



Mikrocistin-LR u površinskim vodama reke Ponjavice

Microcystin-LR in surface water of Ponjavica River

Dejan Natić*, Dragana Jovanović*, Tanja Knežević*, Vesna Karadžić*, Zorica Bulat†, Vesna Matović†

*Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, Beograd, Srbija;

†Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Cijanotoksini, odnosno toksini cijanobakterija, spadaju u grupu raznovrsnih jedinjenja kako po hemijskoj strukturi, tako i po dejstvu na ljude i životinje. Najveći značaj u ovoj velikoj grupi jedinjenja imaju mikrocistini. Njihovo prisustvo u vodi može da izazove toksične efekte, posebno na jetru. Mikrocistini su rasprostranjeni širom sveta. Cvetanje toksičnih cijanobakterija i njihovi cijanotoksini karakteristični su i za neke površinske vode u Srbiji. Cilj ovog rada bio je da se uvede HPLC metoda za određivanje mikrocistina-LR, da se izvrši validacija metode i odredi sadržaj mikrocistina-LR u površinskoj vodi reke Ponjavice, veoma eutrofne reke, koja poseduje idealne uslove za razvoj cijanobakterija. **Metode.** Za pripremu uzoraka korišćeni su HLB i C8 ulošci, a za dodatno prečišćavanje upotrebljeni su Sep-Pak silika ulošci. Kvantifikacija mikrocistina-LR vršena je metodom HPLC pomoću detektora na principu fotodiode (HPLC/PDA) korišćenjem kolone RP C18 Zorbax Eclicps (4,6 × 150, 5 µm), upotrebom mobilne faze sastava 0,1% rastvor trifluorosirćetne kiseline (TFA) u metanolu: 0,1% vodeni rastvor TFA u odnosu 60 : 40 (v/v), na 238 nm. Retenciono vreme mikrocistina-LR iznosilo je 10 min. Uzorci vode reke Ponjavice za analizu mikrocistina-LR sakupljeni su tokom perioda jun-novembar 2008. godine. **Rezultati.** Validacijom metode utvrđena je osetljivost 0,1 µg/L, prinos 89–92% i merna nesigurnost od ± 5%. Rezultati uzoraka vode reke Ponjavice pokazali su da je vrednost mikrocistina-LR dostigla maksimum tokom avgusta i septembra (1,5 µg/L), i da je iznad maksimalno dozvoljene koncentracije za pijaću vodu (1 µg/L) prema preporuci Svetske zdravstvene organizacije. **Zaključak.** Parametri validacije pokazuju da je predložena metoda osetljiva i selektivna, što je, uz činjenicu da je jednostavna i brza, čini pogodnom za rutinsko određivanje mikrocistina-LR. Predloženom metodom određene su povišene koncentracije ovog toksina cijanobakterija u uzorcima vode reke Ponjavice, koje ukazuju na zagađenost Parka prirode „Ponjavica“.

Ključne reči:

voda, zagađivači; toksini, bakterijski; mikrocistini; metodi; hromatografija, tečna, pod vp.

Abstract

Background/Aim. Cyanobacterial toxins befall a group of various compounds according to chemical structure and health effects on people and animals. The most significant in this large group of compounds are microcystins. Their presence in water used for human consumption causes serious health problems, liver being the target organ. Microcystins are spread all over the world. Waterblooms of cyanobacterias and their cyanotoxins are also common in the majority of surface waters in Serbia. The aim of this study was to propose HPLC method for determination of microcystin-LR, to validate the method and to use it for determination of microcystin-LR in the surface water of the river Ponjavica. The Ponjavica is very eutrophic water and has ideal conditions for the cyanobacterial growth. **Methods.** Sample of water from the Ponjavica river were collected during the summer 2008. Coupled columns (HLB, Sep-Pak), were used for sample preparation and HPLC/PDA method was used for quantification of microcystin-LR. **Results.** Parameters of validation show that the proposed method is simple, fast, sensitive (0.1 mg/L) and selective with the yield of 89%–92%. The measuring uncertainty of ± 5% was obtained. The obtained results for surface water show that microcystin concentration reached the maximum level during August and September (1.5 µg/L). The value is higher than maximum allowable concentration of microcystin in drinking water (1 µg/L) proposed by WHO. **Conclusion.** This study contributes to the issue of pollution of the National Park Ponjavica. Besides, literature data and WHO clearly point out harmfulness of cyanobacterias and their toxins and implicate the necessity of legislation concerning determination and monitoring of these toxins in our country. Method used for quantification of microcystin-LR was shown to be sensitive, selective, rapid and simple and could be recommended for routine determination of this toxin.

Key words:

water pollutants; bacterial toxins; microcystins; methods; chromatography, high pressure liquid.

Uvod

Briga o javnom zdravlju u pogledu cijanobakterija usmerena je na sposobnost mnogih vrsta ovih organizama da proizvode toksine. Ozbiljna oštećenja kao što su hepatocititis, simptomatska pneumonija i dermatitis nastaju nakon upotrebe ili kontakta sa vodom koja je zagađena toksinima koje proizvode cijanobakterije¹. Najveći značaj u ovoj velikoj grupi jedinjenja imaju mikrocinini. Mikrocinini su raznovrsna grupa jedinjenja, a njihovo prisustvo dokazano je širom sveta, u vodi, ali i u algama, školjkama, ribama itd¹. Kao i mnogi drugi cijanotoksini i mikrocinini su dobili ime prema vrsti u kojoj su prvo identifikovani (*Microcystis aeruginosa*)². Kasnije studije su pokazale da ih proizvode i druge cijanobakterije.

Mikrocinini pripadaju grupi jedinjenja ciklične peptidne strukture molekulske mase koja varira od 800 do 1 100. Do danas je okarakterisano preko 60 različitih strukturnih varijanti ovih jedinjenja. U svojoj strukturi sadrže 7 aminokiselina, sa 2 terminalne aminokiseline X i Z, povezane u cikličnu formu. U slučaju mikrocinina LR, X = L-leucin (L) a Z = L-Arginin (R).

Poznato je da mikrocinini ispoljavaju efekte na mnoge organizme, od mikroalgi do sisara. Mikrocinin-LR je sposoban da parališe pokretljivost zelenih algi, što može da izazove povećano naseljavanje i stvaranje slobodnih zona pogodnih za cijanobakterije³, a ispoljava i štetne efekte na mnogobrojne organizme u vodi. Ribe, školjke, rakovi i drugi vodeni organizmi koji se koriste u ishrani ljudi mogu biti zagađeni i tako predstavljati potencijalnu opasnost za čoveka. Ljudi mogu biti izloženi mikrocininima direktno preko pijaće vode¹, vode za rekreaciju⁴, vode za hemodijalizu⁵ ili preko hrane⁶. Kod sisara, pa i čoveka, mikrocinini su selektivni za ćelije jetre, irervizibilno inhibiraju serin-treonin protein fosfatazu PP1 i PP2 i izazivaju dezintegraciju strukture hepatocita, apoptozu i nekrozu jetre, kao i hemoragiju koja može izazvati hemoragijski šok⁷.

Mikrocinini su veoma toksični i za mikrocinin-LR, najčešću izoformu, LD-50 iznosi 50 µg/kg t.m. pri intraperitoneumskom unosu, a pri oralnom 5 000 µg/kg t.m. za miša¹. Brojni su slučajevi gastrointestinalnih bolesti, kao i oštećenja jetre kod ljudi, koji se mogu povezati sa prisustvom mikrocinina u vodi. Opasnost koju nosi prisustvo ovih supstanci u vodama bila je primećena i zabeležena u spisima koji datiraju od pre 1 000 godina. Tada je u Južnoj Kini zabeležena smrt vojnika koji su pili rečnu vodu, koja je pri tom bila zelene boje. U to vreme tačan uzrok smrtnog ishoda nije bio poznat. Zabeležen je i slučaj koji se desio duž reke Ohio 1931. godine. Nakon kiša, voda koja je sadržala mikrocinine prelila se u glavni tok reke izazivajući seriju bolesti koje nisu mogle da se dovedu u vezu sa nekim infektivnim agensima⁸. Slični problemi se dešavaju i u Harareru (Zimbabve), gde deca koja žive u oblasti grada, a koja koriste posebne rezervoare za vodu, svake godine imaju zdravstvene probleme u vreme raspadanja cveta *Microcystis* u rezervoarima za vodu. Deca koja su koristila druge izvore vode nisu imala zdravstvenih problema⁹. Još jedan događaj sa velikim bro-

jem smrtnih ishoda izazvan cijanobakterijskim toksinima u pijaćim vodama, zabeležen je u Brazilu kada su poplave donele ogroman cijanobakterijski cvet. Prijavljeno je 88 smrtnih ishoda za 42 dana¹⁰. Nakon analize, rezultati su pokazali da su toksini cijanobakterija bili odgovorni za trovanja.

Povećane koncentracije mikrocinina opravdano je očekivati u vodenim ekosistemima sa fizičko-hemijskim karakteristikama koje ukazuju na ubranu eutrofikaciju i u kojima se i vizuelno mogu otkriti kolonije cijanobakterija. Ranija fizičko-hemijska i algološka istraživanja reke Ponjavice bila su veoma oskudna. Prvi podaci odnose se na fizičko-hemijske karakteristike vode, sastav algalne flore i saprobnost i ukazuju na proces ubrane eutrofikacije u periodu od 1984. do 1989. godine, što za posledicu može imati zasipanje ovog vodenog ekosistema i njegovo potpuno nestajanje¹¹. Osim toga, uočena je i periodična pojava cvetanja cijanobakterija. Upravo ova saznanja uticala su na izbor ove površinske vode za istraživanje mikrocinina-LR.

Imajući u vidu toksikološki značaj mikrocinina, kao i činjenicu da u našoj zemlji nije uvedena metoda za određivanje mikrocinina, cilj ovoga rada bio je da se predloži metode tačne hromatografije visokih performansi (*high performance liquid chromatography* – HPLC) za određivanje mikrocinina-LR u vodi. Za uvođenje metode u rutinski rad trebalo je: postići efikasnu pripremu uzoraka za analizu, optimizovati uslove određivanja, validovati metodu i odrediti mernu nesigurnost metode. Predložena metoda korišćena je za određivanje sadržaja mikrocinina-LR u uzorcima površinske vode reke Ponjavice. Rezultati ovih ispitivanja trebalo bi da doprinesu sagledavanju zagađenosti nacionalnog parka „Ponjavica“.

Metode

Hemikalije i reagensi

U radu su korišćene hemikalije odgovarajućeg stepena čistoće (HPLC *grade*): metanol (JT Baker, Holandija), koncentrovana trifluorsirćetna kiselina (TFA) (99%, Merck, Nemačka) i standard mikrocinin-LR (ALEXIS Biochemicals, SAD). Svi reagensi su pripremani sa dejonizovanom vodom (HPLC čistoće).

Validacija metode

Prilikom uvođenja nove metode u laboratorijsku praksu potrebno je ispitati njenu pouzdanost. To je naročito važno s obzirom na nekoliko ključnih koraka u kojima može doći do grešaka prilikom analize mikrocinina u uzorcima vode. U tu svrhu su određivani uobičajeni parametri validacije: linearost, detekcioni i kvantifikacioni limit, tačnost i preciznost metode, kao i ispitivanje pogodnosti sistema¹². Sve analize su rađene sa sertifikovanim standardom od 500 µg mikrocinina-LR, koji je bio rastvoren u 1 mL metanola.

Linearnost je rađena za opseg od 10 do 200 µg/L. Izračunat je faktor odgovora detektora i apsolutna vrednost izraza $y_{izrač} - y_{izm} / y_{izrač}$ (tabela 1). Tačnost metode je proveravana putem *recovery* testa, a preciznost metode parametrom % RSD.

Tabela 1

Faktor odgovora detektora za mikrocistin-LR

x (µg/L)	Y _{izm}	Y _{izrač}	Y _{izrač} -Y _{izm} /Y _{izrač}	(Y _{izrač} -Y _{izm} /Y _{izrač}) < 0,03	F = Y _{izm} /X
10 000	13200	10242,00	-0,29	0,29	1320,0
20 000	25827	23588,00	-0,09	0,09	1291,0
50 000	64595	63150,00	-0,02	0,02	1291,0
100 000	114020	129400,00	0,12	0,12	1140,2
200 000	265908	263000,00	-0,01	0,01	1329,5
Xsred					1274,598
σ					77.0109934
%RSD					6,04

F – faktor odgovora detektora (y_{izm}/x); y_{izrač} – površina pika izračunata iz regresione jednačine za odgovarajući standardni rastvor; y_{izm} – površina pika iz hromatograma odgovarajućeg standardnog rastvora

Nakon kvantifikacije svih izvora nesigurnosti i njihovog izražavanja kao standardne nesigurnosti, izračunata je kombinovana merna nesigurnost određivanja mikrocistina-LR u vodi kao kvadratni koren zbira varijansi svih identifikovanih izvora nesigurnosti.

Dobijeni rezultati su obrađeni u softverskom programu Chemstation.

Uzorci i uzorkovanje

Uzorkovanje je obavljeno pomoću specijalnog teleskopa za prikupljanje uzoraka površinskih voda, na četiri unapred definisane lokacije srednjeg toka reke Ponjavice, od Omoljice do Banatskog Brestovca, tokom proleća, leta i jeseni 2008. godine (period od juna do novembra), kada je uočeno cvetanje cijanobakterija. Uzorci su prikupljeni u staklenim bocama od 1 litar zahvatanjem sa površine vode. Boce su punjene do vrha i zatvarane teflonskim zatvaračima. Uzorci su transportovani do laboratorije u frižiderima na +4°C.

[Reka Ponjavica se nalazi u južnom delu Vojvodine (Srbija), na obodu pančevačke depresije. Izvire iz Kapetanove bare kod naselja Starčevo, a uliva se u Dunav kod sela Dubovca. Ukupna dužina reke je 20 km, prosečna dubina od 0,2 m, a maksimalna dubina 2,5 m. Ceo tok se može podeliti na tri dela: prvi, izvorišni deo od Starčeva do Omoljice i treći od Banatskog Brestovca do ušća u Dunav, potpuno su izmenjeni i pretvoreni u kanale za odvodnjavanje viška podzemnih voda sa okolnog terena; srednji tok, od Omoljice do Banatskog Brestovca je prirodni, neznatno izmenjeni deo na 78 do 71 metara nadmorske visine, sa očuvanim izvornim ekosistemom karakterističnim za sporotekuće ravnicaške reke, ukupne dužine 10 km, a zaštićen je kao Park prirode "Ponjavica". U skladu sa zakonom, tok reke Ponjavice razvrstan je u III kategoriju zaštićenih prirodnih dobara kao značajno prirodno dobro. Površina Parka prirode iznosi 183,46 ha, dok površina zaštitne zone iznosi 60,83 ha.

Snabdevanje vode vodotoka odvija se putem podzemnih izdani koje su registrovane na više mesta duž leve obale. Nivo vode u vodotoku je konstantan, a u sušnom periodu godine priticaj vode iz kanalske mreže praktično ne postoji.

U klimatskom pogledu, područje vodotoka Ponjavice pripada umereno kontinentalnom klimatu, podunavskog tipa, sa toplim letima i hladnim zimama, sa srednjom godišnjom temperaturom 11,3°C i srednjom godišnjom količinom padavina od 616,4 mm.

Pedološki pokrivač u priobalju Ponjavice je černozem, ritska crnica, livadska crnica, a u krajnjem istočnom delu zaštićenog područja je ilovastoglinoviti aluvijum¹¹.]

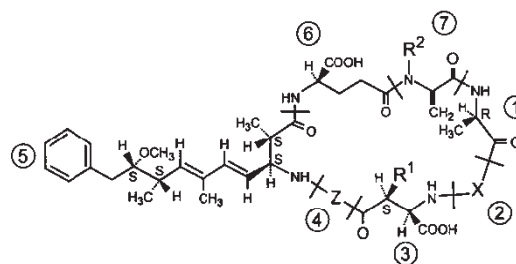
Priprema uzoraka

U prethodnim istraživanjima¹³ priprema uzoraka vode za analizu mikrocistina vršena je korišćenjem većeg broja uložaka različite polarnosti (C18, diol, NH₂, CN, silika-gel), kao i različitih sistema rastvarača. U ovom radu korišćeni su HLB ulošci (specijalna vrsta C18 uložaka) i C8 ulošci, za dodatno prečišćavanje upotrebljavani su Sep-Pak silika ulošci (Oasis, Waters, SAD).

Priprema uzoraka za analizu obuhvata filtriranje, prečišćavanje i koncentrovanje. Uzorak se homogenizuje okretanjem boce gore-dole nekoliko puta. Zatim se na 1 000 mL uzorka vode pre filtriranja doda 10 mL 10% TFA. Sve zajedno se promeša i filtrira kroz stakleni membranski filter (GF/C, Whatman). Profiltriran uzorak se sipa u staklenu bocu i doda 10 mL metanola. Ovako pripremljen uzorak se nanosi na HLB-SPE uložak, prethodno kondicioniran propuštanjem metanola (20 mL) i dejonizovane vode (20 mL). Podese se odgovarajući vakum, tako da protok rastvarača bude 1–2 kapi u sekundi. Voda i metanol se odbace. Nakon toga ulošci se ispiraju sa 10 mL 10% metanola, zatim sa 10 mL 20% metanola i na kraju sa 10 mL 30% metanola. Posle ispiranja, ulošci se eluiraju sa 5 mL 0,1% TFA u metanolu. Dobijeni eluat se uparava u struji azota do suvog, a zatim rastvori u 20 mL metanola. Metanolni rastvor se propusti kroz silikagel uložak (Sep-Pak), koji je prethodno pripremljen sa 20 mL metanola. Nakon nanošenja uzorka uložak se ispira sa 20 mL metanola, a zatim eluira sa 20 mL 10% voda-0,1% TFA u metanolu. Uzorak se upari do suvog a zatim rastvori u 1 mL mobilne faze (0,1% TFA u metanolu : 0,1% TFA u vodi/60 : 40). Ovakav uzorak je spreman za HPLC analizu, a može da se čuva u zamrzivaču na -20° C do trenutka analize.

HPLC/PDA metoda određivanja

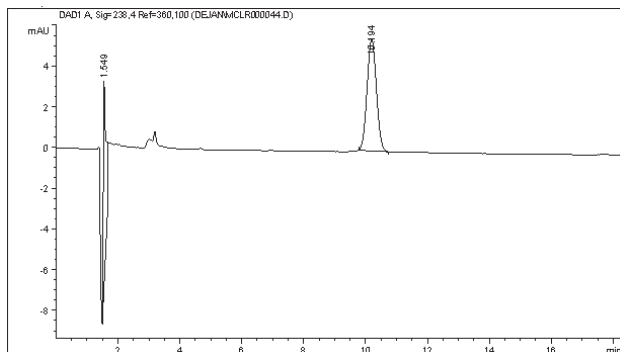
Sadržaj mikrocistina-LR (slika 1) određen je metodom HPLC sa detektorom na principu fotodiode (*photodiode*



Sl. 1 – Opšta struktura mikrocistina (MCYST); X i Z su promenljive L-aminokiseline [kod mikrocistina-LR, x = L-leucin (L), a Z = L-arginia (R)]

array – PDA) (Agilent 1200, SAD). Za analizu korišćena je kolona RP C18 Zorbax Eclips (4,6 × 150, 5µm). Pre početka analize kolona je kondicionirana mobilnom fazom oko 60 minuta pri protoku od 1 mL/min. Zapremina injektovanog uzorka bila je 50 µL. Mikrocistin-LR je korišćen kao sta-

ndard. Eluiranje je vršeno izokratski pri sastavu mobilne faze 0,1% rastvor TFA u metanolu : 0,1% vodeni rastvor TFA u odnosu 60 : 40 (v/v). Detekcija PDA praćena je na 238 nm. Takođe, detektor je pre početka merenja bio ukljućen 60 minuta. Retencionna vremena i pikovi UV spektara su upoređeni sa standardima, što je iskorišćeno za identifikaciju jedinjenja. Pik mikrocistina-LR registrovan je posle 10 min (slika 2).



Sl. 2 – Hromatogram standarda mikrocistina-LR

Rezultati

Validacijom metode potvrđena je linearnost metode sa koeficijentom korelacije $r > 0,995$ ($r = 0,9972$) i odgovarajućom jednačinom $y = 1323 \times -2988$. Za limit detekcije (LoD) određena je vrednost od $3,6 \mu\text{g/L}$, a za limit kvantifikacije

glasnosti sa ovim vrednostima. Vrednost za pH (preko 8) i alkalitet ukazali su da se radi o blagoalkalnim vodama. Podaci za mutnoću i potrošnju kalijum permanganat (KMnO_4) pokazuju da se radi o vodi sa visokim sadržajem organskih materija koje nastaju primarnom proizvodnjom, kao i usled ljudske aktivnosti poput ribolova, navodnjavanja, đubrenja okolnih njiva, bacanja otpada u samu vodu, itd. Visok sadržaj azota je bio takođe evidentan, a činjenica da je gotovo sav azot bio u formi amonijačnog jona, a manji deo u formi nitrita i nitrata ukazao je na to da je reč o redukcionoj vodenoj sredini, gde nije moguć prelazak amonijačnog azota u nitritni i nitratni oblik. Uočena je visoka koncentracija kiseonika tokom letnjih meseci, koja je rezultat visoke koncentracije hlorofila, a koja je detektovana tokom istog perioda. Iako je koncentracija kiseonika bila visoka, pretpostavlja se da visoka temperatura vode (preko 30°C) i organsko opterećenje, ne dozvoljavaju oksidaciju jona amonijuma. Koncentracije rastvornog fosfora bile su niske u periodu kad su vršena merenja, dok su koncentracije organski vezanog fosfora bile izrazito visoke. Uzrok ovakvog stanja su cijanobakterije i drugi fitoplanktoni koji fiksiraju fosfor i koriste ga za svoj razvoj.

Visoke vrednosti hlorofila i dobijene vrednosti fizičko-hemijskih parametara ispitivanja vode pokazuju da je reka Ponjavica veoma eutrofna voda, što predstavlja idealne uslove za razvoj cijanobakterija.

U tabeli 2 date su koncentracije mikrocistina-LR izmerene u uzorcima vode tokom perioda ispitivanja. Razlike u

Tabela 2
Vrednosti koncentracija mikrocistina-LR u vodi za period jun-novembar 2008. godine

Mesec	Mikrocistin LR ($\mu\text{g/L}$)			
	Lokacija 1	Lokacija 2	Lokacija 3	Lokacija 4
Jun	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Jul	0,5	0,6	0,5	0,5
Avgust	1,1	1,0	1,3	0,9
Septembar	1,1	1,5	1,5	1,2
Oktoibar	0,3	0,3	0,2	< 0,1
Novembar	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

(LoQ) $6,8 \mu\text{g/L}$. Dobijene *recovery* vrednosti, za utvrđivanje tačnosti metode, bile su slične za sva tri ispitivana nivoa koncentracija (za koncentraciju od $50 \mu\text{g/L}$ srednja vrednost *recovery* je $89,89\%$; za koncentraciju od $100 \mu\text{g/L}$ srednja vrednost *recovery* je $90,66\%$ i za koncentraciju od $200 \mu\text{g/L}$ srednja vrednost *recovery* je $93,99\%$). Preciznost metode je potvrđena dobijenim parametrom % RSD u vrednosti od $2,461$ sa 95% granicom pouzdanosti od $2,057$.

Kombinovana merna nesigurnost iznosila je $2 \mu\text{g/L}$, a proširena merna nesigurnost $U = 2 \times 2 = 4 \mu\text{g/L}$, tj. 5% .

Analiza vode reke Ponjavice urađena je detaljno tokom juna, jula, avgusta, septembra, oktobra i novembra 2008. godine u Institutu za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”. Fizičko-hemijski parametri kvaliteta vode pokazali su da površinska voda Ponjavice sadrži visoku koncentraciju rastvornih soli što se zaključuje iz podataka o elektroprovodljivosti ovih voda, koja se kreće od 900 do $2\,000 \mu\text{S/cm}$. Podatak o visokim koncentracijama kalcijumovih i magnezijumovih soli hlorida, sulfata i hidrogenkarbonata bio je u sa-

koncentracijama mikrocistina-LR sa različitih lokaliteta za ispitivane mesece nisu bile izražene, ali je konstatovano povećanje sadržaja mikrocistina-LR za period od juna do septembra kada dostiže maksimum na svim ispitivanim lokacijama, da bi nakon toga usledio pad u koncentraciji mikrocistina. Uočeno je da su tokom juna i novembra koncentracije mikrocistina-LR bile ispod granice detekcije, a tokom avgusta i septembra koncentracija je prelazila maksimalnu dozvoljenu koncentraciju za pijaću vodu ($1 \mu\text{g/L}$) koju propisuje Svetska zdravstvena organizacija.

Diskusija

Ograničenost vodenih resursa i sve veća potreba ljudi za kvalitetnom vodom predstavlja veliki globalni problem. Poznato je da su količine podzemnih voda ograničene, tako da stanovništvo svoje potrebe zadovoljava prvenstveno korišćenjem površinskih vodenih resursa. Iz tog razloga briga o kvalitetu površinskih voda, a time i o zdravstvenom stanju

korisnika vode, dobija na sve većem značaju kako u svetu tako i kod nas. Može se reći da su površinske vode, kao deo životne sredine, pod velikim uticajem ljudskih aktivnosti koje negativno utiču na životnu sredinu. Takve aktivnosti su, pored prirodnih procesa, glavni uzročnik povećanja sadržaja nutrijenata fosfora i azota u površinskim vodama, što uz ostale faktore, dovodi do eutrofikacije površinskih voda i njihovog zagađenja. Cijanobakterije zauzimaju važno mesto u takvim vodama, s obzirom na to da proizvode veoma toksične mikrocistine.

Poslednjih godina rasvetljeni su razlozi pojavljivanja brojnih cijanobakterija u površinskim vodama, okarakterisani su novi toksini cijanobakterija, a pored toga mnogobrojna istraživanja su olakšala razumevanje mehanizma toksičnog dejstva cijanobakterija na životinje i ljude. Treba istaći da je kontrola cijanobakterija i toksina koje one proizvede razvijene u svetu, što nije slučaj sa našom zemljom, iako je za određene površinske vode karakterističan problem eutrofikacije.

U ovom radu je modifikovan postupak pripreme uzorka i definisani su uslovi za određivanje mikrocistina-LR metodom HPLC sa PDA detektorom. U odnosu na prethodne postupke pripreme uzoraka¹³ u kojima se koriste kolone C18, u postupku pripreme datom u ovom radu dodatno se uvodi i primena Sep-Pak silikonskih kolona. Za kvantifikaciju, kao što propisuje i ISO 2005¹⁴ korišćena je HPLC/PDA metoda pri čemu su definisani optimalni uslovi merenja. Dobijeni parametri validacije ukazuju na to da je postavljena metoda precizna, tačna i osetljiva, sa mernom nesigurnošću $\pm 5\%$. Metoda se, takođe, pokazala jednostavnom i brzom za izvođenje. U poređenju sa nedavnim ispitivanjima¹⁵ postignut je bolji prinos i % RSD, iako je osetljivost bila manja i vrednost limita detekcije viša.

Park prirode Ponjavica izložen je prirodnim procesima i ljudskim aktivnostima i, prema već objavljenim podacima, svrstava se u ugroženija područja. Dugogodišnja nebriga dovela je do toga da reka polako „odumire“ i tako ugrožava celokupni živi svet povezan sa ovom rekam¹¹ te je prema ispitivanjima Zavoda za zaštitu zdravlja Pančevo voda Ponjavice uvrštena u IV kategoriju voda¹⁶. Ako uzmemo u obzir to da je Ponjavica bila u II kategoriji voda, onda ovaj podatak treba svakako da zabrine nadležne organe i alarmira na hitnu akciju.

Naši rezultati potvrđuju hiperprodukciju koja dalje vodi u veliko organsko opterećenje vode. Ovo sa sobom nosi promenu pH vrednosti vode, povećanje potrošnje kiseonika kao i nastajanje štetnih produkata raspada organskih materija, što se odražava na živi svet u vodi.

Rezultati uzoraka vode reke Ponjavica pokazali su da je vrednost mikrocistina-LR dostigla maksimum tokom avgusta

i septembra (oko 1,5 $\mu\text{g/L}$), što je iznad maksimalno dozvoljene koncentracije koju propisuje Svetska zdravstvena organizacija za vodu za piće (1 $\mu\text{g/L}$)¹, s obzirom na nedostatak regulative za druge vrste voda. Porast sadržaja mikrocistina-LR u letnjim mesecima može se objasniti povećanom produkcijom *Mikrocystis aeruginosa*, dominantne vrste u letnjem periodu, kada kvalitet vode pogoduje njenoj proliferaciji. Tokom leta primećeno je i prisustvo vodenog cveta u obliku zelene skrame na površini vode, a nakon analize utvrđeno je da cvet čini *Mikrocystis aeruginosa*.

Mora se istaći da je, na osnovu fizičko-hemijskih osobina vode i dominantnog prisustva *Mikrocystis aeruginosa* u vodi, očekivana viša koncentracija mikrocistina-LR kao glavnog produkta ovih algi. Tako, u vodama sa sličnim fizičko-hemijskim i biološkim karakteristikama nađene su više koncentracije mikrocistina. U vodama Meiliang Bay u Kini, koje, takođe, pripadaju grupi hipertrofnih jezera, koncentracije mikrocistina-LR iznosile su oko 10 $\mu\text{g/L}$ ¹⁷. Slični rezultati dobijeni su analizom uzoraka vode iz jezera Aasee u Nemačkoj koje, takođe, pripada grupi hipertrofnih jezera. Analize su rađene tokom septembra 2002. godine, a koncentracije mikrocistina-LR bile su u intervalu od 0,6 do 18,3 $\mu\text{g/L}$ ¹⁵. Vrednosti koncentracije mikrocistina-LR dobijene u ovom radu mogu se objasniti činjenicom da mikrocistin-LR nije stabilan molekul u vodi sa visokim sadržajem huminskih supstanci, pri jakoj sunčevoj svetlosti i temperaturama vode iznad 30°C¹⁸. Pretpostavlja se da je to uzrok degradacije mikrocistina-LR i pojave niže koncentracije u našim uzorcima.

Zaključak

U ovom radu je predložena metoda pripreme uzoraka vode i određivanje mikrocistina-LR HPLC/PDA metodom koja se na osnovu dobijenih parametara validacije može prihvatiti kao metoda pogodna za rutinsku analizu mikrocistina-LR. Data metoda je primenjena za određivanje mikrocistina-LR u uzorcima vode reke Ponjavice, kao dela parka prirode „Ponjavica“. Dobijeni rezultati pokazali su da se vrednosti mikrocistina-LR, koje su dostigle maksimum tokom avgusta i septembra (oko 1,5 $\mu\text{g/L}$), na osnovu podataka iz literature mogu smatrati povišenim, ali ne i alarmantnim. No, neophodno je nastaviti sa monitoringom mikrocistina-LR i preduzeti odgovarajuće mere u cilju očuvanja bogatstva prirode ovog kraja.

Zahvalnica

Ovaj rad delom je finansiralo Ministarstvo nauke i prosvete Republike Srbije (Projekat III46009).

L I T E R A T U R A

1. WHO. Guidelines for drinking water quality. 2nd ed. Contents: v.2. Health criteria and other supporting information. Geneva: World Health Organization; 1998.
2. Carmichael WW, Beasley VR, Bunner DL, Eloff JN, Falconer I, Gorham P, et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon 1988; 26(11): 971–3.
3. Kearns KD, Hunter MD. Toxin-producing *Anabena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. Microb Ecol 2001; 42(1): 80–6.
4. WHO. Guidelines for safe recreational water environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. Algae and cyanobacteria in fresh water. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 136–58.

5. *Teixeira Mda G, Costa Mda C, de Carvalho VL, Pereira Mdos S, Hage E.* Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 1993; 27(3): 244–53.
6. *Williams DE, Dave SC, Kent ML, Andersen RJ, Craig M, Holmes CFB.* Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* 1997; 35(11): 1617–25.
7. *Dawson RM.* The toxicology of microcystins. *Toxicon* 1998; 36(7): 953–62.
8. *Tisdale E.* Epidemic of intestinal disorders in Charleston, West Virginia, occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *Am J Public Health* 1931; 21: 198–200.
9. *Zilberg B.* Gastroenteritis in Salisbury European children - a five-year study. *Cent Afr J Med* 1966; 12(9): 164–8.
10. *Pouira S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ,* et al. Fatal microcystin intoxication in hemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 1998; 352(9121): 21–6.
11. *Obušković Lj.* Phytoplankton and saprobiological characteristics as indicators of rapid eutrophication of the river Ponavica (South Banat). In: editors. Conference on current problems of water protection. Neam 1991; Proceedings of the Conference on current problems of water protection; 1991 May 20–25. Belgrade: Jugoslovensko društvo za zaštitu voda; 1991. p. 333–7. (Serbian)
12. *Šuljagić V.* Test methods checking and determination of measuring uncertainty. Belgrade: Centar za obrazovanje "Qualitass education"; 2006.
13. *Tsuji K, Naito S, Kondo F, Watanabe MF, Suzuki S, Nakazawa H,* et al. A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicon* 1994; 32(10): 1251–9.
14. *ISO.* Water Quality: Determination of microcystins – method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. ISO 20179:2005. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
15. *Triantis T, Tsimeli K, Kaloudis T, Thanassoulas N, Lytras E, Hiskia A.* Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon* 2010; 55(5): 979–89.
16. Report on the state of environment in the territory of the town Pančevo for the year 2008. Pančevo: Službeni list grada Pančeva 9/2009. 2009. (Serbian)
17. *Mathys W, Surbolt B.* Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207(6): 601–5.
18. *Shen PP, Shi Q, Hua ZC, Kong FX, Wang ZG, Zhuang SX,* et al. Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environ Int* 2003; 29(5): 641–7.

Primljen 25. XIII 2010.

Revidiran 27. XI 2011.

Prihvaćen 5. II 2012.