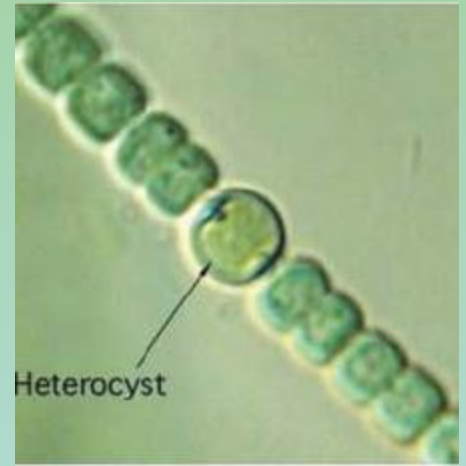


Sinice

ČR:



Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny

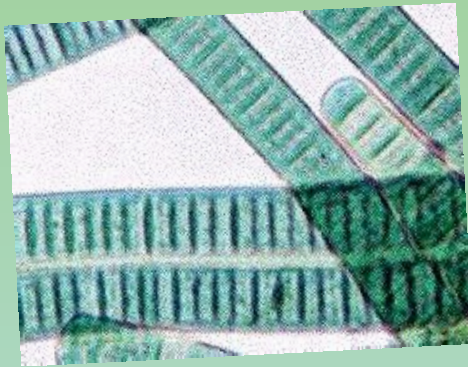
Botanický ústav Akademie věd ČR

(Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie)

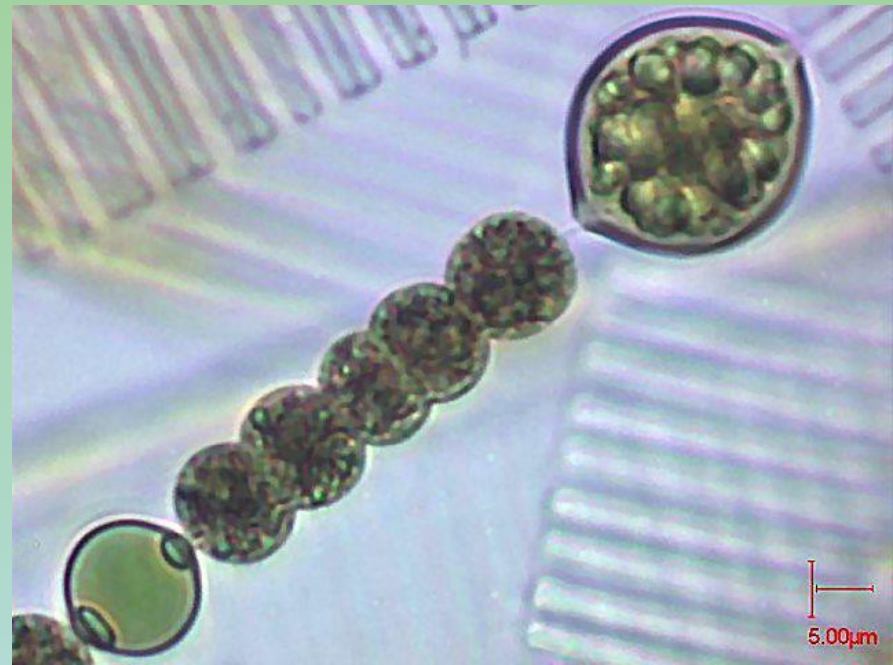
Masarykova univerzita Brno

(Výzkumné centrum RECETOX a pracovní skupina Biodiverzita PŘF MU)

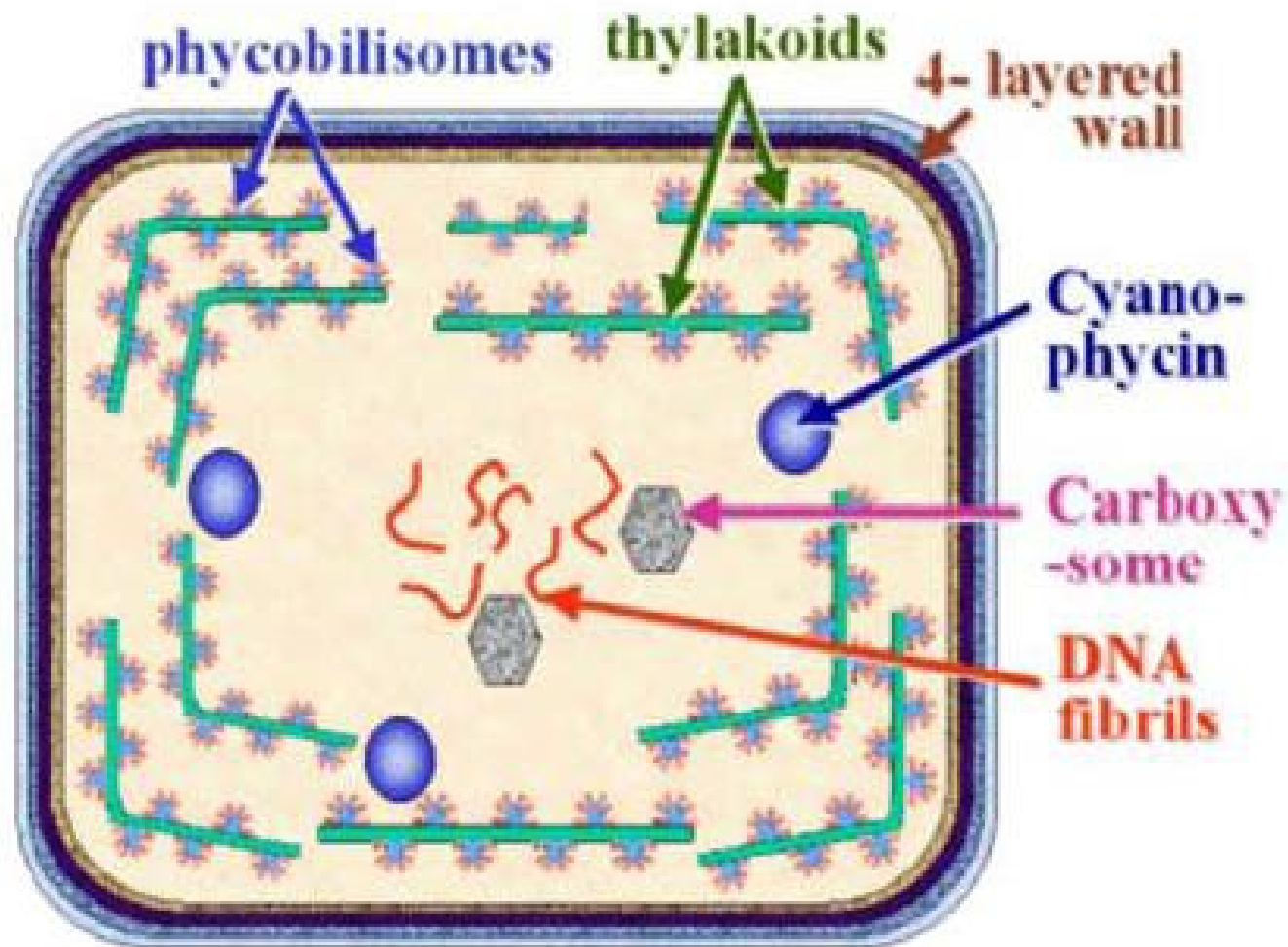
Sdružení Flos Aquae



Obecné charakteristiky

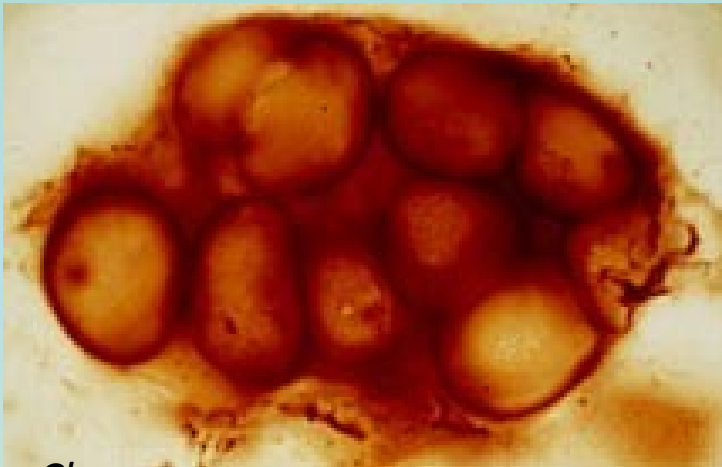


- = prokaryotické řasy
- vyvinuly se před 3 mld let
- dominantní organismy před 2 mld let
- oxigenní fotosyntéza
- Cyanotoxiny
- Některé sinice fixují N_2 a mění je na NH_3 nebo NO_3 (heterocysty)
- Bezbičíkaté; pokud pohyb – gliding motility
- Cytologie:
struktury prokaryot: karboxizomy, polyfosfátová granula, glykogen, buněčná stěna z PG, tylakoidy (chlorofyl A), fykobilisomy (karotenoidy)
- Morfologie:
jednobuněčné (*Synechococcus*) až komplexní větvené vláknité (*Nostocales*, *Stigonematales*) – heterocysty a akinety – mnoho glykogenu, velké



Fosilie

- Evoluce chloroplastu rostlin a vyšších řas (časně kambrium)
- Nejstarší fosilie – západní Austrálie
- Studium SEM a TEM



Chroococcus



Vláknitá *Palaeolyngbya*

Pigmentované fosilie; [Bitter Springs](#) centrální Austrálie
Chert fossil image provided by J. William Schopf.

Stromatolity

- Vrstvy uhličitanu vápenatého precipitujícího přes filamenta sinic (spotřebou CO₂)
- I současný proces –
[Shark Bay](#) západní Austrálie
- stromatolite "turfs"

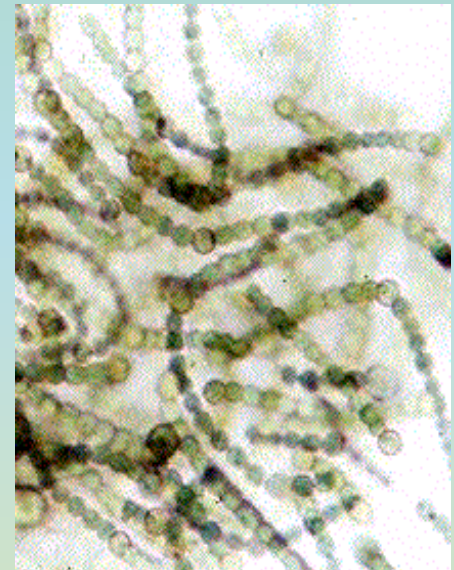
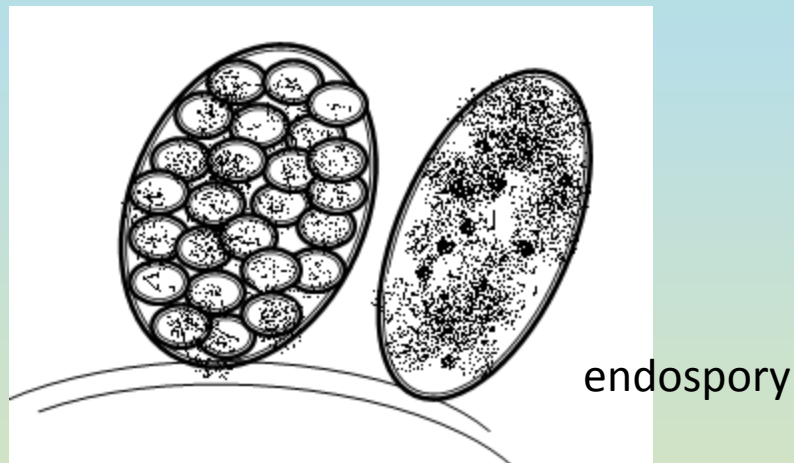
Langiella and *Kidstoniella*
Lower Devonian Rhynie chert

Image of stromatolites provided by the University of Wisconsin Botanical Images Collection.



Reprodukce

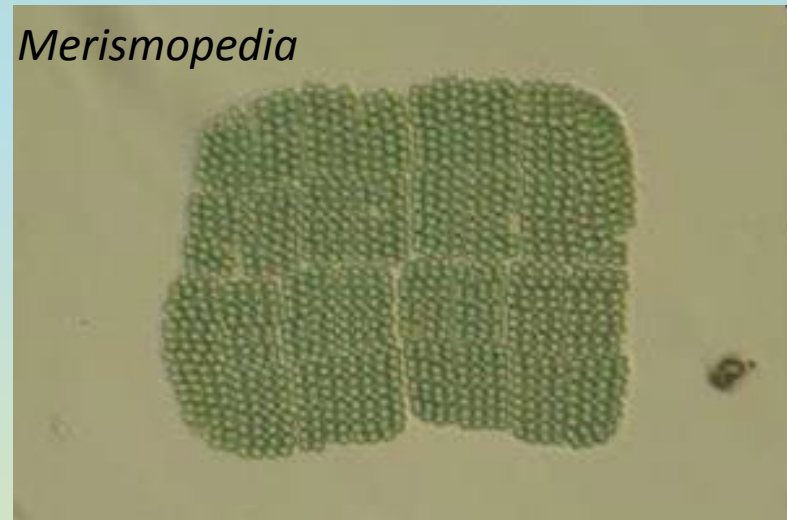
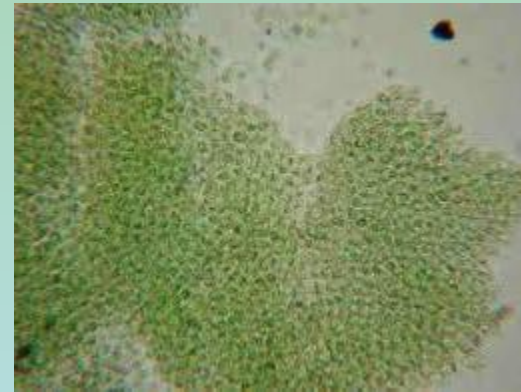
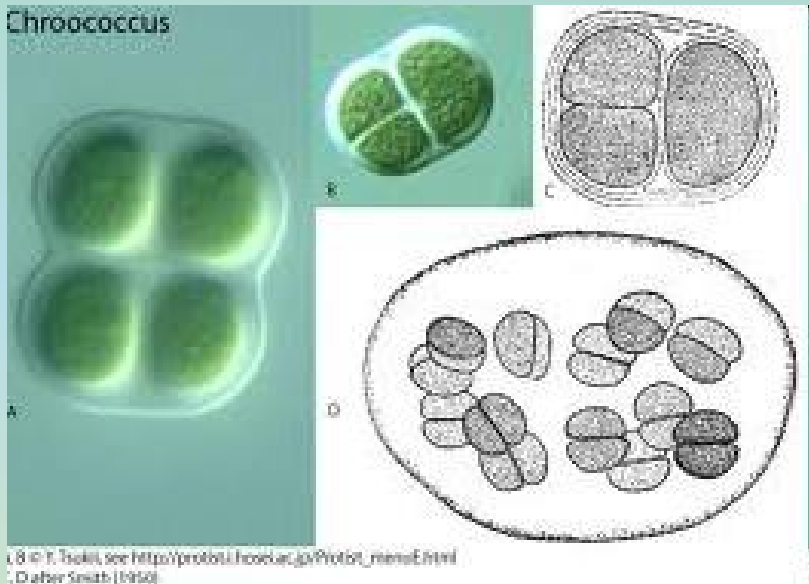
- Buněčné dělení a separace dceřinných buněk
- Vlákňité formy fragmentují (harmogonia)
- Fragmentace: kdekoli uvnitř vlákna anebo bikonkávní disky, nekridia
- Endospory: dělením protoplastu zelenomodrých sinic



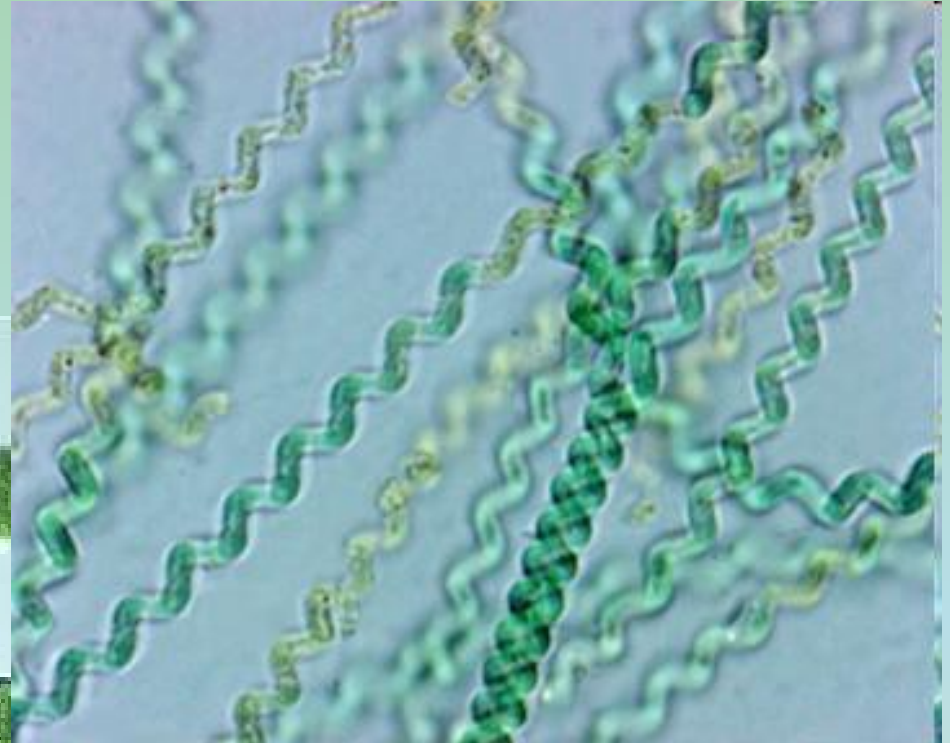
Klasifikace

- 4 skupiny podle morfologie, prezence/absence specializovaných buněk a povahy větvení

1. Order: *Chroococcales*



2. Order: *Oscillatoriales*



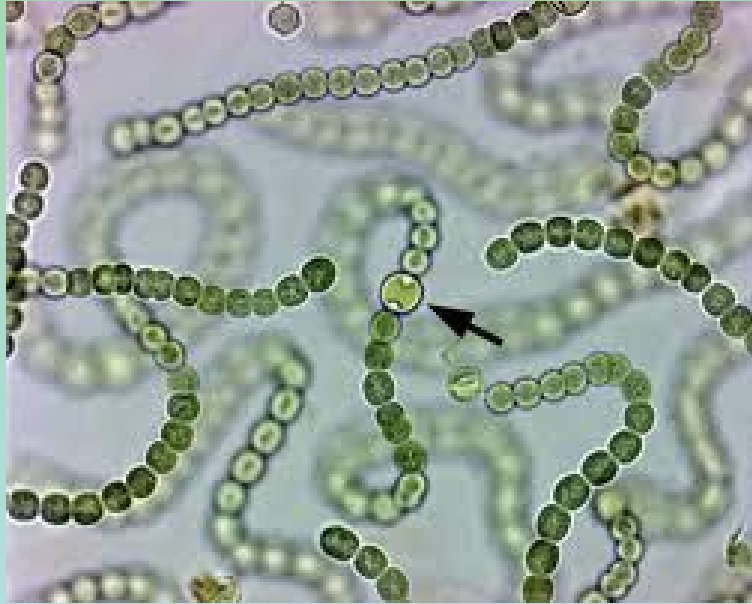
Spirulina

3. Order: *Nostocales*

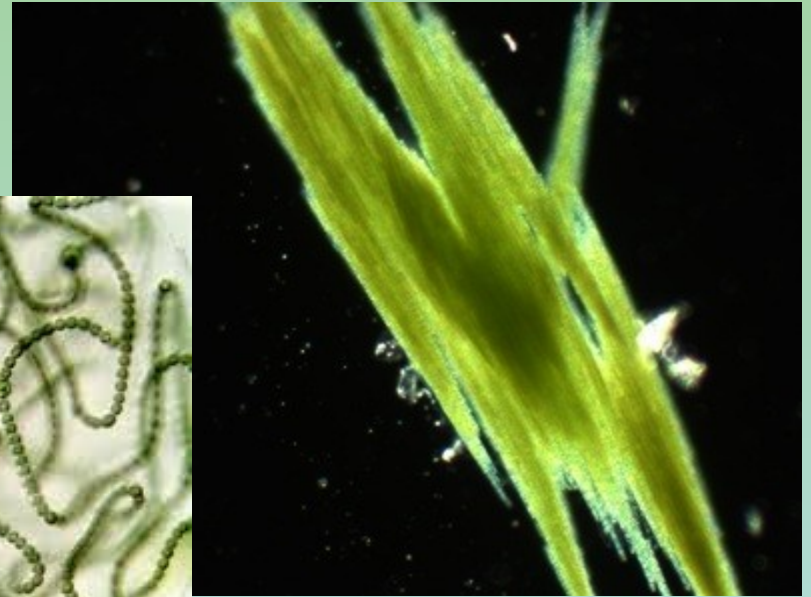


Anabaena

3. Order: *Nostocales*



Nostoc



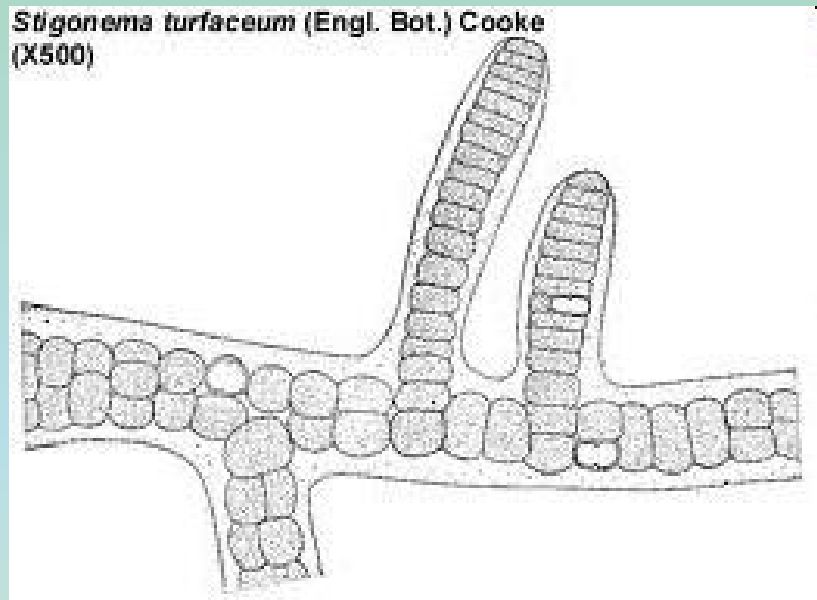
Aphanizomenon



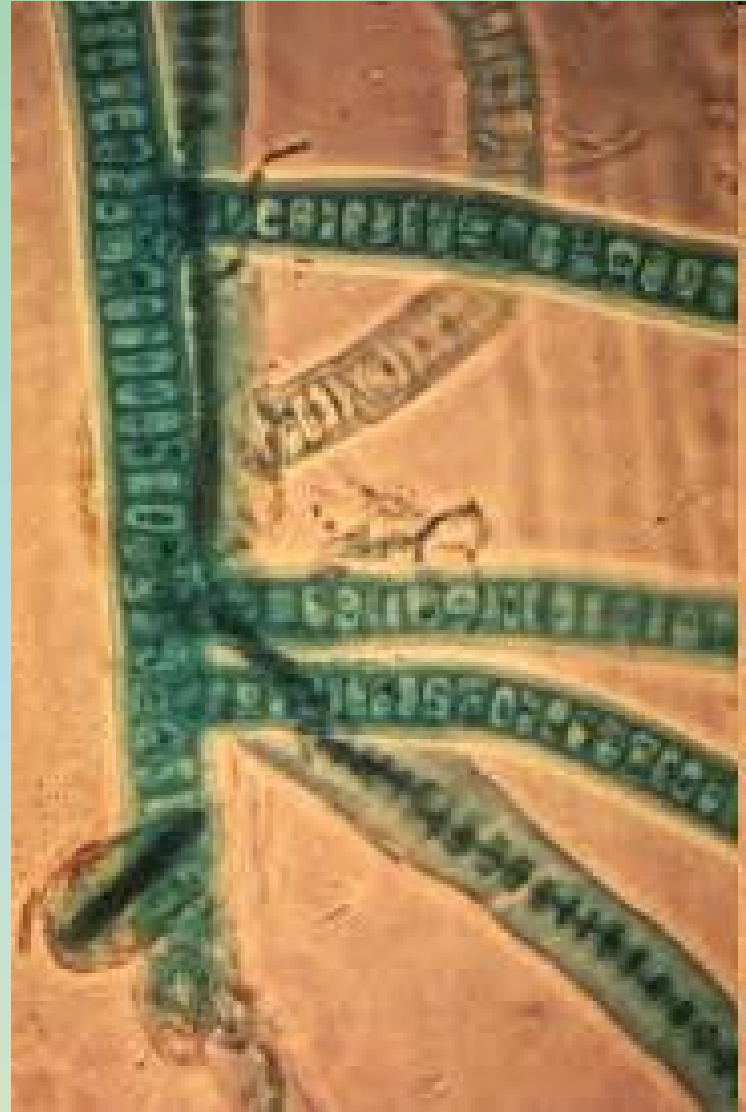
Gloeotrichia



- 4. Order: *Stigonematales*



Stigonema



Životní cykly s pravou diferenciací

A. vláknité sinice

- **Heterocysty**

- buněčná stěna je chráněna obalem s glykolipidovou a polysacharidovou vrstvou
- mikroplazmodesmata spojují obě buňky
- přesun disacharidů do heterocysty redukováný ferredoxin přenáší elektrony nitrogenáze

- **Akinety**

- klidové rezistentní stadium
- větší buňky s tlustou stěnou
- rezistence vůči vysychání a fyzikálnímu porušení
- často v řetězcích
- vegetativní buňky se přeměňují v akinety na konci exponenciální fáze

- **Vegetativní buňky**

Životní cyklus

A. vláknité sinice

- akinety klíčí a vyrůstají z nich vegetativní buňky, v řetízcích
- za nedostatku využitelného dusíku se v řetízku tvoří heterocysty – zhruba každá sedmá buňka
- po průchodu exponenciální fází se vegetativní buňky mění v akinety

Životní cykly s pravou diferenciací

B. *Pleurocapsaceae*

1. *Dermocarpa*

- **baeocyt – buňka s tlustým obalem**
- roste, zvětšuje svoji velikost až 1000x
- když dosáhne maximální velikosti, dojde k mnohonásobnému dělení uvnitř útvaru rodičovská buňka praská
- uvolňují se nové baeocyty – drobné, pohyblivé klouzavým pohybem, fototaktické
- vytvoření pochvy – přisednutí k pevnému podkladu

1. *Dermocarpella*

- asymetrické dělení ovoidního baeocytu
- větší buňka prochází mnohonásobným dělením za vzniku baeocytů, menší buňka zůstává obalena pochvou a přisedlá
- praská pouze větší buňka

Ekologie

- Chemická diverzita
- Pigment chlorofyl A (porfyrinový kruh) – absorbují světlo o určité vlnové délce; předávají elektrony
- Karotenoidy – dva 6C kruhy; nerozpustné ve vodě, proto v komplexu s membránami; předávají energii elektronů chlorofylu
- Fykobiliny – rozpustné ve vodě, proto v cytoplazmě nebo stromatu chloroplastu (pouze u sinic a rodofyt); fykokyanin (zelenomodré), fykoerytrin (růžovočervené); emitují fluorescenci – Ab značení nádorových buněk
- Rudé moře – *Oscillatoria*
- Afričtí plameňáci - *Spirulina*
- Fiface N₂ – v tlustostěnných heterocystách (anaerobní prostředí)
- Symbióza s houbami = lišejníky
- *Spirulina* – Aztékové; Orient; tropické oblasti – zdroj proteinů
- *Lyngbya* - "swimmer's itch."

Toxiny sinic

- [neurotoxiny](#),
- [dermatotoxiny](#),
- [Hepatotoxiny](#) - cyklické heptapeptidy microcystiny
- [imunotoxiny a imunomodulátory](#),
- [embryotoxiny](#),
- [paralytické toxiny](#),
- [Tumor Promoting Factors \(tyto stimulují 2. a 3. fázi kancerogeneze\)](#),
- [cytotoxiny](#),
- [prymneotoxiny](#),
- [genotoxiny a mutageny](#),
- [řasy a sinice jako alergeny](#)

hepatotoxický microcystin L-R patří mezi aktivní "tumor promoting factors", způsobuje chromozomové aberace a snižuje imunitní odezvy

dle typů molekul cyklické a lineární peptidy, alkaloidy a lipopolysacharidy

**synergické působení
různých sinicových
metabolitů**

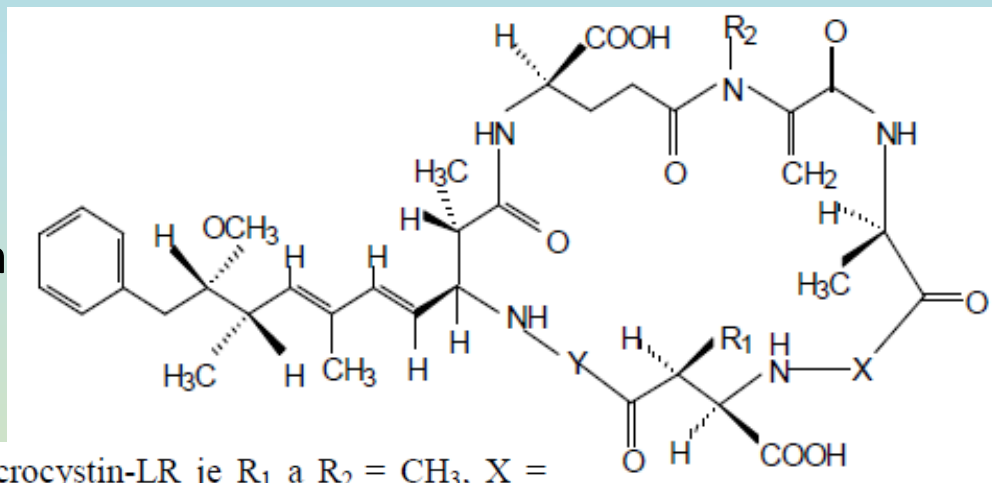
Microcystis a *Planktothrix*.

Z vláknitých sinic vodního květu patří k silně toxickým:

Anabaena flos-aquae, *A. spiroides*, *A. circinalis*,
A. lemmermannii, *Planktothrix rubescens*,
P. agardhii, dále *Gomphosphaeria* a *Anabaenopsis*

MICROCYSTINY

- izolovány ze zástupců rodů planktonních, bentických i půdních sinic rodů *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* aj.
- cyklické heptapeptidy
- cyklo - (D-alanin1-LX2-D-MeAsp3-L-Y4-Adda5-D-glutamová kyselina6-Mdha7)
 - X a Y jsou různé L-aminokyseliny,
 - MeAsp je D-erythro-β-methylasparagová kyselina
 - Adda je (2S,3S,8S,9S) - 3-amino- 9-methoxy- 2,6,8-trimethyl- 10-fenyldeka- 4,6-dienová kyselina
 - Mdha je N-methyldehydroalanin
- 60 strukturních variant (kongenerů, isoformů) s Mr 909 – 1115
- nejčastěji se liší různými AMK X a Y v pozicích 2 a 4 a
- a demethylací AMK v pozicích 3 a 7
- Odolné vůči hydrolýze a peptidázám



Obrázek 1 : Obecný vzorec microcystinů. Pro microcystin-LR je R_1 a $R_2 = \text{CH}_3$, $X = \text{Leu(L)}$, $Y = \text{Arg (R)}$

Mechanismus účinku microcystinů

- kovalentní vazba na katalytickou podjednotku proteinfosfatáz 1 a 2A
- Primárně jsou postiženy **jaaterní buňky, které aktivně přijímají microcystiny z krevního oběhu prostřednictvím** transportního systému pro žlučové kyseliny
- Za biologickou aktivitu microcystinů a také za charakteristické absorpční spektrum v UV oblasti s maximem při 238 nm je odpovědná část molekuly Adda - glutamová kyselina.
- Odštěpením Adda, změnou její optické konfigurace nebo acylací glutamátu dochází ke ztrátě biologické aktivity.
- Lineární microcystiny jsou zhruba stokrát méně toxické než odpovídající cyklické sloučeniny
- **LD50* ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) - 50-1200**
- Běžné technologie úpravy a čištění vody (sedimentace, filtrace, flokulace, chlorace) nejsou schopny účinně odstraňovat microcystiny (buňky sinic ano)

Epidemiologie mikrocystinů

- Podle epidemiologické studie realizované v Číně byla chronická expozice microcystiny v pitné vodě jedním z faktorů zvýšené incidence hepatocelulárního karcinomu v některých provinciích (Yu 1989, 1995)
- Jak ukázala australská epidemiologická studie, intenzita a četnost některých efektů pozorovaných po rekreační expozici nezávisela na obsahu známých toxinů v biomase sinic, ale souvisela s délkou koupání a koncentrací cyanobakteriálních buněk ve vodě (Pilotto et al. 1997)
- Zvláštním případem byla **intravenózní expozice microcystiny, ke které došlo u pacientů** hemodialyzního centra v brazilském Caruaru v roce 1996 a která si vyžádala více než padesát lidských životů (Jochimsen et al. 1998; Pouria et al. 1998)
 - jediný dokumentovaný případ úmrtí lidí v přímé souvislosti s cyanotoxiny
- Zvířata – více dokumentovaných otrav - nádrže nebo řeky kontaminované cyanobaktériemi pro zvířata často jediným dostupným zdrojem vody a jsou pak nucena konzumovat jí nesrovnatelně větší množství, nežli je náhodné požití lidmi při rekreaci

NODULARIN

- cyklický pentapeptid; 7 strukturních variant; *Nodularia spumigena* aj.
- Produkce: u mnoha sinic (často současně s microcystiny)
- mechanismus toxicity shodný s efekty microcystinů = inhibice regulačních enzymů proteinfosfatáz; **LD50* ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)** 50-2000

ANATOXIN

- Alkaloid; *Anabaena*, *Oscillatoria (Planktothrix)*, *Aphanizomenon* atd.
- neurotoxicita
- agonisté v nikotinových acetylcholinových receptorech
- **LD50* ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)** - 200-250

LYNGBYATOXIN

- modifikovaný cyklický dipeptid; *Lyngbya majuscula*
- dermatotoxicita, nádorově promoční aktivita
- aktivace proteinkinázy C

NEUROTOXINY

- velmi heterogenní látky (alkaloidy, organofosfátové látky, látky typu karbamátového skeletu)
- působí rozdílnými biochemickými mechanismy toxicity: inhibice acetylcholinesterázy, blokace Na⁺/K⁺ kanálů na povrchu neuronů

LIPOPOLYSACHARIDY (LPS)

- Součást VM
- Pyrogenní a toxické

Toxin	Zdroj	Skupina	LD₅₀ μg/kg při inj. i.p. myš
botulin	<i>Clostridium botulinum</i>	bakterie	0,00003
tetan	<i>Clostridium tetani</i>	bakterie	0,0001
aphanotoxin	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	sinice	10
anatoxin -A	<i>Anabaena flos-aquae</i>	sinice	20
kobra	<i>Naja naja</i>	had	20
microcystin LR	<i>Microcystis aeruginosa</i>	sinice	43
nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>	sinice	50
kurare	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	rostlina	500
strychnin	<i>Strychnos nux-vomica</i>	rostlina	2 000

Toxiny ve vodách - příčiny a důsledky

- Člověk: eutrofizace vod - **nadměrné uvolňování anorg. živin do prostředí - zejména N a P** (hnojení a domácí komunální odpad; prášky na praní anebo přípravky do myček nádobí)
- Biologicky aktivní metabolity - nebývají aktivně vylučovány a z buněk sinic se uvolňují až po jejich smrti a lyzi
- Cyanotoxiny - přibližně 50 rodů (EPA 2001); toxigenní a netoxigenní kmeny; cca 75% vodních květů je toxických (WHO 1998; Chorus et al. 2000)
 - peptidy, alkaloidy (heterocyklické látky) a lipopolysacharidy
 - lineární a cyklické peptidy, depsipeptidy (s eterovou vazbou)
- Toxiny a inhibitory důležitých enzymů
- Nebo farmakologicky zajímavé vlastnosti (např. fungicidní, tumor inhibiční, protizánětlivé, antibakteriální a antivirální)

Případy otrav spojené s cyanotoxiny v pitné vodě	
1931	USA: masivní vodní květy <i>Microcystis</i> v řekách Ohio a Potomac způsobily onemocnění 5000 – 8000 lidí (převážně gastroenteritidami) v řadě měst zásobovaných vodou z těchto řek
1960 - 1965	Zimbabwe, Harare: v části města zásobované vodou z nádrže s vodním květem <i>Microcystis</i> každoročně v době kolapsu vodního květu docházelo k rozvoji gastroenteritid u dětí. Děti ze čtvrtí s jiným zdrojem vody nebyly ovlivněny a nebyly identifikovány žádné infekční faktory.
1975	Pensylvánie, USA: akutní gastroenteritidy u 62% z 8000 lidí, konzumace vody z nádrže se sinicí <i>Schizotrix</i>
1975	USA: endotoxický šok 23 dialyzních pacientů ve Washingtonu související s rozvojem sinic ve vodárenské nádrži
1979	Austrálie: po algicidním zásahu proti vodnímu květu <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ve vodárenské nádrži na Palm Island onemocnělo přes 140 obyvatel (převážně děti) těžkými hepatoenteritidami, které si vyžádaly hospitalizaci. Symptomy byly malátnost, nechutenství, zvracení, bolesti hlavy, zvětšení jater, zácpy následované krvavými průjmy, dehydratace. Rozbory moče prokázaly poškození ledvin a rozbory krve zvýšené hladiny jaterních enzymů indikující poškození jater.
1981	Austrálie, Armidale: epidemiologická studie ukázala signifikantní změny aktivity některých jaterních enzymů (zejména gama glutamyl transferázy) v krevním séru lidí během rozvoje a následné likvidace vodního květu <i>Microcystis</i> ve vodárenské nádrži

WHO 1998

1988	Brazílie: po napuštění přehrady Itaparica v roce 1988 bylo během 42 dnů zaznamenáno na 2000 případů gastroenteritid, z nichž 88 skončilo úmrtím. Následující výzkumy potenciálních příčin této epidemie vyloučily infekční patogeny, naopak zjistily vysoké koncentrace toxických cyanobakterií (<i>Anabaena</i> a <i>Microcystis</i>) v přívodech pitné vody v postižených oblastech.
1991 - 1992	jih Austrálie: 26 případů kožních a systémových onemocnění spojených s expozicí (v některých případech konzumace) říční a dešťové vody skladované v otevřených nádržích s vodními květy <i>Anabaena</i>
1992	střední Austrálie: onemocnění „horečkou Barcoo“, nevolnosti a zvracení v souvislosti s konzumací vody obsahující hepatotoxiny
1993	Čína: podle epidemiologické studie četnost výskytu rakoviny jater souvisí mj. se zdroji pitné vody a je významně vyšší u populací používajících povrchovou vodu zamořenou sinicemi než u populací s podzemními zdroji pitné vody. Předpokládá se, že příčinnou jsou microcystiny.

1994	Švédsko, 3 vesnice poblíž Malmö: po dobu několika hodin došlo k náhodnému míchání vodárensky neupravené říční vody s pitnou vodou. V řece v té době rostla hustě sinice <i>Planktothrix agardhii</i> produkující microcystiny. 121 obyvatel (z celkových 304) onemocnělo (nevolnosti, bolesti břicha, svalů, hlavy, zvracení, průjemy, horečky). Ovlivněna byla také domácí zvířata (psi a kočky).
	Případy spojené s rekreační expozicí
1959	Kanada, Saskatchewan: navzdory úhynům dobytka a varováním před rekreačním využitím plavali lidé v jezeře zamořeném sinicemi. 13 osob onemocnělo (bolesti hlavy, nevolnost, bolesti svalů, bolestivé průjemy). V exkrementech jednoho z pacientů, který náhodně požil asi 300ml vody, byly identifikovány sinice <i>Microcystis</i> a <i>Anabaena circinalis</i> .
1980 - 1981	Pensylvánie a Nevada, USA: u více než 100 osob podráždění očí, kůže, bolest uší, symptomy „senné rýmy“, akutní gastroenteritidy aj. po plavání a vodním lyžování v jezeře s <i>Aphanizomenon</i> a <i>Anabaena</i>
1989	Anglie: po plavání a jízdě na kanoích ve vodě se silným vodním květem sinic rodu <i>Microcystis</i> trpělo 10 z 20 branců zvracením, průjemy, bolestmi břicha, otoky rtů, bolestmi v krku. U dvou z nich se rozvinul silný zápal plic (zřejmě způsobený aspirací cyanotoxinů), který si vyžádal hospitalizaci. Zdá se, že závažnost onemocnění souvisela s jejich schopnostmi plavat a s množstvím polknuté vody.

WHO 1998

1995	<p>Austrálie: epidemiologické důkazy nepříznivých zdravotních efektů po kontaktu s cyanobaktériemi při rekreaci. Studie zahrnující 852 účastníků ukázala zvýšenou frekvenci kožních vyrážek, vředů v ústech, horeček, podráždění očí, uší a kůže, průjmů, zvracení, „syndromů chřipky“ během 2 – 7 dnů po expozici při koupání. Intenzita a četnost symptomů se významně zvyšovala v závislosti na době trvání koupání a na hustotě vodního květu.</p>
<p>Intoxikace jinými expozičními cestami</p>	
1996	<p>Brazílie, Caruaru: asi 85% z cca 130 pacientů místního hemodialyzačního centra po rutinní renální dialýze trpělo poruchami zraku, nevolností, zvracením, svalovou slabostí a bolestivou hepatomegalií. U 100 z nich následně dochází akutnímu selhání jater a 56 umírá. Nejméně 44 obětí vykazovalo podobné symptomy (včetně jaterní histopatologie) jako zvířata exponovaná microcystiny v laboratorních pokusech. V krevním séru exponovaných pacientů a jaterní tkáni mrtvých byly stanoveny microcystiny. V nádrži sloužící také jako zdroj vody pro dialyzační centrum, byly poté identifikovány sinice rodu <i>Aphanizomenon</i>, <i>Oscillatoria</i> a <i>Spirulina</i>.</p>

Řada dalších účinků na složení a funkce ekosystémů

- změna chemismu vody v průběhu jejich růstu (zejm. změny pH)
- bakteriální rozklad biomasy sinic - náhlé vyčerpání kyslíku z vody
- vliv na akvatické bakterie, zooplankton, ryby a obojživelníky; vlivy na chování zvířat
- ovlivněny mohou být vodní rostliny, které jsou schopny přijímat microcystiny; některé studie ukázaly účinky microcystinů na aktivitu rostlinných detoxikačních enzymů (Pflugmacher et al. 1998; Pflugmacher et al. 1999)

Zajímavé odkazy

- <http://www.sinice.cz/index.php>
- <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/>
- <http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria>

reference

- Bellinger E.G., Sigeo D.C. (2010) Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators
- Luděk Bláha, Blahoslav Maršálek, Pavel Babica: Sinice (cyanobakterie) a jejich toxiny ve vodách - příčiny a důsledky
- CARMICHAEL WW. (1997). The Cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27: 211-226
- CHORUS I, FALCONER IR, SALAS HJ, BARTRAM J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 3: 323-347.
- EPA (2001). Meeting Summary. Creating a Cyanotoxin Target List for Unregulated Contaminant Monitoring Rule, US EPA Technical Center, Cincinnati, OH, USA
- JOCHIMSEN EM, CARMICHAEL WW, AN JS, CARDO DM, COOKSON ST, HOLMES CEM,
- ANTUNES MBD, DEMELO DA, LYRA TM, BARRETO VST, AZEVEDO S, JARVIS WR. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 338: 873-878.
- MARŠÁLEK B, BLÁHA L (2001). Dissolved microcystins in raw and treated drinking water in the Czech Republic. *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences. I. Chorus*. Berlin, Springer-Verlag: 212-217.
- MARŠÁLEK B, BLÁHA L, TURÁNEK J, NEČA J (2001). Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech republic 1993-1998. *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences. I. Chorus*. Berlin, Springer-Verlag: 56-62

reference

- PFLUGMACHER S, CODD GA, STEINBERG CEW. (1999). Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environmental Toxicology* 14: 111-115.
- PFLUGMACHER S, WIEGAND C, BEATTIE KA, CODD GA, STEINBERG CEW. (1998). Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by aquatic macrophytes. *J Appl Bot Angew Bot* 72: 228-232.
- PILOTTO LS, DOUGLAS RM, BURCH MD, CAMERON S, BEERS M, ROUCH GR, ROBINSON P, KIRK M, COWIE CT, HARDIMAN S, MOORE C, ATTEWELL RG. (1997). Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. Zealand J. Public Health* 21: 562-566.
- POURIA S, DEANDRADE A, BARBOSA J, CAVALCANTI RL, BARRETO VTS, WARD CJ, PREISER W, POON GK, NEILD GH, CODD GA. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352: 21-26.
- WHO (1998). Chapter 7: Freshwater algae and cyanobacteria. *Guidelines for Safe Recreational-water Environments, Volume 1: Coastal and Freshwaters, Draft for Consultation, World Health Organization*: 125-209.
- Yu S-Z (1989). Drinking water and primary liver cancer. *Primary liver cancer*. Z. Y. Tang, M. C. Wu and S. S. Xia. New York, China Academic Publishers: 30-37.
- Yu S-Z. (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroentrol. Hepatol.* 10: 674-682.