Podniky Povodí, s.p.) a zajištění povolení pro odběr vzorků. Vzorky budou odebírány z volné vody v měsících červenci, srpnu a září za použití člunu, případně bude použita loď správců povodí na dané

lokalitě po předchozí domluvě. Vzorky budou odebrány Friedingerovým odběrákem z hloubky 0,5 m. V 10-l barelu bude vytvořen směsný vzorek, ze kterého budou odebrány vzorky na konkrétní analýzy dle následujícího schématu:



Obr. č.2: Schéma vzorků, které budou odebrány.

- 1,5 l pro stanovení koncentrace chlorofylu-a a druhovou determinaci fytoplanktonu.
- 3 l pro stanovení BMAA (vize detaily níže).
- 100 ml pro stanovení rozpuštěného reaktivního fosforu (SRP), dusičnanů, amoniaku a celkového fosforu (TP).
- 100 ml pro stanovení biomasy fytoplanktonu (fixováno Lugolovým roztokem).
- Pro kvalitativní zpracování fytoplanktonu bude také odebrán vzorek síťového planktonu přes planktonní síťku s oky 20  $\mu\text{m}$  a jeho část bude fixována formaldehydem.

### 3.3.3. Laboratorní analýzy

Ihned po odběru budou vzorky uloženy do chladících boxů a přepraveny do laboratoře k dalšímu zpracování a analýzám. Živé vzorky budou analyzované ihned po návratu z odběrů. Vzorky na stanovení koncentrace živin budou po návratu ihned zpracovány a zamrazeny pro pozdější hromadnou analýzu.

#### **Stanovení chlorofylu-a**

Vzorek o definovaném objemu bude přefiltrován přes skleněný filtr Whatman GF/C o porozitě 1,2  $\mu\text{m}$ . Koncentrace chlorofylu-a bude stanovena spektrofotometricky po extrakci acetonem (*Lorenzen, 1967*).

#### **Složení fytoplanktonu a stanovení biomasy**

Druhá determinace bude provedena na živých vzorcích po návratu z terénních odběrů. Síťové vzorky fixované formaldehydem budou sloužit k fotografické dokumentaci nalezeného fytoplanktonu. Stanovení biomasy fytoplanktonu bude provedeno ve vzorcích fixovaných Lugolovým činidlem metodou počítání buněk jednotlivých druhů v sedimentačních komůrkách (*Lund et al., 1958*).

#### **Koncentrace živin**

Vzorky pro stanovení rozpuštěných živin budou přefiltrovány přes skleněné filtry Mecherey-Nagel GF-5 o porozitě 0,4  $\mu\text{m}$  a zamrazeny, celkový fosfor bude stanoven v nefiltrovaných vzorcích. Pro vlastní stanovení budou použity standardní metody stanovení (přehled např. v *Rychtecký & Znachor, 2011*).

#### **Stanovení BMAA**

Vzorky z lokalit s vodním květem budou analyzovány chromatograficky. U vzorků bez viditelného vodního květu bude nejprve provedeno stanovení pomocí ELISA kitu, u kterého se předpokládá, že výsledné hodnoty významně nadhodnocuje (*Fassen et al., 2013*). Pouze vzorky s pozitivním výsledkem na přítomnost BMAA budou následně analyzovány chromatograficky, aby se snížilo množství nákladných chromatografických stanovení.

- Imunologické stanovení BMAA pomocí ELISA kitu

Pro imunologické stanovení BMAA bude použit komerčně dostupný ELISA kit od firmy Abraxis. Imunochemické metody jsou založeny na interakci antigen-protilátka. V případě ELISA kitu se jedná o kompetitivní techniku, kdy soutěží neznačený antigen (v tomto případě BMAA) s konjugátem obsahující enzym, o navázání na omezené množství protilátky. V závěrečné fázi po přidání poslední složky - „substrátu“, se kterou enzym reaguje, je enzym přítomný ve vázané frakci přeměn na barevný produkt. Zabarvení prokazuje přítomnost stanovované látky. Pracovní postup doporučený výrobcem zahrnuje přidání vzorků a kontrolních vzorků do jamek mikrotitrační destičky a následné přidání enzymového roztoku konjugátu a protilátky. Koncentrace BMAA bude stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm (*Fassen et al., 2013*).

- Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí

Pro stanovení BMAA bude použita kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Biomasa fytoplanktonu z definovaného objemu vzorku bude zachycena na předem zvážených filtrech Whatman GF/C o porozitě 1,2  $\mu\text{m}$ . Biomasa na filtru bude následně lyofilizována, filtr poté znovu zvážen a následně zamražen a uchován pro pozdější hromadné zpracování. Tímto postupem bude možné vztáhnout zjištěné množství BMAA jak na sušinu fytoplanktonu, tak i na skutečné koncentrace ve vodě. Protože v České republice není k dispozici žádná laboratoř rutinně analyzující BMAA, byla navázána spolupráce s laboratoří dr. Sandry Lage ze Stockholmské univerzity. Zamražené filtry ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) budou hromadně přepraveny do Stockholmu, kde bude provedena kapalinová chromatografie. Bude provedena kvantitativní extrakce BMAA na filtrech podle Spácila et al. (2010), následné chromatografické analýze bude předcházet derivatizační krok pro zvýšení citlivosti metody, jak je doporučeno v práci Lage et al (2016), která se zabývala srovnáním jednotlivých pracovních postupů při chromatografickém stanovení BMAA. Vlastní chromatografie bude provedena na přístroji Acquility UPLC s tandemovým hmotnostním spektrometrem Xevo-TQ-MS (*Lage et al., 2016*).

### 3.3.4. Statistické vyhodnocení dat

Rozdíly v koncentraci BMAA mezi jednotlivými odběry budou testovány pomocí analýzy variance. Vliv faktorů prostředí na množství BMAA ve vodě bude zjišťován pomocí mnohonásobné regrese s postupným výběrem, případně budou použity další techniky mnohorozměrné analýzy dat (redundační analýza v programu CANOCO).

### 3.3.5. Časový plán

Tabulka č. 2: Časový plán

	1.rok		2.rok		3.rok	
	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
Plánování odběrů						
Odběr vzorků a zákl.limn.an.						
Zpracování vzorků a determinace						
Laboratorní analýzy						
Kapalinová chromatografie						
Vyhodnocení výsledků						
Prezentace výsledků						

Třetí rok budou provedeny pouze doplňkové odběry na přibližně 20ti lokalitách, kde se v předchozích letech vyskytoval vodní květ.

### 3.3.6. Finanční plán

#### 1. Materiální náklady

	Požadováno
Drobný dlouhodobý hmotný majetek (předměty, přístroje a zařízení do 40 tis. Kč)	72 000
Materiál	180 000
Drobné laboratorní pomůcky	30 000
Kancelářské potřeby	20 000



## 2. Služby

	Požadováno
Chemické analýzy	300 000
Software	10 000

## 3. Cestovní náklady

Tuzemské a zahraniční cesty	45 000
-----------------------------	--------

## 4. Osobní náklady

### 4.1. Mzdy

Odměna vědeckých pracovníků	Tarifní roční plat	Úvazek	Požadováno
Navrhovatel projektu	225 000	80% úvazku	180 000
Specialista	240 000	20% úvazku	48 000
Laborantka	225 000	80% úvazku	180 000

### 4.2. Ostatní osobní náklady (OON)

Specifikace OON	Požadováno
Na technické práce	60 000
Konzultace při statistickém vyhodnocení dat	10 000

## 5. Povinné zákonné odvody

Sociální a zdravotní pojištění	139 000
--------------------------------	---------

## 6. Doplnkové (režijní) náklady

Režie pracoviště	99 000
------------------	--------

<b>Celkem na 1. rok</b>	<b>1 373 000</b>
-------------------------	------------------

### **Celkové náklady projektu**

	1.rok	2.rok	3.rok
Materiální náklady	302 000	302 000	80 000
Služby	310 000	300 000	40 000
Cestovní náklady	45 000	45 000	55 000
Osobní náklady	478 000	478 000	478 000
Povinné zákonné odvody a režie	238 000	238 000	238 000
<b>Celkem</b>	<b>1 373 000</b>	<b>1 363 000</b>	<b>891 000</b>
<b>Celkem za 3 roky</b>			<b>3 627 000</b>

Celkové náklady projektu na 3 roky činí 3 627 000,- Kč

### **Položkový rozpis**

Položka drobný dlouhodobý hmotný majetek obsahuje 2 kusy pH metru a oxymetru – jeden pracovní do terénu a jeden laboratorní (a rovněž rezervní) – cena za pH metr 6 000,- Kč a oxymetr 10 000,- Kč (výrobce Voltcraft), chladicí boxy, filtrační aparaturu s ruční vývěvou, 2x automatické pipety (1 pipeta= 10 000,- Kč).

Položka materiál zahrnuje zejména deset kusů kitu ELISA (10 tis/ 1 kit, výrobce Abraxis), chemikálie potřebné k analýzám, drobné pomůcky na chemické analýzy, planktonní síťe s oky 20 µm a dále další materiál potřebný k odběru a správnému uchování vzorků - odběrový barel 10 l, PET lahve a další vzorkovnice.

Položka drobné laboratorní pomůcky zahrnuje mikroskopická skla a další nezbytné drobné pomůcky potřebné k práci. Položka kancelářské potřeby zahrnuje zejména tonery. Služby jsou vyhrazeny na analýzy vzorků pomocí kapalinové chromatografie LC-MS/MS s derivatizací. (Analýza jednoho vzorku s LC-MS/MS představuje 1000,- Kč: 100 lokalit 3x ročně celkem vychází na 300 000 Kč). Služby zahrnují také na na pořízení licencí programů Statistica a CANOCO.

Cestovní náklady zahrnují finance na pohonné hmoty na cesty trojčlenného týmu na lokality za účelem odběru vzorků. V cestovních nákladech jsou zahrnuty diety a náklady na ubytování v případě potřeby pracovníků během cesty.

Ve mzdách jsou zahrnuti:

- Vědecký pracovník - 80 % úvazek: aktivně se podílí na celé přípravě i průběhu odběrů vzorků (zároveň navrhovatel projektu), zpracovává vzorky pro další analýzy, provádí determinaci fytoplanktonu, stanovení biomasy a imunochemické stanovení BMAA ELISA kitem.
- Vědecký pracovník - 80% úvazek: stanovení koncentrací živin, mikroskopická determinace.
- Specialista - 20% úvazek: chemické analýzy, determinace, stanovení biomasy fytoplanktonu.
- 2 lidé na technické práce související s odběrem vzorků jsou vedeni jako OON a budou pomáhat během odběrů.
- Odborník na konzultaci při statistickém vyhodnocení dat – veden jako OON.

#### 3.4. Závěr

V rámci navrhovaného projektu budou získána cenná data o množství BMAA ve stojatých vodách České republiky, které umožní vyhodnocení zdravotních rizik pro obyvatelstvo. Na základě získaných výsledků bude možné zahájit seriózní debatu, do jaké míry se BMAA může reálně podílet na výskytu neurodegenerativních onemocnění v populaci. Je důležité věnovat se problematice rozšíření toxinu BMAA vzhledem ke zvyšující se eutrofizaci vod na územích České republiky umocněné navíc klimatickou změnou, která v budoucnu povede ještě k většímu nárůstu vodních květů a rizik s nimi spojených (*Anderson et al., 2002; Rodgers, 2013*).

## 4 Použitá literatura

- Adámek, Zdeněk (2010): Aplikovaná hydrobiologie. 2. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 256 p.
- Agawin N.S.R., Rabouille S., Veldhuis M.J.W., Servatius L., Hol S., van Overzee H.M.J., Huisman J. (2007): Competition and facilitation between unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria and non-nitrogen-fixing phytoplankton species. *Limnology and Oceanography* **52**, 2233-2248.
- Andersen T., (1997): Pelagic nutrient cycles. Herbivores as sources and sinks. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York: 280 p.
- Anderson D., Glibert P., Burkholder J. (2002): Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries* **25**, 704-726.
- Anneville O., Souissi S., Gammeter S., Straile D., (2004): Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamic in three per-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biology* **49**, 98-115.
- Badger M.R. & Price G.D. (2003): CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* **54**, 609-622.
- Badger M.R., Price G.D., Long B.M., Wooger F.J. (2006): The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Journal of Experimental Botany* **57**, 249-265.
- Bannack S.A., Johnson H.E., Cheng, R., Cox, P.A. (2007): Production of neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Marine Drugs* **5**, 180-196.
- Beach G.D., Kerrin S.E., Quilliam A.M. (2015): Selective quantitation of the neurotoxin BMAA by use of hydrophilic-interaction liquid chromatography – differential mobility spectrometry – tandem mass spectrometry (HILIC-DMS-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 8397-8409.
- Berg K., Skulberg O.M., Skulberg R., Underdal B., Willen T. (1986): Observations of toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in some Scandinavian lakes. *Acta Veterinaria Scandinavica* **27**, 440–452.
- Bormans M., Sherman B.S., Webster I.T. (1999): Is buoyancy regulation in cyanobacteria an adaptation to exploit separation of light and nutrients? *Marine and Freshwater Research* **50**, 897-906.
- Bradley W.G., Mash D.C. (2009): Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **10**(Suppl.2), 7-20.
- Brand L.E., Pablo J., Compton A., Hammerschlag N., Marsh D.C. (2010): Cyanobacterial Blooms and the Occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae* **9**, 620-635.

- Campos A., Vasconcelos V. (2010): Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 268-287.
- Cervantes C. R.C., Baptista M.S., Lopes, V.R., Vasconcelos V.M. (2012): The non-protein amino acid  $\beta$ -N-methyl-L-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates. *Amino Acids* **42**, 2473-2479.
- Contardo-Jara, V., Schwanemann T., Pflugmacher S. (2014): Uptake of a cyanotoxin,  $\beta$ -N-methyl-L-alanine, by wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **104**, 127-131.
- Cox P.A. & Sacks O.W. (2002): Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* **58**,956-959.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J. (2003): Biomagnification of cyanobacteria neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13380-13383.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S, Morrison J.F., Codd G.A., Bergman B. (2005): Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5074-5078.
- Cox P.A., Davis D.A., Mash D.C., Metcalf J.S., Banack S.A. (2016): Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**, 1823
- Demott W.R., Qing-Xue Z., Carmichael W.W. (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **36**, 1346–1357.
- Dittmann E. & Wiegand, C. (2006): Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition and Food Research* **50**, 7–17.
- Dokulil M.T. & Teubner K. (2000): Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* **438**, 1-12.
- Duncan M.W. (1991): Role of the cycad neurotoxin BMAA in the amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of the western Pacific. *Advances in Neurology* **56**, 301-310.
- Duncan M.W., Kopin I.J., Crowley J.S., Jones S.M., Markey S.P. (1989): Quantification of the putative neurotoxin 2-amino-3-(methylamino) propanoic acid (BMAA) in cycadales: analysis of the seeds of some members of the family Cycadaceae. *Journal of Analytical Toxicology* **13** (4): suppl A-G.
- Duncan M.W., Steele J.C., Kopin I.J., Markey S.P. (1990): 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour:An unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* **40**, 767-772.
- Esterhuizen M. & Downing T.G. (2008):  $\beta$ -N-methyl-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **71**, 309-313.

Faassen S.J., Gillissen F., Lürling M. (2012): A Comparative Study on Three Analytical Methods for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Cyanobacteria. *PLoS ONE* **7** (5) e36667

Faassen E.J., Beekman W., Lürling M. (2013): Evaluation of a Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Surface Waters. *PLoS ONE* **8** (6) e65260

Faassen E. (2014): Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: what do we really know? *Toxins* **6**, 1109–1138.

Ferrao-Filho A.S., Soares M.C., Magalhaes V.F., Azevedo S.M.F.O. (2010): A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environmental Pollution* **158**, 2084-2093.

Fott, J., Pechar L., Prazakova M. (1980): Fish as a factor controlling water quality in ponds. In: Barica, J. & L. R. Mur (Eds.), *Hypertrophic Ecosystems. Developments in Hydrobiology* 2. Dr W. Junk Publishers, The Hague, 255–261.

Gan N., Xiao Y., Zhu L., Wu Z., Liu J., Hu C., Song L. (2012): The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental Microbiology* **14**, 730–742.

Garruto R.M. & Yase Y. (1986): Neurodegenerative disorders of the western Pacific. The search for mechanisms of pathogenesis. *Trends in Neurosciences* **9**, 368-374.

Guo T., Geist S., Hedman C., Arndt M., Krick W., Sonzogni W. (2007): Charakterization of ethyl chloroformate derivative of beta-methylamino-L-alanine. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **18**, 817-825.

Hallegraeaf G.M. (1993): A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**, 79-99.

Hammerschlag N., Davis A.D., Mondo K., Seely M.S., Murch S.J., Glover W.B., Divoll T., Evers D.C., Mash D.C. (2016): Cyanobacterial Neurotoxin BMAA and Mercury in Sharks. *Toxins* **8**, 238-252.

Haney, J.F., Sasner, J.J., Ikawa M. (1995): Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnology and Oceanography* **40**, 263-272.

Healey F.P. (1982): Phosphate. In: Carr, N.G., Whitton, B.A. (Eds.), *The Biology of Cyanobacteria*. Univ. of California Press, Berkeley, 105-124.

Hellsten S., Dragosits U., Place C.J., Misselbrook T.H., Tang Y.S., Sutton M.A. (2007): Modelling Seasonal Dynamics from Temporal Variation in Agricultural Practices in the UK Ammonia Emission Inventory. In: Brimblecombe P., Hara H., Houle D., Novak M. (Eds.), *Acid Rain - Deposition to Recovery*, Springer Netherlands, 3-13.

Hirano A., Malamud N., Elizan T.S., Kurland L.T. (1966): Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex of Guam: Further pathologic studies. *Archives of Neurology* **15**, 35-51.

Holland A. & Kinnear S. (2013): Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs* **11**, 2239-2258.

Chorus, I., (1993): Algal metabolites and water quality: Toxins, allergens, and taste-and-odor problems. In: Giussani, G. & C. Callieri (Eds.), *Strategies for Lake Ecosystems Beyond 2000*. Proc. 5th Int. Conf. Conservation and management of Lakes, Stresa, 570–572.

Chorus I. & Bartram J. (1999): *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide for their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, UK, 440 p.

Christoffersen K. (1996): Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* **35**, 42–50.

Jeppesen E., Kronvang B., Meerhoff M., Sondergaard M., Hansen K.M., Andersen H.E., Lauridsen T.L., Liboriussen L., Beklioglu M., Özen A., Olesen J.E. (2007): Climate change effect on runoff, catchment phosphorus loading and lake ecological state, and potential adaptations. *Journal of Environmental Quality* **38**, 1930-1941.

Jiang L., Aigret B., De Borggraeve W. M., Spacil Z., Ilag L. L. (2012): Selective LC MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 1719-1730.

Johnson H.E., King S.R., Banack S.A., Webster C., Callanaupa W.J., Cox, P.A. (2008): Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *Journal of Ethnopharmacology* **118**, 159-165.

Jonasson S., Eriksson J., Berntzon L., Spácil Z., Ilag L.L., Ronnevi L.O., Rasmussen U., Bergman B. (2010): Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America* **107**, 9252-9257.

Jones A.C., Gu L., Sorrels C.M., Sherman D.H., Gerwick W.H. (2009): New tricks from ancient algae: Natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 216-223.

Kaebnick M. & Neilan B. A. (2001): Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* **35**, 1–9.

Kalff J. (2001): *Limnology: inland water ecosystems*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 592 p.

Kaplan-Levy R.N., Hadas O., Summers M.L., Rucker J., Sukenik A., (2010): Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. In: Lubzens, E., Cerda, J., Clark, M.S. (Eds.), *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 5-27.

- Karlsson O., Lindquist N.G., Brittebo E.B., Roman E. (2009): Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicological Sciences* **109**, 286-295.
- Kinsman R., Ibelings B.W., Walsby A.E. (1991): Gas vesicle collapse by turgor pressure and its role in buoyancy regulation by *Anabaena flos-aquae*. *Journal of General Microbiology* **137**, 1171- 1178.
- Kromkamp J. & Walsby A.E. (1990): A computer model of buoyancy and vertical migration in cyanobacteria. *Journal of Plankton Research* **12**, 161-183.
- Lage S., Costa R.P., Moita T., Eriksson J., Rasmussen U., Rydberg J.S. (2014): BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquatic Toxicology* **152**, 131-138.
- Lage S., Annadotter H., Rasmussen U., Rydberg S. (2015): Biotransfer of  $\beta$ -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) in a Eutrophicated Freshwater Lake. *Marine Drugs* **13**, 1185-1201.
- Lage S., Burian A., Rasmussen U., Costa R.P., Annadotter H., Godhe A., Rydberg S. (2016): BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose? *Environmental Science and Pollution Research international* **23**, 338-350.
- Landsberg J.H. (2002): The effect of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* **10**, 191-193.
- Li A., Tian Z., Li J., Yu R., Banack A.S., Wang Z. (2010): Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* **55**, 947-953.
- Lindholm T., Eriksson J.E., Meriluoto J.A.O. (1989): Toxic cyanobacteria and water quality problems. Examples from a eutrophic lake on Åland, South West Finland. *Water Research* **23**, 481–486.
- Litchman E., de Tezanos Pinto P., Klausmeier C.A., Thomas M.K., Yoshiyama K., (2010): Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* **653**, 15- 28.
- Lobner D., Piana P.M.T., Salous A.K., Peoples R.W. (2007): Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease* **25**, 360-366.
- Lorenzen C.J. (1967): Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equation. *Limnology and Oceanography* **12**, 343–346.
- Lukac M. & Aegerter R. (1993): Influence of trace-metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* **31**, 293–305.
- Lund J.W.G., Kipling C., Le Cren E.D. (1958): The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia* **11**, 14–70.
- Mankiewicz J., Tarczyska M., Walter Z., Zalewski M. (2003): Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* **45**, 9-20.



- Mayer J., Dokulil M.T., Salbrechter M., Berger M., Posch T., Pfister G., Kirschner A.K.T., Velimirov B., Steitz A., Ulbricht T. (1997): Seasonal successions and trophic relations between phytoplankton, zooplankton, ciliophora and bacteria in a hypertrophic shallow lake in Vienna, Austria. *Hydrobiologia* **342**, 165–174.
- Metcalf J.S., Banack S.A., Lindsay J., Morrison L.F., Cox P.A., Codd G.A. (2008): Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with either cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environmental Microbiology* **10**, 702-708.
- Mondo K., Hammerschlag N., Basile M., Pablo J., Banack S.A., Mash D.C. (2012): Cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Marine Drugs* **10**, 509-520.
- Mondo K., Broc Glover, W., Murch, S. J., Liu, G., Cai, Y., Davis, D. A., and Mash, D. C. (2014): Environmental neurotoxins beta-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements. *Food and Chemical Toxicology* **70**, 26-32.
- Mur L.R., Skulberg O.M., Utkilen H., (1999): Cyanobacteria in the environment. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health, Consequences, Monitoring and Management*. St. Edmundsbury Press, Suffolk, 15-40.
- Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A. (2004): A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12228-12231.
- Neilan B.A., Pearson L.A., Muenchhoff J., Moffitt M.C., Dittmann E. (2012): Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* **15**, 1239–1253.
- Nürnberg G.K., Shaw M., Dillon P., McQueen D.(1986): Internal phosphorus load in an oligotrophic precambrian shield lake with an anoxic hypolimnion. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43**, 574-580.
- Oliver R.L. & Ganf G.G. (2000): Freshwater blooms. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 149-194.
- Orr P. T. & Jones G. J. (1998): Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* **43**, 1604–1614.
- Osborne A. & Raven J.A. (1986): Growth light level and photon absorption by cells of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus obliquus* and *Euglena viridis*. *British Phycological Journal* **21**, 303-313.
- Osswald J., Rellán S., Carvalho A.P., Gago A., Vasconcelos V. (2007): Acute effect of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish – *Cyprinus carpio* L. *Toxicon* **49**, 693-698.

- Pablo J., Banack S.A., Cox P.A., Johnson T.E., Papapetropoulos S., Bradley W.G., Buck A., Mash D.C. (2009): Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* **120**, 216-225.
- Paerl H.W., (1996): A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* **35**, 25-35.
- Pan M., Mabry T.J., Cao P., Moini M. (1997): Identification of nonprotein amino acids from cycad seeds as N-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives by positive chemical-ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **787**, 288-294.
- Patera, A. (2002): Nádrže a vodohospodářské soustavy 20: malá antologie environmentálních textů ve vodním hospodářství. Vydavatelství ČVUT, Praha, 243 p.
- Pizzolon L., Tracanna B., Prósperi C., Guerrero J.M. (1999): Cyanobacterial blooms in Argentinean inland waters. *Lakes & Reservoirs* **4**, 101–105.
- Popova A.A. & Koksharova O.A. (2016): Neurotoxic Non-proteinogenic Amino Acid  $\beta$ -N-Methylamino-L-alanine and Its Role in Biological Systems. *Biochemistry (Moscow)* **81**, 794-805.
- Rao S.D., Banack S.A., Cox P.A., Weiss J.H. (2006): BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Experimental Neurology* **201**, 244-252.
- Reynolds C. S., Oliver R.L., Walsby A.E. (1987): Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **21**, 379–390.
- Reynolds C.S., (2006): Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge. 523 p.
- Richardson R.W. (2004): Florida Bay microalgae blooms: Physiological characteristics and competitive strategies of bloom forming cyanobacteria and diatoms of Florida Bay. PhD thesis.
- Rodgers J.K. (2013): Non-protein amino acids and neurodegeneration: The enemy within. *Experimental Neurology* **253**, 192-196.
- Rosén J. & Hellenäs K. E. (2008): Determination of the neurotoxin BMAA (beta N methylamino L alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* **133**, 1785-1789.
- Rosén J., Westerberg E., Schmiedt S., Hellenäs K.E. (2016): BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels. *Toxicon* **109**, 45-50.
- Rychtecký P. & Znachor P. (2011): Spatial heterogeneity and seasonal succession of phytoplankton along the longitudinal gradient in a eutrophic reservoir. *Hydrobiologia* **663**, 175-186.
- Shapiro J., (1997): The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwater Biology* **37**, 307-323.

Schopf J.W., (2000): The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: Whitton B.A., Potts M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 13-35.

Schreurs H., (1992): Cyanobacterial dominance. Relations to eutrophication and lake morphology. Doctoral thesis, Univ. Amsterdam, 198 p.

Sivonen K. & Börner T. (2008) In: *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomist and Evolution*, (Eds.), Herrero A., Flores E., Caister Academic Press, Norfolk UK, 159-197.

Spacil Z., Erikson J, Jonasson S., Rasmussen U., Ilag LL., Bergman B. (2010): Analytical protocol for identification of BMAA and DAB on biological samples. *Analyst* **135**, 127-132.

Spencer P.S., Nunn P.B., Hugon J., Ludolph A., Roy D.N. (1986): Motorneurone disease on Guam: Possible role of a food neurotoxin. *Lancet* **1**, 965.

Spencer P.S. & Schaumburg, H.H. (2000): *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (Oxford Univ.Press.New York). 2nd Ed., 350 p.

Stal L.J., Severin I., Bolhuis H., (2010): The ecology of nitrogen fixation in cyanobacterial mats. In: Hallenbeck, P.C. (Ed.), *Recent Advances in Phototropic Prokaryotes*. Springer. Berlin, 31-45.

Šejnohová L, Maršálek B. (2005): Pohled do mikroskopického světa sinic. *Živa* 3/2005  
<http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/pohled-do-mikroskopickeho-sveta-sinic.pdf> . (9.12.2016, 14:51)

Vega A. & Bell E.A. (1967):  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methylamino-propionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* **6**, 759-762.

Visser P.M., Ibelings B.W., Mur L.R., Walsby A.E., (2005): The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer. Dordrecht, 109-142.

Walsby A.E., (1994): Gas vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **58**, 94-144.

Welker M. & von Dohren H. (2006): Cyanobacterial peptides – nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 530–563.

Whitton B. A. (2012): *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Springer Netherlands, New York, 760 p.

Wiegand C., Pflugmacher S.(2005): Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**, 201-218.

Wood S.A., Prentice M.J., Smith K., Hamilton D.P., (2010): Low dissolved inorganic nitrogen and increased heterocyte frequency: precursors to *Anabaena planktonica* blooms in a temperate, eutrophic reservoir. *Journal of Plankton Research* **32**, 1315-1325.

Zanchett G. & Oliveira-Filho C.E. (2013): Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effect. *Toxins* **5**, 1896-1917.

Zilliges Y., Kehr J. C., Meissner S., Ishida K., Mikkat S., Hagemann M., Kaplan A., Borner T., Dittmann E. (2011): The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* **6** (3) e17615

Znachor P., Jurczak T., Komárková J., Jezberová J., Mankiewicz J., Kaštovská K., Zapomělová E. (2006): Summer changes in cyanobacterial bloom composition and microcystin concentration in eutrophic Czech reservoirs. *Environmental Toxicology* **21**, 236–243.