

TOKSYNY SYNTETYZOWANE PRZEZ SINICE

The Toxins of *Cyanobacteria*

Marta ROGALSKA-KUPIEC, Tadeusz BOCHNIA

Summary. The toxins of cyanobacteria excreted into habitat may become a source of intoxication for the people and animals. Waterblooms of cyanobacteria and intoxication with their toxins were registered all over the world except the Antarctic. Occurrence of waterblooms of cyanobacteria is induced by many factors e.g. eutrophization of water, pH, temperature, insolation and concentration of O₂ i CO₂. The toxins of cyanobacteria belong to the most poisonous substances generated by the organisms (lethal dose is 9–500 µg kg⁻¹). The toxins are forming a very differentiated group of chemical compounds like proteins, alkaloids and heterocyclic compounds. The toxins are divided into neurotoxins, hepatotoxins, dermatotoxins considering mechanism of their action and a type of damaged tissue. Neurotoxins (anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin, neosaxitoxin) are responsible for damaging both the central and the peripheral nervous system through the repression of the cholinergic system. On the other hand hepatotoxins (microcistin, nodularin) are causing cirrhosis or tumor of the liver. Dermatotoxins (debromoaplysiatoxin, langbyatoxin) are generating acute dermatitis or skin cancer. At the present time the most often used method of identification belong to three groups: chemical, immunological and mouse bioassay.

Key words. cyanobacteria, dermatotoxins, hepatotoxins, neurotoxins, toxic bloom.

Mgr Marta Rogalska-Kupiec, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Uniwersytet Jagielloński, Al. Mickiewicza 3, 31–120 Kraków.

Mgr Tadeusz Bochnia, Miejskie Przedsiębiorstwo Wodociągów i Kanalizacji S. A., ul. Senatorska 1, 30–106 Kraków.

WSTĘP

Pierwsze doniesienia dotyczące zatruc¹ toksynami produkowanymi przez sinice pochodzą z XIX wieku. W 1842 roku w Anglii nastąpiło masowe zatrucie się ludzi toksynami zawartymi w „kwitnącej wodzie”. Następne informacje pochodzą z 1878 roku z Australii, gdzie miały miejsce liczne zachorowania zwierząt domowych w wyniku spożywania wody ze zbiorników, w których masowo występowały sinice. Obserwacje te zostały po raz pierwszy szczegółowo opisane w literaturze naukowej przez Francisa [29]. Pierwsze doniesienia z Polski na temat zatruc¹ zwierząt hodowlanych pochodzą z połowy lat 30-tych naszego stulecia – w 1934 roku miało miejsce zachorowanie zwierząt pojoy¹nych wodą z Jeziora Cichego [30].

Masowe pojawienia się sinic oraz zatrucia ich toksynami stały się przyczyną rozpoczęcia prowadzenia dokumentacji i statystyk z tym związanych [21, 56, 57]. Do chwili obecnej są one notowane we wszystkich regionach świata. Jednak dane te nie są kompletne, ponieważ nie wszystkie państwa prowadzą dokumentację dotyczącą zawartości toksyn w wodzie oraz zatruc¹ się zwierząt nimi wywoływanych. Oznaczenia stężenia toksyn w naturalnym zbiorniku wodnym jest bardzo trudne, ze względu na duże wahania ich zawartości w czasie oraz w zależności od głębokości, z której została pobrana próbka. Z prowadzonych badań przez Lindholma i Meriluoto [40] wynika, że maksymalne stężenie toksyn w jeziorach Finlandii występowało na głębokości 7–8 m i wynosiło około 40 µg/dm⁻³ wody, a przy powierzchni stężenie wynosiło tylko

10 $\mu\text{g dm}^{-3}$ wody. Natomiast na głębokości 15 m nie zidentyfikowano już toksyn. Jednak otrzymane przez tych autorów wyniki nie zawsze pokrywają się z oznaczeniami dokonanymi w innych zbiornikach wodnych. Seria bardzo poważnych zachorowań jakie miały miejsce w Minnesocie (USA) w latach 50-tych stała się impulsem do rozpoczęcia intensywnych badań nad budową chemiczną i właściwościami tych toksyn [35, 41].

MASOWE POJAWIANIE SIĘ SINIC

Poszczególne gatunki sinic mają różne przystosowanie do życia w planktonie oraz ekologię, jednakże potencjalnie toksyczne, zdolne do tworzenia zakwitów gatunki sinic mają kilka wspólnych cech. Jedną z nich jest posiadanie wakuol gazowych, których obecność umożliwia ich przemieszczanie się w pionie w toni wodnej. Kiedy sinice występują w zbiorniku wodnym w dużych ilościach, koncentrują się przy powierzchni i powodują zmianę barwy wody na niebieskozieloną. Mogą być wtedy łatwo spychane przez wiatr do zatok, gdzie tworzą gruby kożuch [61]. Sinicowe 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. [50]. Obecnie jako kryterium zakwitu glonów przyjmuje się:

a) liczebność równą 10^6 komórek w dm^3 wody; b) biomasa odpowiadającą $5\text{--}8$ mg świeżej masy w 1dm^3 wody; c) ilość chlorofilu, np. wynoszącą $0,05 \mu\text{g Chl}_a \text{dm}^{-3}$ wody.

Przyczyną tak masowego rozwoju sinic jest eutrofizacja wód zarówno morskich jak i lądowych, która prowadzi do wzrostu stężenia związków węgla, azotu i fosforu [37]. Obecnie wiadomo, że na występowanie zakwitów mają wpływ również inne czynniki zewnętrzne, takie jak np.: pH, temperatura, nasłonecznienie, przepływy wody, ilość rozpuszczonego w wodzie tlenu i dostępność CO_2 lub jonów HCO_3^- [62]. Z tych powodów zakwity wód występują zwykle sezonowo, najczęściej wiosną (marzec) lub późnym latem (sierpień).

ZAPOBIEGANIE

MASOWEMU WYSTĘPOWANIU SINIC

Problemy związane z masowym pojawianiem się sinic i w konsekwencji występowaniem wysokich stężeń toksyn w zbiornikach wodnych stały się przyczyną poszukiwania sposobów ich ograniczenia lub całkowitego wyeliminowania. Podstawowe działania dotyczą głównie ograniczenia przyczyn masowego występowania sinic, co w większości przypadków sprowadza się do obniżenia stopnia eutrofizacji wód poprzez zmniejszenie poziomu niektórych pierwiastków (C, N, P) oraz wzrost napowietrzania i destryfikacji mas wodnych. Zastosowanie w praktyce tej metody przyniosło dobre rezultaty w wielu regionach świata, powodując zmniejszenie się populacji sinic w zbiorniku wodnym o około 30–40% [50].

Inną możliwością ograniczenia „zakwitów” jest biomanipulacja, czyli metoda polegająca na wprowadzeniu do środowiska życia sinic innych organizmów będących ich konkurentami lub konsumentami. Tego typu doświadczenia z niezbyt dużym powodzeniem prowadzone były od wielu lat [12, 39]. Do wody wprowadzano różne gatunki ryb (*Hypophthalmichthys molitrix*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Aristichthys nobilis*, *Telapia nilotica*, *T. mossambica*) żywiące się sinicami. Prowadzono eksperymenty również z wprowadzeniem do zbiorników wodnych zooplanktonu (np. pierwotniaki, drobne skorupiaki i inne) oraz glonów konkurencyjnych względem sinic (np. gatunki zielenic o nitkowatej plesze) [11, 15, 26]. Wprawdzie ilość sinic w populacji zmniejszała się, jednak poziom toksyn nie ulegał istotnym zmianom. Najbardziej kontrowersyjną metodą, z punktu widzenia zastosowań jej w ekosystemach wodnych, jest użycie związków chemicznych będących algicydami (np.: nadmanganian potasu, reglone A, simazyna, siarczan miedzi) lub koagulantami (np.: wapno, aluny). Ich zastosowanie powoduje prawie całkowite wyeliminowanie lub znaczne ograniczenie populacji sinic. Najczęściej stosowane są w tym celu sole miedzi (np. CuSO_4), a także aluny żelazowo-glinowe, powodujące zahamowanie wzrostu i rozmnażania sinic z rodzaju *Microcy-*

stis [64]. Zostały równocześnie opracowane bardzo szczegółowe normy dotyczące ilości dawkowanych soli, których stężenia wahają się zazwyczaj w granicach od 40g do 80g związku 10^2 m^{-3} wody [57]. Jednak przy zastosowaniu tej metody istnieje duże ryzyko związane z uwalnianiem toksyn przez martwe komórki sinic.

TOKSYNY SINIC

Toksyny syntetyzowane przez sinice można podzielić na dwie podstawowe grupy: biotoksyny i cytotoksyny (Tabela 1). Biotoksyny są naturalnymi produktami powstającymi stale w procesach metabolicznych, natomiast cytotoksyny produkowane są przez organizmy w wyniku in-

dukcji przez czynniki zewnętrzne i pełnią one przeważnie funkcje obronne. Toksyny sinic należą do jednych z najbardziej trujących substancji produkowanych przez organizmy żywe. Wysokość dawki letalnej toksyny zależy od rodzaju sinicy która ją syntetyzuje i waha się w granicach od 9–200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ masy ciała, co przedstawione jest w tabeli (Tabela 2).

NEUROTOKSYNY

Są to związki, które mają zdolność uszkodzenia ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego ludzi i zwierząt. Pierwszą neurotoksynę wyizolowano w 1972 roku [40] i nazwano ją anatoksyną-a. Stwierdzono, że pod względem chemicznym jest ona estrem N-hydroksyguani-

Tabela 1. Porównanie dawek letalnych toksyn produkowanych przez sinice z innymi truciznami [20].

Table 1. Toxins lethal doses generated by cyanobacteria in comparison with other poisons [20].

Toksyna <i>Toxin</i>	Źródło <i>Source</i>	Dawka Letalna LD_{50}^1 <i>Lethal Dose LD_{50}^1</i>
Botulina <i>Botulinum toxin-a</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	0.00003
Rycyna <i>Ricin</i>	<i>Ricinus communis</i>	0.02
Saksytoksyna <i>Saxitoxin</i>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	9.0
Jad kobry <i>Cobra toxin</i>	<i>Naja naja</i>	20.0
Anatoksyna-a(s) <i>Anatoxin-a(s)</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	20.0
Nodularyna <i>Nodularin</i>	<i>Nodularia spumigena</i>	50.0
Mikrocystyna-LR <i>Microcystin-LR</i>	<i>Microcystis sp., Anabaena sp.</i>	50.0
Anatoksyna-a <i>Anatoxin-a</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	200.0
Kurrara <i>Curare</i>	<i>Chondodendron tomoentosum</i>	500.0
Cyjanek sodu <i>Sodium cyanide</i>	–	10 000.0

¹ LD_{50} w μg na kg wagi ciała: iniekcja dootrzewna (dla mysz lub szczurów)

¹ *The LD_{50} in μg per kg bodyweight: intra-peritoneal injection (with mice or rats)*

Tabela 2. Podział toksyn produkowanych przez sinice oraz objawy zatrucia [20].

Table 2. Groups of toxins generated by cyanobacteria and signs of toxicosis [20].

Toksyny sinicowe <i>Cyanobacterial toxins</i>			
	Biotoksyny <i>Biotoxins</i>		Cytotoksyny <i>Cytotoxins</i>
	Neurotoksyny <i>Neurotoxins</i>	Hepatotoksyny <i>Hepatotoxins</i>	
Źródło toksyn <i>Source of toxins</i>	Anabaena sp. Aphanizomenon sp. Oscillatoria sp. Trichodesmium sp	Microcystis sp. Anabena sp Nodularia sp. Oscillatoria sp Nostoc sp.	Nostocales Strigoneatales
Toksyny <i>Toxins</i>	anatoksyna-a anatoxin-a anatoksyna-a(s) anatoxin-as saksytoksyna saxitoxin neosaksytoksyna neosaxitoxin	mikrocystyny microcystins nodularyna nodularin	akutificyna acutiphycin scytoficyna scytophycin cyanobakteryna cyanobacterin tubercydyna tubercidin
Objawy zatrucia <i>Signs of toxicosis</i>	drżenie mięśni muscle fasciculations zachwianie równowagi staggering sinienie cyanosis ślinotok hypersalivation śmierć przez uduszenie death due to respiratory arrest	anoreksja anorexia ogólne osłabienie weakness biegunki diarrhoea wymioty vomiting wylew wewnątrzwartobowy inter – liver effusion	różnego rodzaju uszkodzenia na poziomie komórki different kinds of injuries on cell level

dyno-metylo-fosforanowym o masie cząsteczkowej 165 Da. Anatoksyna-a jest silnym post-synaptycznym agonistą nikotynowego receptora cholinergicznego [4, 20, 60, 69]. W naturalnym układzie uwolniona przez neurony acetylocholina wiąże się do specyficznych receptorów będących składowymi kanałami jonowymi, które w wyniku pobudzenia otwierają się, powodując przepływ jonów do wnętrza komórki mięśniowej. Pod wpływem działania acetylocholina następuje czasowa depolaryzacja blaszki nerwowo-mięśniowej, a następnie skurcz mięśnia. W tym czasie acetylocholinesteraza degraduje związaną z receptorem acetylocholinę, co prowadzi do zamknięcia kanałów jonowych i zapobiega nadpobudliwości komórek. Po krótkim okresie czasu receptor może ulegać powtórnemu

pobudzeniu. Skutkiem działania anatoksyny-a jest stała depolaryzacja synapsy nerwowo-mięśniowej, ponieważ toksyna ta wiąże się z receptorem acetylocholinyl i nie może być rozłożona przez acetylocholinesterazę, ani żaden inny enzym. Dochodzi więc do ponadstymulacji komórek mięśniowych, co w efekcie prowadzi do stałych skurczów mięśni [18]. W krótkim czasie po zatruciu się anatoksyną-a występują objawy w postaci: drżenia mięśni, zachwiania równowagi oraz dolegliwości brzusznych. Śmierć następuje poprzez uduszenie w wyniku uszkodzenia mięśni oddechowych.

Inną neurotoksyną produkowaną przez sinice z rodzaju *Anabaena* jest anatoksyna-a(s) (masa cząsteczkowa wynosi 254 Da). Skutki działania tej toksyny są podobne do działania anato-

ksyny-a, jednak pod względem chemicznym jest to zupełnie inny związek i działa przez inny mechanizm. Jest on porównywalny z mechanizmem działania fosforoorganicznych, syntetycznych pestycydów np.: parationu lub malationu [13]. Różnica w sposobie działania anatoksyny-a(s) w porównaniu z anatoksyną-a polega na tym, że acetylocholina bez przeszkód wiąże się do receptora, jednak nie może być rozłożona przez acetylocholinesterazę. Aktywność tego enzymu zostaje zahamowana przez anatoksynę-a(s), prowadząc w ten sposób do ponadstymulacji synapsy nerwowo-mięśniowej [18].

Do grupy neurotoksyn zaliczono także związki produkowane przez sinice morskie: saksytoksyny, neosaksytoksyny. Toksyne te powodują zahamowanie przekazu impulsu nerwowego poprzez blokadę kanałów jonowych w błonie neuronu. Prowadzi to do braku wydzielania acetylocholino przez komórkę nerwową. Gdy neuron jest w ten sposób zablokowany, wówczas mięśnie nie są stymulowane i pozostają w stanie paraliżu czynnościowego [1, 18].

HEPATOTOKSYNY

Hepatotoksyny są to związki, które działają toksycznie na komórki wątroby, powodując w efekcie jej marskość lub nawet zmiany nowotworowe. Pod względem chemicznym należą do cyklicznych oligopeptydów zakończonych fragmentem tzw. ADDA (β -aminokwas), który jest „strukturalnym kluczem” umożliwiającym biologiczną aktywność cząsteczki. Masa cząsteczkowa hepatotoksyn waha się w granicach 800–1000 Da [37].

Mechanizm działania hepatotoksyn był przedmiotem licznych badań, których wyniki sugerują wieloetapowość ich działania [6]. Pierwszym etapem jest przenikanie toksyny do krwi, które ma miejsce w jelicie krętym i związane jest z aktywnością (nie poznanych dokładnie) żółciowych przenośników, umożliwiających transport toksyny przez błonę śluzową [25]. Następnie są one preferencyjnie transportowane do hepatocytów [24, 43, 52]. Pochłonięcie toksyny przez komórki wątroby możliwe jest dzięki występowaniu równie mało znanych przenośników [54]. Hepatotoksyny prowadzą do zmian w fila-

mentach pośrednich i mikrofilamentach aktywnych poprzez zahamowanie aktywności fosfataz białkowych. W konsekwencji ich działanie przyczynia się do agregacji w/w struktur w centrum komórki. Uszkodzenia cytoszkieletu powodują zaokrąglanie się komórek i w efekcie prowadzą do zniszczenia wewnętrznej struktury wątroby. Staje się to przyczyną powstania typowych objawów zatrucia hepatotoksynami, między innymi: wewnątrzwątrobowych krwotoków, jej niewydolności fizjologicznej, a następnie śmierci organizmu [28, 34, 53]. Hepatotoksyny można podzielić na dwie grupy biorąc za podstawę ilość budujących je aminokwasów: mikrocystyny – 7 aminokwasów, nodularyny – 5 aminokwasów. Nazwa toksyny pochodzi od gatunku sinicy, w którym po raz pierwszy została ona zidentyfikowana. Pierwszą wyizolowaną hepatotoksyną była mikrocystyna z *Microcystis aeruginosa* [7, 19, 38]. Pod względem chemicznym jest monocyklicznym peptydem zawierającym zarówno aminokwasy o konfiguracji L jak i D [8, 9, 10, 55]. Do chwili obecnej wyizolowano około 24 różnych odmian mikrocystyny [17]. Różnią się one między sobą dwoma aminokwasami typu L, stąd różne modyfikacje nazwy mikrocystyny: – LR (leucyna – arginina), – YA (tyrozyna – alanina), – YR (tyrozyna – arginina), – YM (tyrozyna – metionina), – RR (arginina – arginina) [5].

Inną hepatotoksyną charakteryzującą się największą różnorodnością struktury jest nodularyna produkowana przez *Nodularia spumigena*. Pod względem chemicznym jest cyklicznym pentapeptydem zawierającym oprócz ADDA również: kwas glutaminowy, argininę, kwas β -metylo-asparaginowy oraz dehydroksymaślan. Zatrucia tą toksyną notowane były w Australii, Niemczech, Szwecji i Holandii [27, 42, 52, 59].

TOKSYNY PRODUKOWANE PRZEZ SINICE MORSKIE

Toksyne produkowane przez sinice morskie są często przyczyną chorób skórnych [3, 44]. Jedną z najbardziej popularnych sinic należących do tej grupy jest *Lyngbya majuscula*. Syntetyzuje ona dwie różne toksyny (ang. debromoaplysiatoxin i lyngbyatoxin). Objawy choro-

by w postaci swędzenia skóry, pieczenia, obrzęku czy zaczerwienienia pojawiają się po kilku godzinach od kąpieli w wodzie morskiej zawierającej wyżej wymienione toksyny. Pierwsze doniesienia o schorzeniach pochodzą z 1961 roku z Hawajów [31] i z 1979 roku z Japonii [33]. Znane są także przypadki zachorowań na nowotwory skóry w wyniku częstego kontaktu z tymi toksynami. Pod względem chemicznym są one związkami organicznymi zbudowanymi z 30 atomów węgla, które zawierają w swojej budowie heterocykliczne pierścienie z licznymi mostkami tlenowymi oraz grupami hydroksylowymi [41].

METODY IDENTYFIKACJI

Zainteresowania toksynami produkowanymi przez sinice pociągnęło za sobą rozwój metod i aparatury umożliwiających ich izolację i identyfikację. Stosowany do tych celów sprzęt musi charakteryzować się bardzo wysoką czułością, ponieważ pomiary zawartości toksyn, które mogą być przyczyną zatruc wahać się często w granicach nanogramów i pikogramów. Pierwsze próby izolacji toksyn przez Olsona [48] miały miejsce w 1951 roku, jednak nie zostały uwieńczone większymi rezultatami. Sukces przyniosła dopiero izolacja mikrocytyny dokonana 8 lat później [49]. Największym problemem, jaki napotykały badacze, jest duża ilość zanieczyszczeń innymi związkami chemicznymi w próbkach zawierających niskie stężenia toksyn. Obecnie stosowane metody można podzielić na trzy podstawowe grupy: chemiczne, immunologiczne i testy na zwierzętach.

METODY CHEMICZNE

Metodą najczęściej stosowaną do identyfikacji toksyn jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [5, 32, 63], ponieważ charakteryzuje się ona wysoką czułością oraz umożliwia równocześnie odzyskanie poszczególnych składników rozdzielanej mieszaniny [13]. Za pomocą HPLC można oznaczyć wszystkie rodzaje toksyn bez względu na ich masę cząsteczkową. Zakres czułości tej metody mieści się w granicach 0,1–0,001 ppm. Przy użyciu HPLC

otrzymano bardzo czystą chemicznie anatoksynę-a, mikrocytynę oraz 10 innych toksyn syntetyzowanych przez różne gatunki sinic. W 1986 roku stwierdzono, że metoda ta może być użyta nie tylko do identyfikacji i oczyszczania odpowiednio przygotowanych preparatów biologicznych, ale także do analizy zawartości toksyn w wodzie bezpośrednio pochodzącej ze zbiorników wodnych lub w produktach żywnościowych. Obecnie HPLC, przy zastosowaniu kolumn z odwróconą fazą C18 oraz detektorem diodowym (RP-HPLC-DAD), jest najczęściej używaną metodą w badaniach rutynowych i monitorowaniu czystości zbiorników wodnych, stanowiących zasoby wody pitnej.

Do chemicznej analizy toksyn stosowane są również inne rodzaje chromatografii, np: chromatografia cienkowarstwowa (TLC) [46, 47], wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC) i chromatografia gazowa (GC) [36].

METODY IMMUNOLOGICZNE

Popularnie stosowaną metodą jest test ELISA (ang. enzyme linked immunoabsorbant assay). Metoda ta polega na reakcji antygen-przeciwciała. W 1988 roku Brooks i Cood [14] otrzymali poliklonalne przeciwciała przeciwko mikrocytynie-L. Jednak zbyt mała ich specyficzność uniemożliwiła identyfikację poszczególnych typów tej toksyny. Obecnie syntetyzowane są już przeciwciała przeciwko wszystkim typom mikrocytyny [23], a także innym rodzajom toksyn [2]. Stosując test ELISA można nie tylko identyfikować poszczególne toksyny, ale również badać ich stężenie w wodzie oraz tkankach zwierzęcych [22].

TESTY NA ZWIERZĘTACH

Jest to najstarsza metoda skryningowego badania toksyn zawartych w wodzie oraz laboratoryjnych hodowlach. Największą zaletą tej metody jest jej niski koszt, a także uzyskanie w czasie kilku godzin informacji odnośnie jakości i ilości badanej toksyny.

Wadą tej metody jest natomiast trudność oznaczenia niskiego stężenia toksyn, a także iden-

tyfikacja różnych odmian tej samej toksyny (toksyne homologiczne) [17].

PRÓBY WYKORZYSTANIA TOKSYN SINICOWYCH

Toksyne sinic znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach biologii.

Anatoksyna-a może stanowić bazę dla tworzenia nowych pestycydów stosowanych w ochronie roślin. Jest ona łatwiej rozkładana w porównaniu z obecnie używanymi środkami owadobójczymi. Poza tym ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie nie kumuluje się ona w tkankach zwierzęcych bogatych w lipidy, co stanowi poważny problem w rolnictwie przy stosowaniu popularnych pestycydów. Zmodyfikowana wersja anatoksyny-a może być w przyszłości wykorzystywana do leczenia pacjentów z niedoborem acetylocholino lub do hamowania procesów degeneracyjnych w chorobie Alzheimera [18].

Odkrycie saksotoksyn i neosaksotoksyn podsunęło badaczom wiele pomysłów ich wykorzystania w dziedzinie farmakologii [3, 57]. Mikrocytyna używana jest do izolacji i badania właściwości fosfatazy proteinowej, a także regulacji ekspresji jej genu w poszczególnych tkankach. Enzym ten odgrywa bardzo ważną rolę między innymi w regulacji podziałów komórkowych i ruchu komórek poprzez bezpośredni wpływ na cytoskielet. Istnieją przypuszczenia, że cytotoxyny niektórych sinic mają zdolność niszczenia mikroorganizmów takich jak bakterie i glony, a także komórek nowotworowych i zakażonych wirusem HIV [17].

LITERATURA

- [1] ALDMAN W. K., POON G. K., CODD C. A. 1988. Sodium channels blocked by aphanotoxin obtained from the blue-green alga, *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxic.* **20**: 513–516.
- [2] AN J., CARMICHAEL W. W. 1994. Use of a calorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularis. *Toxic.* **32**: 1495–1507.
- [3] AQUATIC (MARINE AND FRESHWATER. BIOTOXINS). 1984. Environmental Health Criteria 37. World Health Organization, Geneva.
- [4] AROUSTRAM R. S. & WITKOP B. 1981. Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4639–4643.
- [5] ASTRACHAN N. B., ARCHER B. G. 1981. Simplified monitoring of anatoxin-a by reverse – phase high performance liquid chromatography and the sub-acute effects of anatoxin-a in rats. W: W. W. CARMICHAEL (red.), *The Water Environment: Algal Toxins and Health*, Plenum Press, New York, s. 437–446.
- [6] BAESLEY V. R., COOK W. O., DAHLEM A. M., HOOSER S. B., LOVEL R. A., VALENTINE W. M. 1989. Intoxication in livestock and water fowl. *Clinical Toxicology – Veterinary Clinics of North America. Food Anim. Pract.* **5**: 345–361.
- [7] BISHOP C. T., ANET E. F. L. J., GORHAM P. R. 1959. Isolation and identification of the fast – death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **37**: 453–471.
- [8] BOTES D. P., KRUGER H., VILJOEN C. C. 1982. Isolation and characterization of four toxins from blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Toxic.* **20**: 945–954.
- [9] BOTES D. P., VILJOEN C. C., KRUGER H., WESSELS O. L., WILLIAMS D. H. 1982. Structure of toxins of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *S. Afric. J. Sci.* **78**: 378–379.
- [10] BOTES D. P., VILJOEN C. C., KRUGER H., WESSELS P. L., WILLIAMS D. H. 1982. Configuration assignments of the amino acid residues and the presence of N-metheldehydealanine in toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxic.* **20**: 1037–1042.
- [11] BOWKER W. W. 1990. Degradation of Blue Green Alga *Microcystis aeruginosa* by Flagellata, *Mouas guttula*. *Environ. Tech.* **11**(8): 739–749.
- [12] BOWKER W. W. 1993. Control of utrofication by Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the Tropical Paranao Reservoir (Brasilia, Brasil): a Hescosom Experiment; *Hydrobiol.* **257**(3): 143–153.
- [13] BRANDYS J., 1991. Toksykologia. Wyd. AM w Krakowie.
- [14] BROOKS W. P., CODD G. A. 1988. Immunoassay of hepatotoxic cultures and water blooms of cyanobacteria using *Microcystis aeruginosa* peptide toxin polyclonal antibodies. *Environ. Tech. Lett.* **9**(1): 1343–1348.
- [15] CANTER H. M., HEANEY S. I., LUND J. W. G. 1990. The ecological significance of growing on planktonic populations of cyanobacteria by the ciliate *Nossula*. *New Phytol.* **114**: 247–263.
- [16] CARDELLINA J. H., MONNER F. J., MOORE R. E. 1979. Seaweed dermatitis: structure of langbyatoxin A. *Science* **24**: 193–195.
- [17] CARMICHAEL W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. App. Bact.* **72**: 445–459.
- [18] CARMICHAEL W. W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Sci. Am.* **270**(1): 78–86.
- [19] CARMICHAEL W. W., BEASLEY V. R., BUNNER D. L., ELOFF J. N., FALCONER I. R., GORHAM P. R., HARADA K. I., YU M. J., KRISHNAMURTHY T., MOORE R. E., RINEHART K. L., RUNNEGAR M. T. C., SKULBERG O. M., WATANABE M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green alga). *Toxic.* **26**: 971–973.

- [20] CARMICHAEL W. W., BIGGS D. F., GORHAM P. R. 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* **187**: 542–544.
- [21] CARMICHAEL W. W., JONES C. L.A., MAHMOOD N. A., THEISS W. C. 1985. Algal toxins and waterbased diseases. *CRC Crit. Rev. Environ. Cont.* **15**: 275–313.
- [22] CHU F. S., HUANG X., WEI R. D., CARMICHAEL W. W. 1989. Production and characterization of antibodies against microcistins. *App. Environ. Microbiol.* **55**: 1928–1933.
- [23] CHU F. S., HUANG X., WEI R. D., CARMICHAEL W. W. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green alga blooms. *J. Ass. Official Anal. Chem.* **73**: 451–456.
- [24] DABHOLKAR A. S., CARMICHAEL W. W. 1987. Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. *Toxic.* **25**: 285–292.
- [25] DAHLEM A. M., HASSAN A. L., SWANSON S. P., CARMICHAEL W. W., BEASLEY C. R. 1988. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the rat. *Pharmacol. Toxic.* **63**: 1–5.
- [26] DEMOTT W. R., ZHANG Q.-R., CARMICHAEL W. W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanography* **36**: 1346–1357.
- [27] ERIKSSON J. E., MERILUOTO J. A.O., KUJARI H. P., OSTERLUND K., FAGERLUND K., HALLBOM L. 1988. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxic.* **26**: 161–177.
- [28] ERIKSSON J. E., PAATERO G. I.L., MERILUOTO J. A.O., CODD G. A., KASS G. E.N., NICOTERA P., ORENIUS S. 1989. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Exp. Cell Res.* **185**: 86–100.
- [29] FRANCIS G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* **18**: 11–12.
- [30] GÓRSKI F. 1960. Zakwity glonów trujące dla zwierząt. *Wszelchświat* **8**: 213–216.
- [31] GRAUCER F. H., ARNOLD H. L. 1961. Seaweed dermatitis. *Arch. Dermatol.* **84**: 720–732.
- [32] HARADA K. I., KIMURA Y., OGAWA K., SUZUKI M., DAHLEM A. M., BEASLEY V. R. CARMICHAEL W. W. 1989. A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Toxic.* **27**: 1289–1296.
- [33] HASHIMOTO Y. 1979. Marine toxins and others bioactive marine metabolites. Tokyo, Japan Scientific Societies Press.
- [34] HOOSER S. B., BEASLEY V. R., WAITE L. L., KUKLENSCHMIDT M. S., CARMICHAEL W. W., HASCHEK W. M. 1991. Actin filament alternations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Veter. Pathol.* **28**: 259–266.
- [35] HUBER C. S. 1972. The crystal structure and absolute configuration of 2,9-diacetyl-9-azobicyclo (4,2,1) non-2,4-ene. *Acta Crystal.* **B28**: 2577–2587.
- [36] JOHNSTONE R. A.W. Spektroskopia masowa w chemii organicznej. PWN, Warszawa 1975.
- [37] KABZIAŃSKI A., SCHOLL H. DOMAGAŁA S. 1997. Oznaczanie toksyn sinicowych w zbiornikach wodnych. W: *Materiały z forum analitycznego Hewlett Packard*. Warszawa.
- [38] KONST H., MCKERCHER P. D., GORHAM P. R., ROBERTSON A., HOWELL J. 1965. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. *Can. J. Com. Med. Veter. Sc.* **29**: 221–228.
- [39] LESLIE A. J., JR VAN DYKE J. M., HESTOND R. S., THOMPSON B. Z. 1987. Menagement of agnotic plants in multi-use with gross carp (*Ctenophoryngodon idella*). *Lake and Reservoir Management (North American Lake Management Society)* **3**: 266–276 40
- [40] LINDHOLM T., MERILUOTO J. A.O., 1991. Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**: 1629–1634.
- [41] MAHMOOD N. A., CARMICHAEL W. W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxic.* **24**: 175–186.
- [42] MAIN D. C., BERRY P. H., PEET R. L., ROBERTSON J. P., 1977. Sheep mortalities associated with the blue-green alga *Nodularia spumigena*. *Austr. Veter. J.* **53**: 578–581.
- [43] MERILUOTO J. A.O., NYGARD S. E., DAHLEM A. M., ERIKSSON J. E., 1990. Synthesis organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxic.* **28**: 1439–1446.
- [44] MOORE R. E., 1981. Toxins from marine blue green alga. W: W. W. CARMICHAEL (red.), *The Water Environment-Algal Toxins and Health*. New York Plenum Press, New York, s. 15–23.
- [45] NAMIKOSHI M., RINEHART K. L., DAHLEM A. M., BEASLEY V. R., CARMICHAEL W. W. 1989. Total synthesis of ADDA, the unique C20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetr. Lett.* **30**: 4349–4352.
- [46] NAMIKOSHI M., RINEHART K. L., SAKAI R., SIVONEN K., CARMICHAEL W. W. 1990. Structures of tree new cyclic hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc sp.* strain 152. *J. Org. Chem.* **55**: 6135–6139.
- [47] OJANPERA I., VUORI E., HIMBERG K., WARIS M., NIINIVAARA K. 1991. Facile detection of anatoxin-a in algal material by thin-layer chromatography with black K salt. *Analyst.* **116**: 265–267.
- [48] OLSON T. A. 1951. Toxic plankton W: T. A. OLSON (red.), *Proceeding of Inservice Training Course in Water Works Problems*. February 15–16. Ann Arbor. Michigan Ann Arbor: Univ Michigan, Sch. Publ. Health, s. 86–95.
- [49] OLSON T. A. 1960. Water poisoning – a study of poisonous algae blooms in Minnesota. *Am. J. Publ. Health* **50**: 883–884.

- [50] PODBIELKOWSKI Z., TOMASZEWICZ H. 1979. Zarys hydrobiologii. PWN, Warszawa, s. 72–77.
- [51] RINEHART K. L., HARADA K. J., NAMIKOSHI M., CHEN C., HARVIS C., MUNRO M. H.G., BLUNT J. W., DAHLEM A. M., CARMICHAEL W. W. 1988. Nodularin, microcystin and the configuration of ADDA. *J. Am. Chem.Soc.* **110**: 8557–8558.
- [52] RUNNEGAR M. T.C., FALCONER J. R. 1981. Isolation, characterization and pathology of the toxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. W: W. W. CARMICHAEL (red.), *The Water Environment: Algal Toxins and Health*. New York: Plenum Press, s. 325–342.
- [53] RUNNEGAR M. T.C., FALCONER J. R. 1986. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural and morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxic.* **24**: 109–115.
- [54] RUNNEGAR M. T.C., GERDES R. G., FALCONER J. R. 1991. The uptake of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxic.* **29**: 43–51.
- [55] SANTIKARN S., WILLIAMS D. H., SMITH R. J., HAMMOND S. J., BOTES D. P., TUIUMAN A., WERSEL P. O., VILJOEN C. C., KRUGER H. 1983. A partial structure for the toxin BE-4 from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Com.* **12**: 652–654.
- [56] SCHWIMMER D., SCHWIMMER M. 1964. Algae and medicine. W: D. F. JACKSON (red.), *Algae and man*. Plenum Publishing Corp., New York, s. 368–412.
- [57] SCHWIMMER M., SCHWIMMER D. 1978. Medical aspects of phycology. W: D. F. JACKSON (red.), *Algae and Man*. Plenum Publishing Corp., New York, s. 278–358.
- [58] SIVONEN K., CARMICHAEL W. W., DAHLEM A. M., RINEHART K. L., KIVIRANT A. J., NIEMALA S. I. 1989. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and the structure of the toxin. *App. Environ. Microbiol.* **55**: 1550–1595.
- [59] SIVONEN K., HIMBERG K., LUUKKAINEN R., NIEMELA S., POON G. K., CODD G. A. 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Toxic. Asses.* **4**: 339–352.
- [60] SKULBERG O. M., CARMICHAEL W. W., CODD G. A., SKULBERG R. 1992. Taxonomy of toxic *Cyanophyceae* (cyanobacteria). W: I. R. FALCONER, (red.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. London: Academic Press.
- [61] TARCZYŃSKA M., ZALEWSKI M. 1994. Toksyczność zalkwitów sinicowych w eutroficznych zbiornikach. W: M. ZALEWSKI (red), *Zintegrowana strategia ochrony i zagospodarowania ekosystemów wodnych*. Biblioteka Monitoringu Środowiska. Łódź.
- [62] WICKS R. J., THEIL 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.
- [63] WONG S. H., HINDIN E. 1982. Detecting an algal toxin by high-pressure liquid chromatography. *Am. Water Works Assoc. J.* **74**: 528–529.
- [64] ZHIWEN L., WEIGEN J., MING Z., CHENGQING Y. 1992. Inlake algal bloom control with enclosure ecosystem bags. *J. Environ. Sci. China* **4**: 54–64.