

NATALIA WANDA SKINDER

## BADANIA NAD FIZJOLOGIĄ SINIC W OSTATNIM PIĘTNASTOLECIU

Sinice (*Cyanophyta*) są bardzo starą, bo wywodzącą się z prekambrium, jak również najszerzej rozprzestrzenioną grupą roślin, liczącą zaledwie 160 rodzajów z 1400 gatunkami (Starmach 1963). Jednak ze względu na trudności hodowli sinic w warunkach laboratoryjnych oraz na kłopotliwe ich oczyszczanie od bakterii, są one najmniej poznany od strony fizjologicznej typem świata roślinnego. I aczkolwiek badania fizjologiczne tych glonów można wyprowadzić od czasów Franka, który w 1889 roku przypisywał sinicom zdolność asymilacji azotu atmosferycznego, to jednak dopiero po II wojnie światowej przybrały one rozmiary badań na skalę istotnie szeroką.

### I. Tematyka badań oraz rozmieszczenie pracowni algofizjologicznych sinic

W ciągu ostatniego piętnastolecia fizjologiczne badania sinic skupiały się w zasadzie na takich problemach, jak: a) hodowla w warunkach laboratoryjnych i półprodukcyjnych oraz otrzymywanie kultur bezbakteryjnych, b) mineralne żywienie, c) fotosynteza, system pigmentów i enzymów, d) asymilacja azotu atmosferycznego, e) wydzielanie substancji toksycznych przez sinice.

Tematyką tą zajmuje się szereg laboratoriów algofizjologicznych różnych krajów. W samych tylko Stanach Zjednoczonych jest kilkanaście tego rodzaju pracowni wyposażonych w najnowocześniejszą aparaturę badawczą. Do najsłynniejszych należą laboratoria fizjologiczne w Michigan, Cincinnati w st. Ohio, Austin w st. Teksas, Richmond w st. Wirginia oraz znany z zainicjowania teorii algicydowej Madison w st. Wisconsin, z fizjologami tej miary, co Fitzgerald, Gerloff i Skoog. Także Kanada ma parę większych placówek zajmujących się fizjologią sinic, z których najsłynniejsza mieści się w Ottawie, gdzie w roku 1960 Gorham ze współpracownikami wyizolował toksynę sinicową V-FDF.

Po Ameryce, na szczególną uwagę zasługują bardzo intensywnie prowadzone badania fizjologów japońskich, z centralnym ośrodkiem w Tokio. Bowiem właśnie

uczni Nipponu przyczynili się walnie do poznania tajemnic hodowli sinic oraz wykorzystali je masowo w użyźnianiu pól ryżowych.

Szeroko prowadzone są badania nad fizjologią sinic w Związku Radzieckim, szczególnie w Moskwie, Kijowie, Odessie i Leningradzie. Nadto należy jeszcze wymienić pracownie brytyjskie w Londynie, Westmorelandzie i Edynburgu, francuskie w Paryżu i Gif-sur-Yvette, niemieckie w Berlinie, Tübingen i Getyndze, szwedzkie w Lund i Uppsali oraz szwajcarskie; w Zürichu mieści się siedziba Międzynarodowego Stowarzyszenia Badaczy Sinic (JAC), kierująca całością prac nad sinicami. Wypada dodać, iż w Polsce badania z zakresu fizjologii sinic nie były dotychczas prowadzone.

## II. Omówienie problematyki badań fizjologicznych nad sinicami

1. Hodowla sinic w warunkach laboratoryjnych i półproducyjnych oraz oczyszczanie sinic od bakterii.

Podczas prowadzenia wszechstronnych badań fizjologicznych sinic, powstaje problem hodowli w warunkach laboratoryjnych, gdzie nie znosząc wprost czystych pożywek mineralnych, glony te ulegają zmianom morfologicznym. Jednakże ustalono już szereg pożywek dla kultur sinic, przy czym ich dobór jest ściśle uzależniony od gatunku *Cyanophyta*. Najbardziej polecaną jest pożywka Chu nr 10 w modyfikacji Gerloffa (Gerloff, Fitzgerald i Fogg 1950) i pożywka Goriunowej (Sirenko i Bogdanowa 1965), o składzie chemicznym (w g/l) podanym w tab. 1.

Tabela 1

pożywka Chu nr 10:	pożywka Goriunowej:
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . . 0,040	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . . 0,500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . . 0,010	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . . 0,300
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . . 0,025	MgCl <sub>2</sub> . . . . . 0,100
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O . . . . . 0,020	FeSO <sub>4</sub> . . . . . 0,010
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . . . . . 0,025	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O . . . 0,0015
cytrynian Fe . . . . . 0,003	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> . . . . . 0,0015
kw. cytrynowy . . . . . 0,003	

W związku z trudnościami prowadzenia kultur tych glonów, istnieje szereg tajemnic hodowlanych, takich jak np.: dodawanie do pożywek wyciągów torfowych i glebowych, moczu kobiet w ilości 0,1—0,4% (Starmach 1963, 1966), EDTA, czy wreszcie substancji wzrostowych (Sirenko i Bogdanowa 1965). Warto nadmienić, że moskiewscy uczeni, do ponad miesięcznych hodowli, opracowali specjalne dwufazowe pożywki, tzn. pożywkę płynną z blokiem agarowym w środku. Skonstruowali oni również specjalne kilkusztykowe kolby do szczepień (Odojewskaja 1966).

W świetle dotychczasowych badań, perspektywy wykorzystania sinic w gospodarce człowieka są tak duże, że w Japonii i USA już się myśli o przemysłowej produkcji tych roślin. Japończycy obecnie stosują tzw. uprawę półprodukcyjną, w niskich ale szerokich kadziach budowanych na wolnym powietrzu, z automatycznym i stałym mieszaniem kultur. Jak podaje Watanabe (1959), dobowy przyrost w takich warunkach użyźniającego pola ryżowe *Tolypothrix tenuis* wynosi 8 g suchej masy/m<sup>2</sup> pożywki, natomiast *Anabaena cylindrica* aż 26 g/m<sup>2</sup> (Allen 1956).

Sinice z reguły posiadają dość grube śluzowate otoczki, w których żyją bakterie. Otóż otrzymanie bezbakteryjnych kultur tych glonów jest rzeczą niezwykle kłopotliwą. Wprawdzie pierwsze bezbakteryjne kultury 2 gatunków sinic otrzymał już w roku 1913 Pringsheim, stosując zwykłe przeszczepianie nitek na agarze mineralnym (Prat 1965), jednak jest to żmudna i czasochłonna praca.

Obecnie stosuje się w tym celu naświetlanie promieniami ultrafioletowymi, co zaleca od 1937 roku Allison, lub używa się antybiotyków, zastosowanych po raz pierwszy przez Felfoldeya i Kalno w roku 1959. Żadna z tych metod jednak nie jest wystarczająca. Dwa lata temu w Związku Radzieckim opublikowano oryginalny sposób oczyszczania sinic od bakterii wodnym (0,01—0,05%) ekstraktem świeżych jagód borówki brusznicy (Odojewskaja, Gierasimienko i Goriunowa 1965). Żałować tylko należy, iż borówka brusznica nie owocuje przez cały rok, albowiem właśnie sezonowość jest największą wadą tej — jak twierdzą autorzy — skutecznej metody.

Dla całości obrazu trzeba dodać, że istnieją także i przeciwnicy oczyszczania sinic od bakterii, do których należą m. in. Thomas i Bierszowa. Twierdzą oni, że bezbakteryjne kultury sinic są artefaktem w porównaniu ze spotykanymi w przyrodzie. Prawdopodobnie bakterie mieszkające w otoczkach *Cyanophyta* wydzielają substancje (m. in. wzrostowe, Bierszowa 1959) potrzebne gospodarzom dla ich pełnego rozwoju.

## 2. Mineralne odżywianie sinic.

Omawiane glony są grupą roślin o bardzo skromnych ale swoistych wymaganiach odżywczych. W warunkach naturalnych szczyt krzywej ich rozwoju przypada na depresję rozwoju innych gatunków fitoplanktonu oraz zooplanktonu (Manuilowa 1962). Mimo wielu badań laboratoryjnych, nie ustalono wymagań sinic co do mineralnego ich odżywiania. W bardzo ogólnych zarysach zapotrzebowanie sinic na makroelementy określa skład pożywki Chu nr 10. Niemniej jednak, w świetle najnowszych badań, problem ten wydaje się być ściśle uzależniony od rodzaju sinic. Ustalono np. że dla swojego maksymalnego rozwoju glony z gatunku *Coccolchloris peniocyctis* (Gerloff, Fitzgerald i Skoog 1950b) wymagają 13, 6 ppm N, 0,45 ppm P, 0,83 ppm S, 2,25 ppm K, 0,13 ppm Mg, 0,03 ppm Fe oraz nieokreślonej bliżej ilości wapnia i sodu, przy czym azotu winno być trzydziestokrotnie, a siarki dwukrotnie więcej niż fosforu, także znacznie więcej ma być Na niż K. Dla dobrego rozwoju sinic z rodzaju *Anabaena*, *Nostoc* i *Anacystis* korzystny jest stosunek Na:K jak 8:1, z tym, że ilość sodu waha się w granicach 4—40 ppm, a potasu od 0,5 do 5 ppm (Kratz i Myers 1954).

Źródłem azotu dla sinic mogą być azotany, azotyny, sole amonowe, mocznik, a dla niektórych gatunków także i azot atmosferyczny, którego asymilację stymulują śladowe ilości molibdenu, natomiast hamują sole amonowe (Starmach 1966).

Nie bez znaczenia dla rozwoju sinic jest stężenie jonów wodorowych oraz dwutlenku węgla. Zresztą te dwa elementy pozostają ze sobą w ścisłej korelacji, a mianowicie, przy obniżaniu się pH zwiększa się zapotrzebowanie na  $\text{CO}_2$ . Np.: przy pH 7,5 najkorzystniejsze dla 5 gatunków sinic z rodzajów *Anabaena*, *Nostoc* i *Anacystis* jest 0,5% stężenie  $\text{CO}_2$ , a przy pH 6,8 już aż 4% stężenie dwutlenku węgla (Kratz i Myers 1954). Na ogół sinice lubią jednak odczyn alkaliczny m. in. dla utrzymania dość wysokiego pH, korzystne są związki chelatyzujące, których często dodaje się do kultur. Natomiast mikroelementy nie mają podobno większego wpływu na rozwój tutaj omawianych glonów. Nadto badacze amerykańscy dowiedli, iż sinice mają zdolność wybiórczego gromadzenia ze środowiska niektórych mikroelementów, będących tam w niewysokim stężeniu. Bazując na tym, radzieccy uczeni Argie i Rajko (1964) stwierdzili u niektórych gatunków z rodzajów *Oscillatoria*, *Rivularia*, *Amorphonostoc* i *Lyngbya* zdolność akumulacji radioaktywnego  $\text{Sr}^{90}$  ze środowiska. W dobie wzmoczonych doświadczeń nuklearnych rola sinic jako biosorbentów może mieć duży aspekt gospodarczy.

### 3. Fotosynteza oraz system pigmentów i enzymów.

Mimo intensywnie prowadzonych badań nad tym zagadnieniem w kilku ośrodkach naukowych, rezultaty ich są raczej skromne. Stwierdzono, iż produktem fotosyntezy omawianych tutaj glonów jest rozproszona po całej chromat- i centropłazmie tzw. skrobia sinicowa (o nieznannej bliżej budowie chemicznej), która podobnie jak i glikogen daje z jodem w KJ brunatne zabarwienie. Materiałem zapasowym są glikoproteidy.

Ze względu na piękne zabarwienie sinic, od niebiesko-sino-oliwkowego poprzez żółto-zielone, fioletowe, różowe, karminowo-czerwone aż do prawie czarnego, bardzo interesujące mogą być studia nad systemem pigmentów. Zajmują się tym m. in. fizjologzy radzieccy (Sirenko, Gusiew), japońscy (Hattori, Fujita), amerykańscy (Forrest, Baalen, Myers, Kratz), angielscy (Fogg), francuscy (Garnier, Lefort, Lefrançois) i niemieccy (Richter). Stwierdzono u sinic istnienie takich barwników, jak chlorofil a,  $\beta$ -karoten, c-fikocjan, c-fikoerytryna, miksoksantyna, fikoksantyna i miksoksantofil. Nadto Gemsch wykrył u *Gleocapsa sanguinea* interesujący barwnik gleoksantynę, który przy pH niższym od 6,8 ma barwę czerwoną, a przy wyższym, barwę niebieską (Starmach 1966). Pigmenty sinic zebrane są w submikroskopowe płytki barwnikowe, skupiające się w grupy.

W wyniku żmudnych studiów (Hattori i Fujita 1959, 1960, 1962, 1963, Żewnier, Gusiew, Szestakow 1965, Sirenko 1964, 1966) udało się stwierdzić, że barwa *Cyanophyta* zależy od natężenia i składu spektralnego światła, pH od środowiska oraz gatunku sinic. Jest ona wynikiem różnego wzajemnego stosunku ilościowego pigmentów.

Ściśle z fotosyntezą i pigmentami związane są badania nad fermentami sinic. Wykryto już obecność lipazy, katalazy i proteinyazy. Natomiast amylazy, inulazy, rafinazy, peroksydazy, cellulazy, pektynazy i enzymów glikolitycznych sinice najprawdopodobniej nie posiadają. Niektóre gatunki tych glonów mają zdolność produkowania witaminy B<sub>12</sub>, i to w dość pokaźnych ilościach, np.: *Anabaena cylindrica* wytwarza 1 mg tej witaminy na 1 g suchej masy sinicy.

Szczególnie wiele liczy się obecnie na badania systemu enzymatycznego sinic na preparatach bezkomórkowych, które od roku 1960 są prowadzone m. in. przez Schneidera, Wilsona i Burrisa.

#### 4. Asymilacja azotu atmosferycznego.

Jak słusznie 78 lat temu przypuszczał Frank, sinice są jedyną grupą istot żywych, która posiada gatunki szczególnych autotrofów, mogących żyć wyłącznie kosztem asymilacji CO<sub>2</sub> i azotu atmosferycznego. W roku 1947 znano 14 gatunków, a w 1962 już 40 gatunków sinic asymilujących azot cząsteczkowy. Są to najczęściej glony z rodzajów *Nostoc*, *Tolypothrix*, *Anabaena*, *Cylindrospermum* i *Scytonema*. Mogą one żyć na pożywkach tak na świetle, jak i w ciemności, wykazując przy tym szeroki stopień miksotroficzności. Jednakże asymilacja azotu przebiega lepiej na świetle niż w ciemności. Dotychczas nie stwierdzono obecności żadnych organelli związanych z asymilacją azotu drobinowego (Fogg 1956). Wiadomo tylko, że molibden, wyższe stężenie dwutlenku węgla (Fogg 1960) oraz azotany z dodatkiem próchnicy (Sztina 1965) wpływają korzystnie na proces tej asymilacji, podczas gdy azotany bez próchnicy i sole amonowe ją hamują. Sinice asymilujące azot atmosferyczny potrzebują szczególnie dużo wapnia i sodu (Allen 1952, 1958; Kratz i Myers 1955). Podobno bakterie żyjące w otoczkach tych sinic katalizują pobieranie azotu cząsteczkowego (Bunt 1961).

Intensywność tego procesu jest cechą gatunkową sinic. I tak wg Kuzniecowa (Sztina 1965) jedna komórka *Anabaena* może przyswoić w ciągu doby  $1,2 \cdot 10^{-9}$  mg N<sub>2</sub>. Kuczkarowa i współpracownicy (1965) zbadali, że w identycznych warunkach w ciągu miesiąca 100 ml algologicznie czystej kultury *Anabaena variabilis* wiąże 5,215 mg N<sub>2</sub>, podczas gdy *Cylindrospermum michailovskoense* aż 9,596 mg N<sub>2</sub>, a *Tolypothrix tenuis* (jak podaje Watanabe 1959) tylko około 2,5 mg wolnego azotu.

Na tym odcinku badań fizjologii odnieśli nielada sukces. Dzięki nim zastosowano sinice do nawożenia pól ryżowych, zwiększając znacznie plony, drugiego po pszenicy, zboża na kuli ziemskiej. Zastosowano również te asymilujące atmosferyczny azot glony do zagospodarowywania gleb tropikalnych (Sztina 1965).

#### 5. Wydzielanie substancji toksycznych przez sinice.

Sprawa wydzielania toksyn przez *Cyanophyta* była od 90 lat uważana za wielce problematyczną. Jednakże dzięki badaniom fizjologicznym ostatniego piętnastolecia, a zwłaszcza dzięki pracom Shelubsky'ego (1951), Bishopa i jego współpracowników (1959), Gorhama i współprac. (1960) oraz Sierenkowa i Pachomowej (1965) ów problem został w dużym stopniu wyjaśniony (Skinder 1968). Wiadomo, że niektóre gatunki sinic mogą w pewnych warunkach wydzielać substancje to-

ksyczne. Toksyny te (szerzej opisane przez autora w pracy wyżej cytowanej), o charakterze słabego kwasu, są bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie i odznaczają się bardzo silnymi własnościami trującymi. Najłagodniejsza z nich, FDF, już w ilości 0,0094 mg powoduje w ciągu kilku godzin śmierć 20 g myszy (Sierenko i Pachomowa 1965). Dotychczas wyizolowano z sinic trzy toksyny o wyżej wspomnianych właściwościach, a mianowicie: FDF (Bishop i współprac. 1959), V-FDF (Gorham i współprac. 1960) oraz jak podaje Starmach (1963) hydroksyloaminę  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Dwie pierwsze pod względem budowy chemicznej są policyklopektydami.

Zgodnie z doniesieniami wielu badaczy (Hughes i współprac. 1958, Ingram i Prescott 1954, Iwanowa 1965, Olson 1960, Shelubsky 1951, Starmach 1963, 1966, Telitzenko i współprac. 1965) toksyczność sinic (np. *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *A. variabilis*) objawia się podczas bardzo intensywnych zakwitów monokulturowych, szczególnie w krajach strefy klimatu gorącego.

Obecnie ożywione prace badawcze nad tym niezwykle ciekawym i mało po-znanym zagadnieniem prowadzi się w Kanadzie, ZSRR, Izraelu i USA. Należy się spodziewać, iż najbliższe lata przyniosą dalsze wyniki dotyczące tego tematu.

Reasumując badania nad fizjologią sinic ostatniego piętnastolecia, należy stwierdzić, że rozwijają się one w tempie isticie dwudziestowiecznym. Np.: liczba publikacji w ostatnich trzech latach (1964—1967) wzrosła o 170% w porównaniu z okresem poprzednim (1961—1964). W Związku Radzieckim w ciągu pięciu lat (1960—1965) liczba badaczy fizjologii sinic zwiększyła się przynajmniej dwukrotnie w porównaniu z latami 1955—1960. Ponadto dość często zakłady naukowe poszerzają swoje badania o fizjologię i biochemię sinic. Niemniej prace te są co najmniej o pół wieku spóźnione w porównaniu z pracami nad fizjologią roślin wyższych.

Jednak należy się cieszyć, iż po pokonaniu pierwszych trudności przede wszystkim natury hodowlanej, rozwijają się one pomyślnie i wszechstronnie, przynosząc pożytek zarówno nauce, jak i gospodarce człowieka.

Katedra Fizjologii Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego

#### LITERATURA

- Agrie A. L. i Rajko A. P., 1964. *Fizjolog. rastenij*, 11, 1, 135—137.  
 Allen M. B., 1952. *Arch. Microbiol.*, 17, 34.  
 Allen M. B., 1956. *Scient. Monthly*, 83, 100.  
 Allen M. B., 1958. *Trans. Internat. Conf. use Solar Energy. Scient. Basis*, 4, 27.  
 Allison R. K., i współprac., 1954. *Plant Physiol.*, 29, 16.  
 Bierszowa O. I., 1959. *Mikrobiol. żurn.*, 21, 4.  
 Bishop C. T., Anet E. F. L. J. i Gorham P. R., 1959. *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 37, 453—471.  
 Cox R. M., 1966. *Arch. f. Mikrobiologie*, 53, 3, 263—276.  
 Fogg G. E., 1956. *Annual Rev. Plant. Physiol.*, 7, 51.  
 Fogg G. E. i Than-Tun, 1960. *Proc. Soc. B*, 153, 111.



- Fujita Y. i Hattori A., 1960. *Plant a Cell Physiol.*, 1, 293.
- Fujita Y. i Hattori A., 1962. *J. Biochem.*, 51, 89.
- Fujita Y. i Hattori A., 1963. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 2.
- Gerloff G. C., Fitzgerald G. P. i Skoog F., 1950a. *Amer. J. of Botany*, 37, 3, 216—218
- Gerloff G. C., Fitzgerald G. P. i Skoog F., 1950b. *Amer. J. of Botany*, 37, 10, 835—840.
- Gorham P. R., 1960. *Can. Vet. J.*, 1, 235—245.
- Goriunowa S. W., Odojewska N. S. i Gierasimienko L. M., 1965. *Mikrobiologia*, 34, 6, 1077—1079.
- Gusiew M. W., 1966. *Uspiechy mikrobiol.* 3, 74—103.
- Hattori A. i Fujita Y., 1959. *J. Biochem.*, 46, 5.
- Hughes E. O., Gorham P. R. i Zehnder A., 1958. *Can. J. Microbiol.*, 4, 225—236.
- Ingram W. M. i Prescott G. W., 1954. *Am. Midland Naturalist*, 52, 75—87.
- Iwanowa M. W., 1965. *Ekologia i fizjologia siniezielonych wodoroslej*. Moskwa — Leningrad, AN SSSR, 183—185.
- Kratz W. A. i Myers J., 1955. *Amer. J. Bot.*, 42, 282—287.
- Kuczkarowa A. M., Maksudow T. U. i Chodżajewa Woropajewa O. G., 1965. *Materiały zakawkask. konferencji po spor. rast.*, Baku, AN Azerb. SSR, 55—57.
- Odojewska N. S., 1966. *Mikrobiologia*, 35, 2, 365—368.
- Olson T. A., 1960. *Amer. J. Public. Health*, 50, 883—884.
- Prat S., 1965. *St. si cerc. biol., Seria botanica*, 17, 3, 229—254.
- Sierenkow G. P. i Pachomowa M. W., 1965. *Ekologia i fizjologia siniezielonych wodoroslej*, Moskwa — Leningrad, AN SSSR, 182—183.
- Sirenko L. A., 1964. *Ukr. botan. żurnal*, 21, 5, 1—17.
- Sirenko L. A., 1966a. *Gidrobiolog. żurnal*, 3, 73—74.
- Sirenko L. A., 1966b. *Gidrobiolog. żurnal*, 5, 71—73.
- Sirenko L. A., 1966c. *Ukr. botan. żurnal*, 23, 1, 3—8.
- Sirenko L. A. i Bogdanowa T. L., 1965. *Ekologija i fizjologia siniezielonych wodoroslej*, Moskwa — Leningrad, AN SSSR, 195—201.
- Skinder N. W., 1968. *Wiadom. Botan.*, 9, 2 (w druku).
- Starmach K., 1963. *Flora słodkowodna Polski*, t. I, Warszawa, PWN.
- Starmach K., 1966. *Flora słodkowodna Polski*, t. II, Warszawa, PWN.
- Sztina E. A., 1965. *Ekologia i fizjologia siniezielonych wodoroslej*, Moskwa — Leningrad, AN SSSR, 160—177.
- Telitzenko M. M., Gusiew M. W., 1965. *Dokł. AN SSSR*, 160, 6, 1424—1426.
- Watanabe A., 1959. *J. Gen. and Appl. Microbiol.*, 5, 85.
- Żewnier W. D., Gusiew M. W. i Szestakow S. W., 1965. *Mikrobiolog.*, 34, 2, 209—215.