

STRESZCZENIE / SUMMARY

Sinice syntetyzują szerokie spektrum bioaktywnych metabolitów wtórnych, często bardzo szkodliwych dla zdrowia i życia zwierząt oraz ludzi. Wśród nich za najbardziej toksyczny związek uważana jest cylindrospermopsyna (CYN). CYN ze względu na sposób oddziaływania na kręgowce została zakwalifikowana do grupy cytotoksyn. Oddziałuje ona niekorzystnie na wszystkie komórki organizmu oraz prowadzi do zaburzenia przebiegu wielu szlaków biochemicznych u kręgowców, w tym także ludzi. Dodatkowe zagrożenie stanowi fakt, że jest ona bioakumulowana przez organizmy na wszystkich poziomach łańcucha troficznego. CYN jest syntetyzowana przez sinice reprezentujące gatunki o budowie nitkowatej należące do rzędów *Nostocales* i *Oscillatoriales*. Wszystkie sinice, u których wykazano zdolność do syntezy CYN występują w środowisku słodkowodnym, rzadziej zasolonym. Ze względu na ich rozległy zasięg geograficzny występowanie tej toksyny zostało potwierdzone na całym świecie, a jej obecność w zbiornikach wody przeznaczonej do konsumpcji stanowi poważny problem. Aktualnie poszukuje się bezpiecznych i skutecznych metod usuwania CYN ze środowiska naturalnego oraz w procesie uzdatniania wody surowej.

Oddziaływanie CYN na komórki roślinne, w przeciwieństwie do organizmów zwierzęcych, nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione. Dodatkowo, wiele spośród opublikowanych wyników często w sposób sprzeczny ze sobą charakteryzuje odpowiedź fizjologiczną i biochemiczną makrofitów na jej obecność. W dostępnej literaturze naukowej brak jest całościowego opisu oddziaływania tej toksyny na organizm roślinny. Potrzeba poznania mechanizmu oddziaływania CYN na makrofity wydaje się być zadaniem bardzo ważnym i pilnym, ponieważ stanowią one w środowisku wodnym grupę głównych, pierwotnych producentów. Istotnym jest również fakt, że żyją one w bezpośrednim kontakcie z sinicami i uwalnianymi przez nie toksynami.

Wyniki z przeprowadzonych eksperymentów zamieszczone w prezentowanej pracy doktorskiej stanowią pierwsze doniesienie naukowe opisujące oddziaływanie CYN na wybrane procesy fizjologiczne makrofitu *Lemna trisulca* zachodzące podczas długookresowej kultury. Jak wykazano w kolejnych seriach doświadczalnych *L. trisulca* odznaczała się wysoką opornością na oddziaływanie CYN w stężeniach zbliżonych i 10-krotnie przewyższających wartości występujące w warunkach naturalnych ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Wykazano, że 20-dniowa kultura makrofitu na pożywkach zawierających $\geq 5 \mu\text{g CYN mL}^{-1}$ hamowała przyrost biomasy, obniżała natężenie procesu fotosyntezy oraz zawartość barwników

fotosyntetycznych, stymulowała uszkodzenie błon biologicznych, wpływ jonów, wzrost poziomu peroksydacji lipidów błonowych oraz wzmożoną syntezę białek.

Nie stwierdzono natomiast zdolności makrofitu do akumulacji i biodegradacji CYN. Pomimo, że toksyna w trakcie przeprowadzonych eksperymentów nie była pobierana z pożywek i akumulowana w tkankach *L. trisulca*, wyniki jednoznacznie potwierdziły, że jej stężenie ulegało obniżeniu. Stopień degradacji CYN był zależny od początkowego jej stężenia i czasu kultury.

Przy użyciu UPLC-MS/MS w pożywkach zidentyfikowano dwa produkty jej dekompozycji, które oznaczono jako P1 i P2. Związek P1 to najprawdopodobniej opisana w literaturze 7-epicylindrospermopsyna ($\lambda = 261,8 \text{ nm}$, $m/z = 438 \text{ [M+Na]}^+$), w swojej strukturze różniąc się od CYN ułożeniem przestrzennym grupy hydroksylowej przy C7. Z kolei drugi produkt dekompozycji P2 ($\lambda = 263 \text{ nm}$, $m/z = 314 \text{ [M+Na]}^+$), na podstawie dostępnych informacji przyjęto, że powstał w reakcji odłączenia pierścienia uracylowego od tricyklicznej grupy guanidynowej występującej w strukturze CYN i przyłączenia grupy hydroksylowej o nieznanej stereokonfiguracji.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły ponadto, że CYN nie tworzyła trwałych kompleksów z białkami wyizolowanymi z tkanek makrofitu. Wyniki komercyjnie dostępnego biotestu THAMNOTOXKIT FTM wykazały, że ekstrakt z *L. trisulca* kultywowanej z $5 \mu\text{g CYN mL}^{-1}$ nie był toksyczny dla larw skorupiaka *Thamnocephalus platyurus*. *L. trisulca* w warunkach występowania CYN w środowisku stanowi, jak się wydaje, nietoksyczne źródło pokarmu dla współgzystujących organizmów.

Realizacja kolejnego problemu badawczego pozwoliła, po raz pierwszy, na określenie fizjologicznych i biochemicznych reakcji indukowanych allelopatycznym oddziaływaniem makrofitu *L. trisulca* i sinicy *C. raciborskii* (głównego producenta CYN na świecie) w trakcie wspólnej kultury. W czasie 35-dniowej jednoczesnej uprawy obydwu organizmów wykazano nieznaczne zahamowanie przyrostu biomasy *L. trisulca*, na które prawdopodobnie wywierało wpływ wyczerpywanie się składników mineralnych w pożywkach. Z kolei istotne obniżenie akumulacji biomasy *C. raciborskii* było indukowane obecnością makrofitu. Odnotowana wydajna absorpcja jonów fosforanowych z pożywek przez makrofit w naturalny sposób modyfikowała stosunek N:P, tym samym ograniczając dostępność tego kluczowego dla rozwoju sinic pierwiastka.

Ponadto wykazano, że w trakcie długotrwałej wspólnej kultury następowało obniżenie stężenia CYN wewnątrz komórek sinicy oraz w pożywkach w porównaniu do jej samodzielnej kultury. W pożywkach, w których prowadzono jednoczesną kulturę *L.*

trisolca i *C. raciborskii* stwierdzono wzrost zawartości białka syntetyzowanego przez te organizmy.

Podobnie jak w przypadku kultury makrofity z CYN, również po uprawie z *C. raciborskii*, w tkankach *L. trisolca* nie wykazano obecności toksyny, pochodnych ani trwałych produktów jej dekompozycji. Dodatkowo przy wykorzystaniu biotestu THAMNOTOXKIT FTM ustalono brak toksyczności ekstraktu z *L. trisolca* po kultury z *C. raciborskii*. W celu jednoznacznej weryfikacji przydatności testowanego makrofity dla ograniczania rozwoju *C. raciborskii* oraz syntezy CYN konieczne jest wykonanie eksperymentów w warunkach *in situ*.

Cyanobacteria synthesize a wide range of bioactive secondary metabolites, often very harmful to the health and life of animals and humans. Among them, cylindrospermopsin (CYN) is considered the most toxic compound. CYN has been classified as a cytotoxin due to the way it affects vertebrates. It exerts a negative effect on all cells of the body and leads to disturbance of the course of many biochemical pathways of vertebrates, including humans. An additional threat is the fact that it is bioaccumulated by organisms at all levels of the trophic chain. CYN is synthesized by cyanobacteria with filamentous morphology belonging to the orders of *Nostocales* and *Oscillatoriales*. All cyanobacteria producing CYN occur in the freshwater environment, rarely saline. Due to their extensive geographical range, the occurrence of this toxin has been confirmed worldwide, and its presence in drinking water reservoirs is a serious problem. Currently, scientists are looking for safe and effective methods of removing CYN from the natural environment and in the raw water treatment process.

The impact of CYN on plant cells, unlike animal organisms, has not been fully elucidated yet. In addition, many of the published results characterize, often in a contradictory way, the physiological and biochemical response of macrophytes to its presence. The available scientific literature lacks a comprehensive description of this toxin effect on the plant organism. The need to understand the mechanism of CYN influence on macrophytes seems to be a very important and urgent task because plants constitute a group of primary producers in the aquatic environment and live in direct contact with cyanobacteria and their toxins.

The results from the experiments presented in the doctoral thesis are the first scientific report describing the impact of CYN on the selected physiological processes of the macrophyte *Lemna trisulca* during long-term cultivation. *L. trisulca* was highly resistant to CYN in concentrations close to and 10-times higher than values found in natural conditions ($0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$). It was shown that the 20-day cultivation of macrophyte on media containing $\geq 5 \mu\text{g of CYN mL}^{-1}$ inhibited biomass growth, decreased the intensity of photosynthesis and the content of photosynthetic pigments, induced damage of biological membranes, leakage of ions, peroxidation of membrane lipids and protein synthesis. The macrophyte, however, did not accumulate and biodegrade CYN. Despite the toxin during the experiments was not uptaken from the media and accumulated in the *L. trisulca* tissues, the results clearly confirmed that its concentration was significantly reduced. The degree of CYN degradation was dependent on its initial concentration and time of cultivation. In the media, two decomposition products marked as P1 and P2 were identified using UPLC-MS/MS technique. The compound P1 is most likely to be 7-epicyclindropermopsin ($\lambda = 261.8 \text{ nm}$, $m/z = 438 [\text{M}+\text{Na}]^+$) that in its structure differs from the CYN by the spatial position of the hydroxyl group at C7. In turn, based on the available information, it is assumed that the second decomposition product P2 ($\lambda = 263 \text{ nm}$, $m/z = 314 [\text{M}+\text{Na}]^+$) was formed as the result of cleavage of the uracil ring from the tricyclic guanidine group in CYN structure and the insertion of the hydroxyl group of unknown stereoconfiguration. The performed experiments also showed that CYN did not form stable complexes with proteins isolated from macrophyte tissues. The results of the commercially available THAMNOTOXXKIT FTM biotest demonstrated that the extract of *L. trisulca* cultivated with $5 \mu\text{g CYN mL}^{-1}$ was not toxic to *Thamnocephalus platyurus* crustacea larvae. *L. trisulca* in the presence of CYN in the environment seems to be a non-toxic food source for coexisting organisms.

The implementation of the next research problem allowed for the first time to characterize physiological and biochemical reactions induced by the allelopathic interaction of macrophyte *L. trisulca* and cyanobacterium *C. raciborskii* (the main producer of CYN in the world) during their co-cultivation. Over the 35-day simultaneous cultivation of both organisms, a slight inhibition of *L. trisulca* biomass growth was shown, which was probably influenced by nutrient depletion of the media. In turn, a significant decrease in the *C. raciborskii* biomass accumulation was induced by the presence of the macrophyte. The reported efficient absorption of phosphate ions from the media by the macrophyte naturally modified the N:P ratio, limiting the availability of this key element for the development of cyanobacteria. In addition, during long-term co-cultivation, the concentration of CYN inside

the cells of *C. raciborskii* and in the media was reduced compared to its independent culture. In media where *L. trisulca* was cultivated with *C. raciborskii*, the content of the protein synthesized by both organisms increased. Similarly to the cultivation of the macrophyte with CYN, also after cultivation with *C. raciborskii*, in *L. trisulca* tissues the presence of toxin, its derivatives or stable decomposition products was not found. Moreover, using the THAMNOTOXKIT FTM bioassay, it was confirmed that the extract of *L. trisulca* after cultivation with *C. raciborskii* was characterized by a lack of toxicity. Nevertheless, to unambiguously verify the usefulness of the tested macrophyte to limit the development of *C. raciborskii* and CYN synthesis, it is necessary to perform experiments *in situ*.

