

# WPŁYW CZYNNIKÓW ZEWNĘTRZNYCH NA WZROST SINIC I SYNTEZĘ TOKSYN

Effect of the external factors on cyanobacteria growth and synthesis of toxins

Ewa MEJ, Zbigniew LECHOWSKI

**Summary.** The cyanobacteria water blooms are a frequent and common phenomenon, particularly in eutrophic water bodies. The knowledge of the response of various cyanobacteria species to environmental conditions may contribute to the limitation of dynamically developing water blooms dangerous for living organisms. This is the most important that the microcystins can occur at low concentrations in the water several weeks after the disappearance of the blooms. Different strains even of the same species of cyanobacteria frequently manifest a different response to the action of the same external factors. In similar conditions of growth they produce various quantities of the same types of toxins. The same strains of cyanobacteria can produce different types of toxins with various doses of the applied factor (e.g. the temperature or PAR). The optimum conditions of growth of cyanobacteria are not always optimal for the synthesis of toxins. The results of laboratory experiments obtained by different authors and concerning the same strains frequently differ to a great degree, probably owing to methodological differences e.g. the use of different media, irradiation sources, methods of toxin measurements, or units of biomass and toxin determination. Laboratory experiments concentrated on the effects of a single factor on the synthesis of toxins can not be directly referred to natural conditions, where the mutual relations occur in an entire complex of external factors. In spite of numerous unknown elements one is not disputable: changes in the conditions of growth do not induce non-toxic strains to the synthesis of toxins. Similarly they do not inhibit this kind of synthesis in strains potentially able to carry it out.

**Key words:** cyanobacteria, elements, light and temperature conditions, toxins.

*Mgr Ewa Mej, dr hab. Zbigniew Lechowski, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego, Al. Mickiewicza 3, 31–120 Kraków*

## WSTĘP

Pojawiające się coraz częściej toksyczne zakwitki fitoplanktonu wyraźnie wskazują na wzrost eutrofizacji wód morskich i śródlądowych [54]. Głównymi producentami toksyn w morzu są bruzdnice i złotowiciowce [52], natomiast w wodach śródlądowych sinice [25]. Sinice (*Cyanophyta*) należą do gram-ujemnych fotosyntetyzujących *Procarvota* o kosmopolitycznym występowaniu i możliwościach przystosowania się do warunków różnych środowisk, zarówno wodnych jak i lądowych. Preferują one szczególnie stawy, jeziora i zbiorniki zaporowe. Poszczególne gatunki sinic charakteryzują się

różną zdolnością przystosowawczą do życia w planktonie, jednakże gatunki potencjalnie toksyczne, zdolne do tworzenia zakwitów, wykazują pewne cechy wspólne. Jedną z nich jest obecność wakuol gazowych, których istnienie umożliwia przemieszczanie się osobników w pionie toni wodnej. Występujące zmiany w objętości wakuol gazowych ułatwiają reorientację glonów do optymalnych warunków napromieniowania słonecznego, wzmoczoną absorpcję związków mineralnych oraz stwarzają najkorzystniejsze warunki wzrostu. W zbiorniku wodnym sinice koncentrują się w dużych ilościach przy jego powierzchni, co powoduje zmianę barwy wody na niebiesko-zieloną. Mogą one być wtedy łatwo

spychane przez wiatr do zatok, gdzie tworzą postać grubego kożucha lub napowierzchniowej piany [54].

Zakwity wody są wynikiem masowego pojawiania się w zbiornikach wodnych pewnych gatunków sinic, głównie: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Trichodesmium sp.* [45]. Stanowią one problem nie tylko natury estetycznej i rekreacyjnej, lecz przede wszystkim zdrowotnej, ze względu na produkcję związków toksycznych zarówno dla zwierząt jak i dla człowieka [7]. Pierwsze doniesienia dotyczące zatrucia toksynami syntetyzowanymi przez sinice pochodzą z XIX wieku z Anglii [21]. Najwcześniejsze doniesienia z Polski na temat zatruc zwierząt hodowlanych sięgają lat 30. naszego stulecia, kiedy to w roku 1934 doszło do zachorowań zwierząt pojonych wodą z Jeziora Cichego [18]. Obecnie informacje o występowaniu toksyn sinicowych oraz o letalnych zatruciach zwierząt domowych i dziko żyjących stają się coraz częstsze i napływają z różnych kontynentów. Problem zakwitów sinicowych jest szczególnie ważny, gdy organizmy te pojawiają się w zbiornikach będących źródłem wody pitnej dla aglomeracji ludzkich. Toksyny sinicowe mogą prowadzić m. in. do uszkodzenia ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego człowieka, nowotworów wątroby czy skóry [45]. Toksyny sinicowe, będące metabolitami wtórnymi, należą do jednych z najbardziej trujących substancji syntetyzowanych przez organizmy żywe. Wielkość dawki letalnej toksyny zależy od rodzaju sinicy, którą ją produkuje i waha się w granicach 9–200g kg<sup>-1</sup> masy ciała (przy iniekcji dootrzewnowej myszy). Pod względem budowy chemicznej substancje te reprezentują peptydy, alkaloidy lub związki heterocykliczne [8, 9, 43, 49]. Ogólnie, toksyny syntetyzowane przez sinice można podzielić na kilka grup, przyjmując za kryterium podziału rodzaj uszkodzanych tkanek, narządów oraz mechanizm działania. Najczęściej wyróżnia się: neurotoksyny, hepatotoksyny, dermatotoksyny, cytotoksyny i inne [6, 10, 45, 49, 50]. Główne typy toksyn mogą nieco różnić się budową chemiczną, a produkcja wyróżnionych na tej podstawie ich odmian może

przeważać w pewnych częściach świata [49, 50]. W ostatnich latach liczba wyizolowanych i scharakteryzowanych toksyn szybko wzrasta, a wiele nowych związków czeka jeszcze prawdopodobnie na odkrycie. Opisano także kilka nowych bioaktywnych metabolitów wytwarzanych przez sinice, są to m.in. związki antygrzybicze i antywirusowe [34]. Poszczególne gatunki sinic zdolne są do syntezy wielu toksyn jednocześnie, najlepszym przykładem jest *Anabaena flos-aquae*, która syntetyzuje równocześnie neurotoksyny, np. anatoksynę-a(s) oraz hepatotoksyny – wiele różnych odmian mikrocytyny. Z drugiej strony te same rodzaje toksyn mogą być syntetyzowane przez różne gatunki sinic [49]. Jednak nie wszystkie sinice produkują toksyny, a przez to nie wszystkie zakwity są trujące. Częstotliwość pojawiania się masowych toksycznych zakwitów sinicowych może wynosić w różnych częściach świata od 25–95% całkowitej liczby zakwitów [1, 11, 40, 50]. Zakwity wody stanowią też na ogół mieszaninę szczepów toksycznych i nietoksycznych, ponieważ w obrębie tego samego gatunku spotyka się szczepy nietoksyczne, jak również neuro- i hepatotoksyczne [39]. Czasem toksyczność zakwitów nie jest wystarczająca do wywołania letalnych czy ostrych zatruc [27, 48]. Jak wykazały m.in. badania Kotaka i in. [25], maksymalna produkcja toksyn przez sinice przypada w różnych okresach roku i może być odmienna w poszczególnych latach w tym samym jeziorze. Literatura podaje, że zakwity sinicowe cechuje różny stopień toksyczności w zależności od: miejsca, sezonu, dnia i głębokości, z której pochodzi próbka. Różnorodność ta może wynikać z odmiennego składu gatunkowego zakwitu oraz syntezy różnych typów toksyn [3, 11, 17, 33]. Jednakże wyjaśnienie to jest mało prawdopodobne, w przypadku gdy zmiany w toksyczności są nagłe i krótkotrwałe. W dużej mierze to właśnie czynniki środowiskowe mogą być przyczyną krótkoterminowych zmian w toksyczności sinic obserwowanych w warunkach naturalnych [15, 57].

Stosowany często w literaturze termin – toksyczność sinic nie zawsze obrazuje poziom produkowanych toksyn. Toksyczność sinic jest czę-

sto definiowana za pomocą współczynnika ( $LD_{50}$ ), określającego w jednostkach masy glonów na jednostkę masy ciała myszy, jaka dawka toksyn powoduje śmiertelność połowy badanej populacji zwierząt. Różny stopień toksyczności sinic wynika z faktu, że niektóre szczepy mogą produkować kilka typów toksyn o różnym stopniu toksyczności. W efekcie ich równoczesnego działania może wystąpić efekt sumowania się ich indywidualnej toksyczności (efekt synergistyczny). Z terminu toksyczność sinic, nie można więc wprost wnioskować o ilości produkowanych toksyn. Bardziej precyzyjne jest więc określanie stężenia produkowanych toksyn w odniesieniu do: jednostki masy glonu, objętości pożywki lub stężenia całkowitego białek komórkowych.

#### CZYNNIKI ZEWNĘTRZNE WPŁYWAJĄCE NA WZROST SINIC I SYNTEZĘ TOKSYN

Pojawianie się sinicowych zakwitów wody jest determinowane przez czynniki środowiskowe; zarówno biotyczne, jak i abiotyczne (fizyczne i chemiczne). Sinice wzrastają najlepiej i tworzą z reguły zakwity wiosną lub późnym latem, kiedy występują optymalne warunki do ich wzrostu: temperatura wody 15–30°C, pH 6–9, odpowiednie nasłonecznienie, pogoda prawie bezwietrzna [9]. Masowemu pojawianiu się sinic sprzyja także eutrofizacja wód, zarówno morskich jak i lądowych, która prowadzi do wzrostu stężenia związków węgla, fosforu i azotu. Istotne znaczenie ma także dostępność  $O_2$  i  $CO_2$  [13, 35, 41, 45, 51]. Sinice uzyskują przewagę nad innymi gatunkami fitoplanktonu dzięki zdolności do wykorzystywania szerokiego spektrum napromieniowania słonecznego, odporności na nieodpowiednie warunki tlenowe, stosunkowo dużym rozmiarom plechy, co utrudnia ich konsumpcję przez zooplankton, oraz dzięki możliwości egzystowania przy niskim stosunku azotu do fosforu w wodzie [23]. Niektóre gatunki (np. *Aphanizomenon sp.*, *Anabaena sp.*) mogą wiązać azot atmosferyczny w warunkach deficytu soli azotanowych i amonowych [42], a ponadto wykazują także zdolność akumulacji składników mineralnych.

Czynniki środowiskowe mają zatem ogromny wpływ na wzrost komórek oraz produkcję toksyn przez sinice. Prowadzone od wielu lat badania w różnych laboratoriach na świecie skupiają się na oddziaływaniu poszczególnych czynników zewnętrznych na wydajność produkcji związków toksycznych przez liczne gatunki sinic. Badania prowadzono głównie na komórkach sinic pochodzących z hodowli laboratoryjnej. Najczęściej badanymi parametrami są: wiek hodowli [27, 36, 57, 60], temperatura [27, 47, 48, 58, 59], światło [27, 48, 55, 62, 65], pH [57, 60], zasolenie wody [27, 29], makroelementy – głównie azot i fosfor [12, 28, 30, 37, 63], a także mikroelementy [32, 56] oraz obecność innych mikroorganizmów (najczęściej bakterii) [29, 48].

Ogólnie można stwierdzić, że toksyny syntetyzowane są w maksymalnej ilości, gdy istnieją korzystne warunki do rozwoju sinic. Hipotezę tę potwierdza wiele obserwacji prowadzonych w różnych jeziorach świata, z których wynika, że niska produkcja toksyn przez sinice występuje podczas zimy, a wysoka w okresie lata. Natomiast wyniki eksperymentów laboratoryjnych często znacznie odbiegają od siebie. Doświadczenia przeprowadzone przez Sivonen na *Oscillatoria agardhii* wykazały, że optymalne warunki dla syntezy toksyn pokrywają się z optymalnymi warunkami dla wzrostu sinic [48, 50]. Jednakże prace niektórych autorów wskazują na stymulującą rolę czynników stresowych w produkcji toksyn. W doświadczeniach van der Westhuizen i in. [57] wykazano, że komórki *Microcystis aeruginosa* były bardziej toksyczne dla myszy, kiedy wzrastały przy pH wyższym lub niższym od pH optymalnego dla wzrostu. Innym testowanym przez Lukac czynnikiem stresowym były jony żelaza [32]. W przypadku ich braku przy niskim ich stężeniu ( $\leq 2,5 \mu M$ ) komórki rosły bardzo wolno, ale syntetyzowały za to 20–40 razy więcej toksyn w porównaniu z kontrolą. Wyniki te wydają się potwierdzać hipotezę wysuniętą przez Carmichaela stwierdzającą, że produkcja toksyn jest odpowiedzią na warunki stresowe środowiska [6]. Pomimo pewnych wyjątków, na ogół przyjmuje się jednak, że sinice syntetyzują największe ilości toksyn w warunkach faworyzujących wzrost.

Tabela 1. Porównanie optymalnych temperatur dla wzrostu komórek i syntezy toksyn u różnych gatunków i szczepów sinic.  
Table 1. Comparison of the optimal temperature for growth of the cells and synthesis of toxins by different species and strains of cyanobacteria.

Gatunek <i>species</i>	Szczep <i>strain</i>	Temperatura optymalna (°C) <i>optimal temperature (°C)</i>		Autor <i>author</i>
		wzrost komórek <i>growth of cells</i>	synteza toksyn <i>synthesis of toxins</i>	
<i>Anabaena sp.</i>	90	20–25	25	[39]
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	TR183	16–22	–	[29]
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NRC-1	30–35	25	[58]
	UV-006	32	20–24	[58]
<i>Nodularia spumigena</i>	BY1	25–28	19	[29]
	BY1	20	20	[27]
	HEM	20	20	[27]
<i>Oscillatoria agardhi</i>	97	25	25	[48]
	CYA128	20–30	15–25	[48]

#### WIEK HODOWLI

Synteza toksyn i ich akumulacja wewnątrz komórek sinic zmienia się w poszczególnych fazach wzrostu. Ilość syntetyzowanych toksyn wykazuje pozytywną korelację wraz ze wzrostem liczebności osobników (często określaną w eksperymentach przez: wzrost biomasy, liczby komórek lub stężenia chlorofilu<sub>a</sub>) i szybko ulegała obniżaniu gdy wzrost ten ustawał [27, 36, 57]. Produkcja toksyn wzrasta stopniowo podczas fazy wzrostu logarytmicznego i osiąga maksimum przy końcu tej fazy (9–15 dnia w zależności od gatunku), a następnie na początku fazy stacjonarnej zaczyna gwałtownie spadać, co jest wynikiem narastającego w tej fazie procesu rozpadu komórek. Dochodzi wówczas do uwalniania toksyn z komórek sinic do wody lub pożywki i podniesienia poziomu tych związków w środowisku otaczającym komórki glonu. Wyraźny wzrost stężenia toksyn w pożywce, z jednoczesnym obniżeniem stężenia tych związków wewnątrz komórek *Nodularia spumigena*, obserwowano od około 10 dnia eksperymentu aż do jego zakończenia (50 dzień) [27]. W środowisku naturalnym toksyny sinicowe wydostają się do wody tylko w wyniku starzenia lub śmierci komórek, względnie mechanicznego uszkodzenia ich ściany komórkowej.

#### TEMPERATURA

Poszczególne gatunki i szczepy sinic różnią się optymalną temperaturą wzrostu kultury i natężeniem syntezy toksyn (Tabela 1). Synteza toksyn jest zwykle największa w zakresie temperatury 18–25°C, podczas gdy niska ( $\geq 10^\circ\text{C}$ ) lub wysoka ( $\leq 30^\circ\text{C}$ ) temperatura obniża natężenie tego procesu [27, 29, 48, 58]. Nieco odmiennie warunki temperatury mogą być preferowane przez różne szczepy nawet tego samego gatunku sinicy. Jak wykazała Sivonen [48], optimum temperatury dla syntezy toksyn przez zielony szczep *Oscillatoria agardhii* 97 wynosiło około 25°C, natomiast przez szczep czerwony CYA 128 obejmowało szeroki zakres od 15–25°C. Natomiast najniższy poziom syntezy toksyn wykazywały obydwie szczepy w temperaturze 30°C, co można tłumaczyć tym, że jest to temperatura nieosiągalna przez wody jezior Finlandii, z których one pochodziły i do której były adaptowane.

Doświadczenia przeprowadzone na szczepach *N. spumigena* [27] wskazywały zarówno na optymalny wzrost, jak i syntezę toksyn w temperaturze około 20°C, natomiast najniższy w temperaturze  $\geq 10^\circ\text{C}$ . Przy wysokiej temperaturze (powyżej 20°C) obserwowano nasilone uwalnianie toksyn do otaczającej wody na sku-

tek przyspieszonej degradacji komórek. Temperatura w zakresie 20–24°C jest także optymalna dla syntezy toksyn przez *Microcystis aeruginosa* UV-006 [58]. Wzrost w warunkach powyżej 28°C powodował wyraźny spadek stężenia toksyn w komórkach. Maksymalne ich stężenie w komórkach *M. aeruginosa* nie było jednak skorelowane z maksymalną szybkością przyrostu biomasy. Większe stężenie toksyn stwierdzono w komórkach z kultur wolno rosnących, o czasie podwajania 2,8 dnia, aniżeli w komórkach hodowanych w optymalnej temperaturze dla wzrostu (32°C), dla których czas podwajania wynosił 1,23 dnia. Okazało się więc, że ten szczep *Microcystis* syntetyzował najwięcej toksyn w pewnym stadium, niekoniecznie charakteryzującym się największą szybkością wzrostu komórek. Podobne rezultaty wykazali Watanabe i Oishi [62] dla innego szczepu *M. aeruginosa*. Szczep ten wzrastał najszybciej w temperaturze 32°C, zaś największą ilość toksyn produkował w przedziale temperatury 18–25°C (2-krotnie wyższą niż przy wzroście w temperaturze 32°C).

Interesujące było także wykazanie przez van der Westhuizen i in. [59] w badaniach na *M. aeruginosa* (UV-006) i Rapala i in. [39] w doświadczeniach na szczepach *Anabaena sp.*, że w różnych warunkach termicznych może przeważać synteza innego typu mikrocytyn. Jak sugerują van der Westhuizen i in. [59], wahania w produkcji toksyn przez *Microcystis* wynikające ze zmiany temperatury są konsekwencją ilościowych różnic w syntezie poszczególnych typów toksyn, a nie konsekwencją odmiennej struktury tych związków. Nie wykazano różnic w składzie aminokwasowym poszczególnych typów toksyn syntetyzowanych w odmiennych warunkach termicznych. Rapala i in. [39] badali wpływ temperatury na poziom syntezy dwóch głównych mikrocytyn, mianowicie MCYST-LR i MCYST-RR przez *Anabaena sp.* szczep 90. Stosując temperaturę niższą od optymalnej dla syntezy tych toksyn (czyli niższą od 25°C), zaobserwowano podwyższenie poziomu MCYST-LR, zaś wzrost komórek w temperaturze optymalnej i nieco wyższej stymulował syntezę MCYST-RR. Podwyższenie temperatury stymulowało także syntezę dimetylowanych

(przy trzecim aminokwasie) odpowiedników powyższych mikrocytyn [39]. Na różnorodność syntetyzowanych odmian hepatotoksyn, a w konsekwencji na zmianę toksyczności, wpływa oprócz temperatury szereg innych czynników, m.in.: warunki napromieniowania, poziom związków azotu i fosforu [39].

#### NAPROMIENIOWANIE FOTOSYNTETYCZNIE AKTYWNE

Różne gatunki sinic wykazują w naturze odmienne wymagania na napromieniowanie fotosyntetycznie aktywne (PAR): *Oscillatoria* preferuje niskie natężenia PAR, stąd często występuje na głębokości kilku metrów, *Anabaena* umiarkowane, natomiast *Microcystis* i *Nodularia* – wysokie jego natężenie [49]. Większość szczepów produkuje maksymalne ilości toksyn wzrastając w optymalnych warunkach PAR [27, 29, 48]. Wzrost szczepów *O. agardhii* wyrażony produkcją suchej masy był niemal niezmienny w szerokim zakresie natężeń PAR (12–95  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) testowanym przez Sivonen [48]. Natomiast poziom syntezy toksyn był wysoki przy niskim natężeniu napromieniowania (12–24  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), oraz stosunkowo słaby w warunkach silnego napromieniowania (50–95  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), które to warunki z kolei sprzyjały także uszkodzeniu komórek i uwalnianiu toksyn do środowiska. Nieco inaczej sytuacja przedstawiała się w przypadku *N. spumigena* [27], który to gatunek wymaga w naturalnych warunkach wysokich natężeń PAR. Zarówno wzrost komórek, jak i synteza toksyn przez szczep HEM były najlepsze przy najwyższym z testowanych natężeń PAR (80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Występujące różnice w ilości syntetyzowanych toksyn w różnych natężeniach PAR nie były w tym przypadku znaczące. Wyniki tych doświadczeń zdają się więc świadczyć o tym, że natężenie PAR nie ma znaczącego wpływu na syntezę toksyn przez sinice. Najbardziej odbiegające od siebie i kontrowersyjne rezultaty otrzymali badacze prowadzący doświadczenia na *M. aeruginosa*. Van der Westhuizen i Eloff [58] stwierdzili, że natężenie PAR w wyraźnym stopniu wpływało na szybkość wzrostu szczepu UV-006, lecz miało tylko nieznaczny wpływ na produkcję toksyn. Nie ob-

serwowano tak gwałtownych, jak w przypadku temperatury, zmian w produkcji toksyn wraz ze wzrostem natężenia PAR. Stosunkowo niski poziom produkcji toksyn wystąpił przy najniższym ( $21 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) i najwyższym ( $205 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) z testowanych natężeń. Słabe maksimum można było wyróżnić przy około  $145 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , jednakże było to maksimum jedynie dla syntezy toksyn, natomiast wzrost glonów pozostawał w tych warunkach na nieco niższym od optymalnego poziomie. Szybkość wzrostu kultur wyrażona czasem podwojenia liczby komórek była największa przy najsilniejszym napromieniowaniu ( $205 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Jak często było stwierdzane i w tym przypadku największa produkcja toksyn nie była skorelowana z największym wzrostem kultury. Z kolei Watanabe i Oishi [62] oraz Utikilen i Gjolme [55] zauważyli duże zmiany w produkcji toksyn przez szczepy *Microcystis*, w odpowiedzi na stymulację przez PAR. Doświadczenia Watanabe i Oishi [62] wykazały 4-krotny wzrost syntezy toksyn, gdy natężenie PAR zwiększano od  $7,5$  do  $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Podobnie w hodowli ciągłej *M. aeruginosa* CYA 228/1 [55] szybkość syntezy toksyn wzrastała wraz ze wzrostem natężenia PAR aż do wartości  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a następnie obniżała się przy wzroście jego natężenia (testowany zakres  $20$ – $75 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Spadek syntezy mikrocytyny (wyrażony w  $\mu\text{g}$  toksyny $\cdot\text{g}^{-1}$  suchej masy komórek) przy natężeniu PAR powyżej  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mógł być związany z zachodzącą w tych warunkach akumulacją polisacharydów, wpływającą na wzrost biomasy. Wynik ten nie świadczył natomiast o osłabieniu poziomu syntezy toksyn, gdyż stosunek stężenia toksyn do całkowitego stężenia białek komórkowych pozostawał w tych warunkach doświadczalnych na stałym poziomie. Oprócz wzrostu poziomu produkcji toksyn, w zakresie natężenia PAR  $20$ – $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , zaobserwowano także podwyższenie stosunku stężenia toksyn do stężenia białek, co wskazuje na szybszy wzrost syntezy toksyn w porównaniu z syntezą innych białek. Świadczyć to może o istnieniu odrębnych dróg biosyntezy dla peptydowych toksyn sinicowych i dla pozostałych białek komórkowych. W przeciwieństwie do tych obserwacji Codd i Poon [12] nie zaobser-

wowali istotnych różnic w ilości produkowanych toksyn na skutek zmian natężenia PAR w zakresie  $5$ – $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Sprzeczność rezultatów otrzymanych przez różnych badaczy może wynikać ze stosowania różnych: szczepów, źródeł napromieniowania, pożywek, warunków hodowli, sposobów odnoszenia stężenia toksyn. Różna wrażliwość poszczególnych gatunków sinic na napromieniowanie może być także uwarunkowana hepatotoksycznymi lub neurotoksycznymi właściwościami poszczególnych szczepów. Przy wysokim natężeniu PAR szczepy *Anabaena* wytwarzające hepatotoksyny wrażały lepiej, aniżeli te, które wytwarzały neurotoksyny, a poziom syntezy hepatotoksyn nie ulegał obniżeniu tak znacznie, jak neurotoksyn [39]. Utikilen i Gjolme [55] próbowali wykazać, czy następuje zależność syntezy toksyn od długości fali świetlnej. Wyniki doświadczenia wskazywały na tylko nieznaczne podwyższenie poziomu toksyn i ilościowego stosunku stężenia toksyn do stężenia innych białek komórkowych w przypadku zastosowania napromieniowania zakresem czerwonym lub zielonym, w porównaniu z wynikami uzyskanymi po napromieniowaniu całym zakresem PAR.

#### ODCZYN POŻYWKI

pH jest dotychczas jednym z najslabiej zbadanych czynników. Optymalne pH dla wzrostu większości gatunków sinic występuje w zakresie  $6$ – $9$  jednostek. Nie zawsze jednak pokrywało się ono z optimum dla syntezy toksyn. Wynik taki uzyskali van der Westhuizen i Eloff [57] dla *M. aeruginosa* UV-006. Największą szybkość wzrostu kultury (wyrażoną czasem podwojenia liczby komórek) zanotowano dla tego szczepu przy pH  $9$ , zaś najwyższą toksyczność przy pH poniżej i powyżej tej wartości (Ryc. 1). Maksymalny przyrost biomasy na jednostkę objętości pożywki nie był więc skorelowany z maksymalnym wzrostem toksyczności przeliczanym na jednostkę biomasy. Fakt, że komórki znajdujące się w fazach spowolnionego wzrostu syntetyzują największe ilości toksyn przyczynił się do wysunięcia przez Carmichaela [6] hipotezy zakładającej, że podwyższenie ich syntezy jest odpowiedzią na warunki stresowe środowiska.

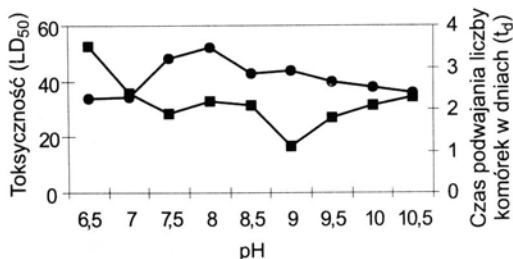


## STĘŻENIE ZWIĄZKÓW AZOTU

Wody ulegają często zanieczyszczeniu z otaczającego je łądu, np. ściekami z gospodarstw domowych i pól, odpadami z ferm (głównie nierogacizny i drobiu), detergentami, nawozami przemysłowymi i produktami odpadowymi [2, 14]. Zanieczyszczenia te wzbogacają środowisko wodne w składniki odżywcze (głównie związki azotu i fosforu), które sprzyjają szybkiemu rozmnażaniu się sinic, doprowadzając do rozwoju zakwitów.

Oddziaływanie składników mineralnych na proces syntezy toksyn wydaje się być o wiele bardziej złożony, niż oddziaływanie PAR czy temperatury. Wpływ obecności i stężenia związków azotu w pożywce na wzrost komórek i produkcję toksyn przez sinice zależy od zdolności gatunku do wiązania azotu cząsteczkowego. Gatunki takie jak: *Microcystis aeruginosa* czy *Oscillatoria agardhii*, które nie wytwarzają heterocyst i nie posiadają kompleksu enzymów umożliwiającego wiązanie azotu atmosferycznego, wykazują ścisłą zależność poziomu syntezy toksyn od stężenia związków azotu w pożywce. Sinice rosną najlepiej i produkują największe ilości toksyn przy wysokim stężeniu azotu (ok. 20–80 mgNdm<sup>-3</sup>) [48,49]. Hodowla sinic w pożywkach pozbawionych źródła azotu może powodować, jak wykazali to Codd i Poon [12] dla *M. aeruginosa*, nawet 10-krotne obniżenie ilości syntetyzowanych toksyn w porównaniu z kontrolą. Chociaż wyniki takie wydają się być logiczne ze względu na peptydową naturę hepatotoksyn, to jednak Watanabe i Oishi [62] nie wykazali w swych badaniach zbyt silnej korelacji pomiędzy ilością azotu w pożywce a poziomem syntezy toksyn. Z ich badań wynika, że stężenie azotu, które w doniosły sposób redukuje szybkość wzrostu kultur, miało jednak relatywnie mały wpływ na poziom syntezy toksyn przez *M. aeruginosa*. Ta różnica w wynikach może być konsekwencją stosowania różnych szczepów i odmiennych warunków hodowli [32].

Z drugiej jednak strony uważa się, że gatunki zdolne do wiązania azotu cząsteczkowego, jak np: *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena sp.* nie wymagają dostarczania



Ryc. 1. Wpływ pH na toksyczność (LD<sub>50</sub>, ●) i kinetykę wzrostu (t<sub>d</sub>, ■) *M. aeruginosa* UV-006 (wg [57], zmodyfikowane). LD<sub>50</sub> wyrażono w mg suchej masy glonu kg<sup>-1</sup> wagi ciała myszy.

Fig. 1. Effect of pH on toxicity (LD<sub>50</sub>, ●) and kinetic of growth (t<sub>d</sub>, ■) of *M. aeruginosa* UV-006 (after [57], modified). LD<sub>50</sub> expressed in mg dry matter of algae kg<sup>-1</sup> weight of mouse.

związków azotu wraz z pożywką. Ponadto zaobserwowano, że w warunkach nienaturalnie wysokiego stężenia azotu w pożywce (42 mgdm<sup>-3</sup>) występowało: zmniejszenie ilości formowanych heterocyst, obniżenie natężenia procesu wiązania azotu cząsteczkowego, spadek szybkości wzrostu kultury i syntezy toksyn [28, 29, 37, 39]. Najbardziej korzystna dla syntezy mikrocytyn przez *Anabaena sp.* dla szczepów 90 i 202A1 okazała się pożywka zupełnie pozbawiona związków azotu [39]. Dodatek tego pierwiastka przyczyniał się do obniżenia ogólnej puli wytwarzanych toksyn, przy czym obserwowano przewagę dimetylowanych form (przy trzecim aminokwasie) MCYST-LR i MCYST-RR kosztem ich metylowanych odmian. Szybkość wzrostu komórek *Anabaena* właściwie nie zależała od stężenia azotu w pożywce. Ważne jest nie tylko stężenie związków azotu, ale także forma w jakiej są podawane (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mocznik). Teoretycznie najłatwiej przyswajalną formą azotu są jony NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Jeśli ich stężenie nie jest adekwatne do zapotrzebowania, w dalszej kolejności wykorzystywany jest mocznik, a następnie jony NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [19]. Wysoki poziom związków azotu, w połączeniu z silnym natężeniem PAR, wywierał efekt destruktywny i przyspieszał uwalnianie toksyn z komórek do środowiska [39].

Ponieważ większość dotychczasowych badań nad wpływem składników pokarmowych na

poziom syntezy toksyn sinicowych prowadzono na hodowlach zawieszinowych (ang. batch cultures), gdzie pierwotne warunki wzrostu zmieniają się wraz z rozwojem hodowli, Utkilen i Gjølme [56] przeprowadzili podobne doświadczenia stosując hodowle ciągłe (ang. continuous cultures). W przypadku gdy stężenie toksyn w komórkach *M. aeruginosa* wyrażano w ng toksyn  $\mu\text{g}^{-1}$  suchej masy, otrzymywano wyniki podobne do tych, jakie uzyskali Codd i Poon [12] oraz Sivonen [48], a więc obniżenie ilości toksyn na skutek spadku dostępności związków azotu. Chociaż mogłoby się tak pozornie wydawać, nie świadczyło to jednak o zmniejszeniu poziomu syntezy toksyn, gdyż ilość mikrocystyn (które są małymi niskocząsteczkowymi peptydami) w stosunku do całkowitego stężenia białek w komórce pozostawała niemal stała. Pozorny spadek stężenia związków toksycznych wynikał ze wzrostu biomasy glonów na skutek akumulacji węglowodanów w komórkach (podobny efekt otrzymano, gdy badanym czynnikiem były zmiany natężenia PAR) [55]. Można więc stwierdzić, że stężenie związków azotu nie wpływa w istotny sposób na syntezę toksyn przez *M. aeruginosa*. Doświadczenia te doskonale wykazują jak ważny jest sposób odniesienia stężenia toksyn. Okazało się, że o wiele lepszym sposobem przedstawiania zachodzących zmian w produkcji toksyn jest określanie stosunku stężenia tych związków do stężenia pozostałych białek komórkowych, a nie określanie  $\text{LD}_{50}$ , czy też stężenia toksyn w stosunku do suchej masy kultury glonów.

#### STĘŻENIE ZWIĄZKÓW FOSFORU

Niedobór fosforu jest czynnikiem ograniczającym wzrost sinic i syntezę toksyn, zatem małe zmiany w dostępności tego pierwiastka mogą wywierać istotny wpływ na rozwój sinic [48]. Wzrost kultur sinic, jak i synteza toksyn jest na ogół stymulowana przez wysokie stężenie jonów ortofosforanowych, jednak przez stężenie wielokrotnie niższe niż stężenie związków będących źródłem azotu. Sinice posiadają komórkowy magazyn fosforu, z którego mogą korzystać przy niedoborach tego pierwiastka w pożywce [27]. Dlatego też doświadczenia testujące

wpływ jonów fosforanowych na wzrost liczby komórek i poziom syntezy toksyn powinny być poprzedzone hodowlą *inoculum* w pożywce pozbawionej związków fosforu. Gdy do badań stosowano *Anabaena sp.* (szczepy: 90 i 202A1) bez wcześniejszego odpowiedniego przygotowania *inoculum*, zauważono, że przy bardzo niskim stężeniu fosforu (0,05 i 0,1  $\text{mgdm}^{-3}$ ) początkowo wysoki stosunkowo poziom syntezy hepatotoksyn ulegał obniżaniu wraz z upływem czasu, prawdopodobnie na skutek wyczerpywania się wewnątrzkomórkowych zapasów tego pierwiastka. Przy wysokim stężeniu fosforu (0,5 i 5,5  $\text{mgdm}^{-3}$ ) obserwowano natomiast przyspieszenie zarówno syntezy toksyn, jak i wzrostu komórek [39]. Jony ortofosforanowe o stężeniu 0,2–5,5  $\text{mgdm}^{-3}$  stymulowały wzrost nietoksycznego szczepu *A. flos-aquae* [29], zaś stężenie 1,7–5,5  $\text{mgdm}^{-3}$  silniej zwiększało częstotliwość formowania heterocyst. Wzrost *N. spumigena* także był najlepszy w podobnych warunkach, jednak przez okres pierwszych 21 dni hodowli był bardzo słaby. Powodem tej sytuacji może być mniejszy wewnątrzkomórkowy rezerwar fosforu w porównaniu z *A. flos-aquae* lub też może to wynikać z wyższego zapotrzebowania na ten pierwiastek [29] (przed właściwym doświadczeniem prowadzono hodowlę *inoculum* obu szczepów w pożywce pozbawionej fosforu).

Sinice zdolne są do wzrostu i syntezy toksyn nawet w warunkach nienaturalnie wysokiego stężenia fosforu, jednakże zwiększanie stężenia tego pierwiastka powyżej pewnego poziomu nie wpływało już stymulująco na dalszą produkcję toksyn. Stężenie poniżej 0,1  $\text{mgPdm}^{-3}$  niemal zupełnie uniemożliwiało wzrost *O. agardhii*, a w mniejszym stopniu natomiast dotykało obniżenia syntezy toksyn [48]. W zakresie stężeń 0,1–0,4  $\text{mgPdm}^{-3}$  obserwowano bardzo słaby wzrost kultury, zaś powyżej tej wartości (0,4–5,5  $\text{mgPdm}^{-3}$ ) wzrost komórek i poziom syntezy toksyn utrzymywał się na wysokim, ale podobnym poziomie, niezależnie już od stężenia fosforu. Tak więc wpływ tego pierwiastka na natężenie syntezy toksyn występuje jedynie w pewnym przedziale stężenia  $\text{PO}_4^{3-}$  (0,1–0,4  $\text{mgPdm}^{-3}$ ).



Wzrost kultur i synteza toksyn przez toksyczne szczepy *N. spumigena* (szczepy: BY1 i HEM) była najniższa przy stężeniu jonów ortofosforanowych równym  $0,3 \text{ mgdm}^{-3}$ , zaś najniższa przy stężeniu  $0,6 \text{ mgdm}^{-3}$  [27]. Dalszy wzrost stężenia fosforu nie miał już istotnego znaczenia dla rozwoju sinic (testowany zakres:  $0,3\text{--}1,0 \text{ mgPdm}^{-3}$ ). Najniższa testowana zawartość jonów  $\text{PO}_4^{3-}$  wzmagala ponadto obumieranie komórek i uwalnianie toksyn do pożywki [27]. Gdy szybkość wzrostu szczepu nietoksycznego (HKVV) wyrażano w przeliczeniu na ilość chlorofilu<sub>a</sub>, to najbardziej optymalna okazała się pożywka z najniższym testowanym stężeniem fosforu. Kiedy zaś szybkość wzrostu kultury glonu opisywano w odniesieniu do przyrostu suchej masy, nie zauważono wyraźnych różnic wynikających ze zmieniającego się stężenia jonów ortofosforanowych.

W przypadku *M. aeruginosa* otrzymano różniące się nieco wyniki. Codd i Poon [12] zaobserwowali, że usunięcie fosforu z hodowli nie wpływało istotnie na poziom syntezy toksyn przez ten gatunek. Natomiast Watanabe i Oishi [62] stwierdzili słabe obniżenie produkcji toksyn przez *Microcystis* w przypadku niskiego stężenia jonów fosforanowych, za to silną redukcję szybkości wzrostu kultury glonów. Wicks i Thiel [65] w badaniach nad zakwitami *Microcystis* oraz Utkilen i Gjolme [56] w badaniach laboratoryjnych (hodowla ciągła) nie stwierdzili natomiast ścisłej zależności pomiędzy stężeniem składników mineralnych a poziomem syntezy toksyn przez testowane szczepy.

Oprócz stężenia poszczególnych pierwiastków ważny dla wzrostu wielu sinic wydaje się być także stosunek N/P w pożywce. Niska wartość tego współczynnika stymuluje w warunkach laboratoryjnych wzrost, w naturze zaś – rozwój zakwitów wielu gatunków zdolnych do wiązania azotu cząsteczkowego, np. *A. flos-aquae* [24, 29], *N. spumigena* [22, 29].

Zależność poziomu syntezy toksyn od stężenia (przynajmniej w pewnym zakresie) jonów fosforanowych dotyczy głównie hepatotoksyn. Nie stwierdzono natomiast wpływu stężenia fosforu na poziom syntetyzowanej przez *Anabaena* czy *Aphanizomenon* neurotoksyny (anato-

ksyny-a) [29, 37], chociaż zupełny brak fosforu ograniczał wzrost wyżej wymienionych gatunków sinic. Ponieważ w większości przypadków wysokie stężenie fosforu stymuluje wzrost i syntezę hepatotoksyn przez sinice, najprostszą metodą zapobiegania zakwitom sinicowym byłoby ograniczenie wzbogacenia związkami fosforu zbiorników wodnych.

#### PIERWIASTKI ŚLADOWE

W literaturze naukowej znajduje się niewiele informacji dotyczących efektów wywoływanych przez zanieczyszczenia antropogeniczne, chociaż obserwuje się wzmożony rozwój toksycznych zakwitów sinicowych w wodach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Jak wykazali Vining i Wright [61], synteza wielu cyklicznych peptydowych antybiotyków (np. gramicydyny S) jest regulowana przez poziom metali ciężkich, podobnie Lukac i Aegerter [32] wykazały, że pierwiastki te wywierają także wpływ na produkcję mikrocytyny. W badaniach przeprowadzonych na hodowlach zawieszinowych *M. aeruginosa* PCC 7806 stwierdzono, że niezbędnym dla optymalnego wzrostu kultury i syntezy toksyn okazał się cynk. Natomiast inne jony metali ciężkich takich jak: glinu, kadmu, chromu, miedzi, manganu, niklu i cyny w stężeniach nietoksycznych, nie wpływały znacząco na poziom syntezy toksyn. Jony żelaza miały natomiast zdecydowanie promujący wpływ zarówno na szybkość wzrostu kultury, jak i syntezę mikrocytyny. W nieobecności lub przy niskim stężeniu związków żelaza ( $\geq 2,5 \mu\text{M}$ ) komórki wrażliwe bardzo wolno, ale syntetyzowały 20–40% więcej toksyn w porównaniu z kontrolą. Opierając się na tych wynikach można sądzić, że synteza toksyn jest odpowiedzią na warunki stresowe środowiska. Zupełnie przeciwne wyniki, dotyczące roli żelaza, otrzymali Utkilen i Gjolme [56] w hodowlach ciągłych *M. aeruginosa* CYA 228/1. W ich doświadczeniach hodowla sinic w warunkach ograniczających dostępność żelaza, podawanego w formie  $\text{FeCl}_3$ , powodowała obniżenie ilości syntetyzowanych toksyn (stosunek stężenia mikrocytyn na jednostkę suchej masy oraz stężenie mikrocytyn do stężenia całkowitego białek komórkowych ulegał gwałtown-

nemu obniżeniu). Uzyskanie tak zasadniczo odmiennych wyników przez dwie grupy badaczy może być skutkiem zastosowania dwóch różnych szczepów *Microcystis* [56].

Utkilen i Gjolme [56] wykazali także, że zdolne do syntezy toksyn szczepy *M. aeruginosa* posiadają skuteczniejszy system przyswajania żelaza aniżeli szczepy nietoksyczne. Mikrocystryny mogą pełnić funkcję wewnątrzkomórkowych chelatorów, utrzymujących niski poziom wolnych jonów  $Fe^{2+}$  w komórkach. Szczepy niezdolne do syntezy toksyn nie zawierają tego typu chelatorów, a poprzez mniej wydajny system przyswajania żelaza utrzymują ilość wolnych jonów  $Fe^{2+}$  na odpowiednio niskim poziomie. Badacze ci wysunęli roboczą hipotezę tłumaczącą syntezę toksyn przez *M. aeruginosa*. Sugerują oni, że toksyny peptydowe są wewnątrzkomórkowymi chelatorami wiążącymi zlokalizowane w komórkach wolne jony  $Fe^{2+}$ , których poziom reguluje z kolei aktywność enzymu (syntetazy) uczestniczącego w syntezie mikrocystryny. Wiązanie żelaza przez mikrocystryny udowodniono także w doświadczeniu, w którym obecność tych toksyn osłabiała pobieranie  $Fe^{2+}$  przez retikulocyty królika [46]. Wykazano ponadto skuteczniejsze przyswajanie żelaza w warunkach wysokiego natężenia PAR [56]. PAR wpływało stymulująco na redukcję znajdujących się w pożywce jonów  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , które następnie zostają transportowane do komórek. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że wpływ natężenia PAR na toksyczność *M. aeruginosa* może być pośrednio wynikiem oddziaływania napromieniowania na proces pobierania jonów żelaza przez komórki sinic.

#### POZIOM ZASOLENIA WÓD MORSKICH

Efekty wywierane przez stężenie NaCl w dużej mierze zależą od naturalnego zasolenia środowiska życia poszczególnych gatunków sinic. Tak np. dla *A. flos-aquae* TR183, nietoksycznego szczepu, występującego zarówno w wodach słodkich, jak i w wodach Morza Bałtyckiego, optymalne stężenie NaCl dla wzrostu występowało w granicach 0–5‰. Wyższe zasolenie powodowało spadek poziomu syntezy biomasy [29]. Podobna zależność cechuje *N. spumigena*,

gatunek preferujący stosunkowo wysokie zasolenie w środowisku. Również w warunkach laboratoryjnych obserwowano najbardziej wydajny wzrost kultury oraz podwyższony poziom syntezy toksyn przy raczej wyższym zasoleniu (5–20‰) [29]. Zależność syntezy toksyn od stopnia zasolenia wody może (tak jak często w przypadku innych czynników) drastycznie różnić się nawet w obrębie tego samego gatunku. Eksperymenty przeprowadzone przez Lehtimäki i in. [27] na dwóch toksycznych szczepach *N. spumigena* wykazały ścisłą korelację szybkości wzrostu kultury i syntezy toksyn wraz ze zmianą zasolenia pożywki w przypadku szczepu BY1 (optymalne stężenie soli wynosiło 5‰). Tymczasem szczep HEM nie objawiał takiej zależności w całym testowanym zakresie stężeń NaCl (5–11‰). Stopień zasolenia wody jest także ważnym czynnikiem wyznaczającym w naturalnych warunkach zasięgi występowania różnych gatunków sinic [27, 29]. Tak np. w Morzu Bałtyckim *N. spumigena* jest bardzo rozpowszechnionym gatunkiem w Zatoce Fińskiej, gdzie zasolenie waha się od 5 do 11‰. Natomiast rzadko egzystuje on na południowych obszarach Bałtyku, gdzie stężenie soli wynosi od 13–17‰ lub w północnej jego części – Zatoce Botnickiej, gdzie zasolenie wody jest bardzo niskie ( $\leq 4‰$ ) [27].

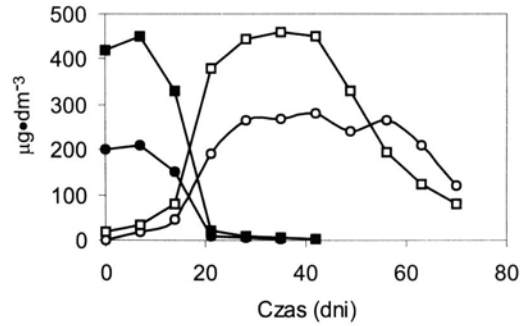
#### OBECNOŚĆ BAKTERII

W przypadku niemal wszystkich testowanych szczepów obecność bakterii nie stymulowała syntezy toksyn. Dwa z trzech badanych przez Sivonen [48] szczepów *O. agardhii* (szczep 97 i CYA 128) syntetyzowały nawet nieco więcej toksyn rosnąc w warunkach pozbawionych bakterii. Nie obserwowano także wyraźnych różnic w wewnątrz – i w zewnątrzkomórkowym stężeniu toksyn, w sterylnych oraz bogatych w bakterie kulturach *N. spumigena* [29]. Zauważono natomiast: lepszy wzrost komórek, formowanie dłuższych i większych filamentów, większą ilość heterocyst w hodowlach *N. spumigena* i *A. flos-aquae*, którym towarzyszyły bakterie, w porównaniu z hodowlami sterylnymi [29]. Obecność bakterii w kulturach *Aphanizomenon cylindrica*, oprócz pozytywnego wpływu na

wzrost, podnosiła także efektywność wiązania azotu cząsteczkowego [31]. Uważa się, że dodatnia rola bakterii polegałaby na regulacji stężenia  $O_2$  i  $CO_2$ , których poziom decyduje o prawidłowym i wydajnym przebiegu procesów wiązania azotu cząsteczkowego oraz fotosyntezy [29].

#### UWALNIANIE TOKSYN I ICH DEGRADACJA

Liczne czynniki zewnętrzne modyfikują nie tylko wzrost sinic i syntezę przez nie toksyn, ale wpływają także na żywotność komórek, a przez to na uwalnianie toksyn do środowiska. W naturalnych warunkach uwalnianie toksyn zachodzi na skutek uszkodzenia, a także śmierci i rozpadu komórek w procesie starzenia się. Pewne czynniki środowiskowe np. wysoka temperatura, wysokie zasolenie, silne natężenie PAR, niskie stężenie fosforu, mogą wywierać destruktywny wpływ na komórki, a przez to zwiększać ilość uwalnianych toksyn do środowiska [48]. Poszczególne gatunki różnią się odpornością na działanie tych czynników, co skutkuje ilością uwalnianych toksyn, np. *N. spumigena* uwalnia większe ilości tych substancji niż komórki *O. agardhii* [27]. Tak więc pobudzanie przez czynniki środowiskowe uwalniania toksyn z komórek jest cechą gatunkowo, a nawet szczepowo specyficzną. Czynnikiem odgrywającym największą rolę w podwyższaniu zewnątrzkomórkowego stężenia toksyn jest wiek prowadzonych hodowli [39]. Na początku rozpoczęcia hodowli zauważa się o wiele niższy poziom toksyn w pożywce w porównaniu z ich stężeniem wewnątrz komórek [27, 39, 64]. W miarę upływu czasu zachodzą zmiany w tej proporcji (Ryc. 2.). Watanabe i in. [64] stwierdzili gwałtowny spadek wewnątrzkomórkowej ilości mikrocytyny YR i LR w okresie od 14 do 21 dnia hodowli. W tym samym czasie zaznaczył się szybki przyrost stężenia toksyn na zewnątrz komórek. Wysokie stężenie mikrocytyny YR i LR w pożywce utrzymywało się do około 42 dnia hodowli, po czym zaczynało gwałtownie obniżać się na skutek nasilonej ich degradacji. Proces dekompozycji toksyn w warunkach natural-



Ryc. 2. Zmiany stężenia mikrocytyn LR (○, ●) i YR (□, ■) w komórkach (symbole wypełnione) i w pożywce (symbole otwarte) w czasie rozpadu komórek *Microcystis* (wg [64], zmodyfikowane).

Fig. 2. Changes in the concentration of microcystins LR (○, ●) and YR (□, ■) in cells (close symbols) and in the medium (open symbols) during the cells degradation of *Microcystis* (after [64], modified).

nych jest o wiele bardziej złożony, a więc czas ich rozkładu może być inny.

Największy udział w naturalnym rozkładzie komórek sinic i ich toksyn ma biodegradacja. W ciemności, w warunkach aerobowych i w obecności bakterii heterotroficznych, zauważono gwałtowny spadek liczby komórek *M. aeruginosa* w okresie od 14 do 42 dnia po przeniesieniu do ciemności. Po okresie 42 dni hodowli niemal wszystkie komórki sinic ulegały rozłożeniu przez bakterie [64]. Wśród bakterii tylko pewne gatunki mają zdolność degradacji toksyn, tak np. mikrocytyna LR jest rozkładana do produktów nietoksycznych przez *Pseudomonas aeruginosa* [53] oraz przez *Sphingomonas sp.* [4]. Nie rozkładają jej natomiast gatunki z rodzajów: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*. Rozpad hepatotoksyn i neurotoksyn, otrzymanych z lizy laboratoryjnych hodowli sinic, obserwowano także w wyniku działania pochodzącej z jeziora naturalnej populacji mikroorganizmów [38]. W naturalnych zbiornikach wodnych udział w biodegradacji komórek sinicowych, mają oprócz bakterii, również zwierzęce cyjanofagi oraz pierwotniaki i grzyby [53].

Naturalny, choć wolniejszy rozkład mikrocytyn zachodzi także przy odpowiedniej wartości temperatury i pH. Temperatura wody w ja-

pońskich jeziorach w okresie lata wynosi zwykle 25–30°C, zaś pH 9–10. W podobnych warunkach laboratoryjnych (pH 9, 21–30°C, ciemność, warunki sterylne) 50% mikrocytyny LR zostało rozłożone po 84 dniach. Czas połowicznego rozkładu toksyn jest różny przy różnych wartościach pH i temperatury [20].

Raz rozprzestrzeniona populacja sinic w jeziorze lub zbiorniku zaporowym jest trudna do zlikwidowania. Komórki przetrwalnikowe, a nawet komórki wegetatywne, mogą przeżywać w osadzie dennym wiele miesięcy, a nawet lat [23]. Jedną z możliwości ograniczania zakwitów jest biomanipulacja, czyli metoda polegająca na wprowadzaniu do środowiska życia sinic innych organizmów będących ich konkurentami (np. gatunki zielenic o nitkowatej pleśze) lub konsumentami (ryby, zooplankton) [5, 45]. Tego typu doświadczenia wprawdzie obniżały ilość komórek sinic w populacji, jednak poziom toksyn nie ulegał istotnym zmianom. Innym sposobem ograniczania zakwitów jest dodawanie do wody siarczanu miedzi – algicydu, powodującego lizę komórek. Metoda ta jednak pociąga za sobą gwałtowne uwalnianie toksyn do wody, a przez to jej nieprzydatność do konsumpcji przez kilka tygodni [54].

Na skutek obecności grup polarnych w cząsteczce mikrocytyny, pozostaje ona głównie w fazie wodnej i tylko w kilku procentach jest adsorbowana przez osady denne i zawieszona w wodzie cząstki stałe [44]. Toksyny syntetyzowane przez sinice są bardzo trwale chemicznie, praktycznie nie reagują z kwasami, zasadami, ani nie można ich rozłożyć przez zagotowanie zawierającej je wody [16]. W krajach rozwiniętych ryzyko zatrucia toksynami sinicowymi zawartymi w wodzie pitnej zależy przede wszystkim od jakości i efektywności stosowanych metod jej uzdatniania. Konwencjonalne metody uzdatniania wody, obejmujące takie procesy jak flokulacja, koagulacja i filtracja piaskowa okazują się niewystarczające do całkowitego usunięcia mikrocytyn. Bardziej efektywna wydaje się adsorpcja na węglu aktywnym, zarówno granulowanym (GAC), jak i proszkowanym (PAC), ale i ta metoda nie prowadzi do całkowitego ich usunięcia [16]. Najlepszym sposobem degrada-

cji toksyn (głównie mikrocytyn) i obniżania ich toksycznych właściwości są metody takie jak: ozonoliza, chlorowanie, napromieniowanie UV, metoda fotokatalityczna, reakcja z  $\text{FeCl}_3$ . Oprócz degradacji można prowadzić także chemiczną modyfikację toksyn w reakcjach estryfikacji, utleniania metodą Lemieux, hydrogenacji katalitycznej i reakcji z borowodorkiem sodu [16]. Pomimo odkrycia wielu metod degradacji i chemicznej modyfikacji budowy cząsteczek toksyn sinicowych, brak do tej pory metody, która pozwalałaby na usunięcie śladowych lub nawet niewielkich ilości tych związków z wody.

### WNIOSKI KOŃCOWE

Sinicowe zakwity wody są częstym i powszechnym zjawiskiem, szczególnie w eutroficznym zbiornikach wodnych. Znajomość odpowiedzi różnych gatunków sinic na czynniki środowiskowe może przyczynić się do ograniczenia dynamicznie rozwijających się i niebezpiecznych dla żywych organizmów zakwitów wody. Jest to tym ważniejsze, że mikrocytyny mogą być obecne w wodzie w niskim stężeniu jeszcze kilka tygodni po zaniku zakwitów [26]. Różne szczepy nawet tych samych gatunków sinic często odmiennie reagują na działanie tych samych czynników zewnętrznych, rosnąc w podobnych warunkach, produkując inne ilości tych samych typów toksyn [27, 48, 62]. Te same szczepy sinic mogą produkować różne typy toksyn w przypadku różnych wartości dozowanego czynnika (np. temperatury, PAR) [59]. Warunki optymalne dla wzrostu sinic nie zawsze są optymalnymi dla syntezy toksyn [57, 58]. Wyniki eksperymentów laboratoryjnych uzyskane przez różnych autorów, a dotyczące tych samych szczepów często odbiegają znacznie od siebie, co może wynikać z różnic metodycznych np. stosowania różnych pożywek [36], źródeł napromieniowania, metod detekcji stężenia toksyn, jednostek wyrażania biomasy i sposobu odnoszenia stężenia toksyn. Wyniki badań laboratoryjnych, skupiające się na oddziaływaniu pojedynczego czynnika na syntezę toksyn, nie zawsze można bezpośrednio odnosić do warunków naturalnych, gdzie zachodzą wzajemne za-

leżności pomiędzy całym kompleksem czynników zewnętrznych. Pomimo wielu niewiadomych jedno nie ulega wątpliwości, że zmiany w warunkach wzrostu nie prowadzą do syntezy toksyn przez szczepy nietoksyczne, podobnie jak nie pozbawiają tej cechy szczepy potencjalnie zdolne do ich syntezy [27, 48].

Pojawiają się pytania o przyczynę i mechanizm molekularny, prowadzący do tak szerokiej różnorodności i wahań w ilości syntetyzowanych toksyn przez sinice. Wiele laboratoriów podejmuje wysiłek zidentyfikowania genów i enzymów regulujących biosyntezę toksyn. Zidentyfikowanie tych genów przybliży molekularną drogę regulacji syntezy toksyn przez czynniki środowiskowe. Pozwoli również zrozumieć znaczenie tych związków dla samych sinic oraz niezdolność pewnych gatunków do ich syntezy.

#### LITERATURA

- [1] BAKER P. D., HUMPAGE A. R. 1994. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray – Darling basin Australia. *Austral. J. Mar. Freshwater Res.* **45**: 773–786.
- [2] BELL S. G., CODD G. A. 1994. Cyanobacterial toxins and human health. *Rev. Med. Microbiol.* **5**: 256–264.
- [3] BENNDORF J., HENNING M. 1989. *Daphnia* and toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in Bautzen Reservoir (GDR). *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* **74**: 233–248.
- [4] BOURNE D. G., JONES G. J., BLAKELEY R. L., JONES A., NEGRI A. P., RIDDLES P. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4086–4094.
- [5] BOWKER W. W. 1990. Degradation of Blue Green Alga *Microcystis aeruginosa* by Flagellata, *Mouas guttula*. *Environ. Tech.* **11**: 739–749.
- [6] CARMICHAEL W. W. 1986. Algal toxins. W: J. A. CALLOW (red.), *Advances in Botanical Research*. Academic Press, London, s. 47–101.
- [7] CARMICHAEL W. W. 1988. Toxins in freshwater algae. W: A. T. TU (red.), *Handbook of natural toxins*. Vol. 3. Marcel Dekker, New York, s. 121–147.
- [8] CARMICHAEL W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 445–459.
- [9] CARMICHAEL W. W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sc. Am.* **270**: 78–86.
- [10] CARMICHAEL W. W. 1997. The cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.* **27**: 211–256.
- [11] CARMICHAEL W. W., GORHAM P. R. 1981. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. W: W. W. CARMICHAEL (red.), *The water environment – algal toxins and health*. Plenum Press, New York, s. 161–172.
- [12] CODD G. A., POON G. K. 1988. Cyanobacterial toxins. W: L. J. ROGERS, J. R. GALLON (red.), *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. Oxford Univ. Press, Oxford, s. 283–296.
- [13] CODD G. A., BELL S. G., BROOKS W. P. 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol.* **21**: 1–13.
- [14] DAWSON R. M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxic.* **36**: 953–962.
- [15] ELOFF J. N., van der WESTHUIZEN A. J. 1981. Toxicological studies on *Microcystis*. W: W. W. CARMICHAEL (red.), *The water environment – algal toxins and health*. Plenum Press, New York, s. 343–364.
- [16] GAJDEK P. 1999. Budowa i właściwości mikrocytyn produkowanych przez sinice, metody ich degradacji i chemicznej modyfikacji. *Post. Biol. Kom.* **26**: 743–753.
- [17] GORHAM P. 1964. Toxic algae. W: D. F. JACKSON (red.), *Algae and man*. Plenum Publishing Corp., New York, s. 307–336.
- [18] GÓRSKI F. 1960. Zakwity glonów trujące dla zwierząt. *Wszelchświat* **8**: 213–216.
- [19] GU B., ALEXANDER V. 1993. Dissolved nitrogen uptake by a cyanobacterial bloom (*Anabaena flos-aquae*) in a subarctic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 422–430.
- [20] HARADA K. I., TSUIJI K., WATANABE M. F., KONDO F. 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria – III. Effect of pH and temperature. *Phycol.* **35** suppl.: 83–88.
- [21] HUNTER P. R., ROBERTS C. 1991. Introduction. W: G. A. CODD, C. ROBERTS (red.), *Public Health Aspects of cyanobacteria (blue-green algae)*. Proceedings of a seminar in London. *Phls. Microbiol. Digest.* **8**: 80–81.
- [22] HÜBEL H., HÜBEL M. 1980. Nitrogen fixation during blooms of *Nodularia* in coastal waters and backwaters of the Arkona Sea (Baltic Sea) in 1974. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* **65**: 793–808.
- [23] KAJAK Z. 1989. Eutrofizacja jezior. Warszawa. PWN.
- [24] KONONEN K., KUPARINEN J., MÄKELÄ K., LAANEMETS J., PAVELSON J., NÖMMANN S. 1996. Initiation of cyanobacterial blooms in a frontal region at the entrance to the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 98–112.
- [25] KOTAK G. B., KENEFICK S. L., FRITZ D. L., ROUSSEAU C. G., PREPAS E. E., HRUDEY S. E. 1993. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta Lakes and farm dugouts. *Wat. Res.* **27**: 495–506.
- [26] LAHTI K., RAPALA J., FÄRDIG M., NIEMELÄ M., SIVONEN K. 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Wat. Res.* **31**: 1005–1012.
- [27] LEHTIMÄKI J., SIVONEN K., LUUKKAINEN R., NIEMELÄ S. I. 1994. The effects of incubation time, temperature, light, salinity and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. *Archiv Hydrobiol.* **130**: 269–282.
- [28] LEHTIMÄKI J., MOISANDER P., SIVONEN K., KONONEN K. 1995. Comparison of growth, toxin production and nitrogen fixation of cyanobacteria from the Baltic Sea. *J*

- st. *International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae)*. 20–24 August 1995, Ronne, Denmark, s. 59.
- [29] LEHTIMÄKI J., MOISANDER P., SIVONEN K., KONONEN K. 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1657–1666.
- [30] LINDHOLM T., ERIKSON J. E., MERILUOTO J. A.O. 1989. Toxic cyanobacteria and water quality problems – examples from a eutrophic lake on Åland, south west Finland. *Water Res.* **23**: 481–486.
- [31] LOVE A. J.W., RAWSON D. M. 1986. A note on the effects of associated micro-organisms on the growth and nitrogenase activity of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Appl. Bacteriol.* **60**: 143–146.
- [32] LUKAC M., AEGERTER R. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxic.* **31**: 293–305.
- [33] PARK H. D., WATANABE M. F., HARADA K., HAYASHI H., OKINO T. 1993. Seasonal variation of *Microcystis* species and toxic heptapeptide microcystins in Lake Suwa. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* **8**: 425–435.
- [34] PATTERSON G. M.L., LARSEN L. K., MOORE R. E. 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* **6**: 151–157.
- [35] PEARSON M. J., FERGUSON A. J.D., CODD G. A., REYNOLDS C. S., FAWELL J. K., HAMILTON R. M., HOWARD S. R., ATTWOOD M. R. 1990. Toxic blue-green algae. *Water Quality Series* no.2. National Rivers Authority, London, England.
- [36] RAO P. V.L., BHASKAR A. S. B., BHATTACHARYA R. 1996. Effects of nutrient media and culture duration on growth, macromolecular composition and toxicity in batch cultures of *Microcystis aeruginosa*. *Microbios* **86**: 95–104.
- [37] RAPALA J., SIVONEN K., LUUKKAINEN R., NIEMELÄ S. I. 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains – a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* **5**: 581–591.
- [38] RAPALA J., LAHTI K., SIVONEN K., NIEMELÄ S. I. 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 423–428.
- [39] RAPALA J., SIVONEN K., LYRA CH., NIEMELÄ S. I. 1997. Variation of Microcystins, Cyanobacterial Hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a Function of Growth Stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2206–2212.
- [40] REPAVICH W. M., SONZOGNI W. C., STANDRIDGE J. H., WEDEPOHL R. E., MEISNER L. F. 1990. Cyanobacteria in Wisconsin water: acute and chronic toxicity. *Water Res.* **24**: 225–231.
- [41] RESSOR R., SOONG F. S., FITZGERALD J., TURCZYNOWICZ L., EL SAADI O., RODER D., MAYNARD T., FALCONER I. 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). National Health and Medical Council, Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.
- [42] REYNOLDS C. S. 1991. Ecology and control of cyanobacteria (blue-green algae) W: G. A. CODD, C. ROBERTS (red.), *Public Health Aspects of Cyanobacteria (blue-green algae)*. Proceedings of a seminar in London. *Phls Microbiol. Digest* **8**: 87–90.
- [43] RINEHART K. L., NAMIKOSHI M., CHOI B. W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* **6**: 159–176.
- [44] RIVASSEAU C., MARTINS S., HENNION M. C. 1998. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **799**: 155–169.
- [45] ROGALSKA-KUPIEC M., BOCHNIA T. 1998. Toksyczny syntetyzowane przez sinice. *Wiad. Bot.* **42**: 11–19.
- [46] ROJAS M., NÚÑEZ M. T., ZAMBRANO F. 1990. Inhibitory effects of a toxic peptide isolated from a waterbloom of *Microcystis* sp. (cyanobacteria) on iron uptake by rabbit reticulocytes. *Toxic.* **28**: 1325–1332.
- [47] RUNNEGAR M. T., FALCONER I. R., JACKSON A. R.B., MCINNES A. 1983. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* cultures. *Toxic.* **3** (suppl.): 377–380.
- [48] SIVONEN K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2658–2666.
- [49] SIVONEN K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycol.* **35** (suppl.): 12–24.
- [50] SIVONEN K. 1998. Toxin produced by cyanobacteria. W: M. MIRAGLIA, H. VAN EGMOND, C. BRERA, J. GILBERT (red.), *Mycotoxins and Phycotoxins – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*. Printed in the USA. s. 547–568.
- [51] SKULBERG O. M., CODD G. A., CARMICHAEL W. W. 1984. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *Ambio. Spec. Rep.* **13**: 244–247.
- [52] SMAYDA T., SHIMIZU Y. 1993. Toxic phytoplankton blooms in the sea. W: *Developments in marine biology*. Amsterdam – London – New York – Tokyo 3.
- [53] TAKENAKA S., WATANABE M. F. 1997. Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere.* **34**: 749–757.
- [54] TARCZYŃSKA M., ZALEWSKI M. 1995. Toksyczność zawkitów sinicowych jako wynik eutrofizacji zbiorników wodnych. *Gosp. Wod.* **4**: 83–87.
- [55] UTKILEN H., GJOLME N. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1321–1325.
- [56] UTKILEN H., GJOLME N. 1995. Iron – stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 797–800.
- [57] VAN DER WESTHUIZEN A. J., ELOFF J. N. 1983. Effect of culture age and pH of culture medium on the growth and toxicity of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Z. Pflanzenphysiol.* **110**: 157–163.
- [58] VAN DER WESTHUIZEN A. J., ELOFF J. N. 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* **163**: 55–59.
- [59] VAN DER WESTHUIZEN A. J., ELOFF J. N., KRÜGER G. H.



- J. 1986. Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Archiv Hydrobiol.* **108**: 145–154.
- [60] VAN DER WESTHUIZEN A. J., ELOFF J. N., KRÜGER G. H.J. 1988. Effect of culture age and pH of the culture medium on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *S. Afr. Tydskr. Plantkunde.* **54**: 372–374.
- [61] VINING L. C., WRIGHT J. L.C. 1977. Biosynthesis of oligopeptides. W: J. D. BULLOCK (red.), *A Specialist Periodical Report Biosynthesis*. Illus. Chemical Society, London, s. 240–305.
- [62] WATANABE M. F., OISHI S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of cyanobacterium *M. aeruginosa* under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1342–1344.
- [63] WATANABE M. F., HARADA K. I., MATSURA K., WATANABE M., SUZUKI M. 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis species* (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* **1**: 161–165.
- [64] WATANABE M. F., TSUJI K., WATANABE Y., HARADA K., SUZUKI M. 1992. Release of heptapeptide toxin (Microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Nat. Tox.* **1**: 48–53.
- [65] WICKS R. J., THIEL P. G. 1990. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 1413–1418.