

Kako ločiti živo od mrtvega v svetu mikroorganizmov?

Anja Bubik

Organizmi, ki so sooblikovali ozračje in omogočili življenje, lahko sejejo tudi smrt! Cianobakterije s svojo slo po prevladi negativno vplivajo na vodne ekosisteme ter ogrožajo zdravje tako okolja kot tudi živali in ljudi. V svetu odmevajo številne zastrupitve s cianobakterijskimi toksini. Smo jim ljudje lahko kos? Na Nacionalnem inštitutu za biologijo smo razvili metodo za sledenje razpada cianobakterij, ob katerem se sproščajo številne strupene snovi.

Cianobakterije

Cianobakterije, v preteklosti poznane kot modrozelenke alge, so morfološko, fiziološko in ekološko raznolika skupina mikroorganizmov. Uvrščamo jih med najstarejše organizme našega planeta in so hkrati ena najuspešnejših življenjskih oblik, saj so v milijardah let svojega obstoja skoraj v popolnosti ohranile prvotno strukturo. Njihova vloga sega daleč v zgodovino, kjer so sooblikovale ozračje našega planeta in omogočile razvoj življenja, kot ga poznamo danes. So enen od najpomembnejših fotosintetskih organizmov. Zaradi pogostosti, visoke metabolne aktivnosti in sposobnosti prevlade lahko cianobakterije osiromašijo okolje do te mere, da ogrozijo obstoj vseh ostalih življenjskih oblik.

Veliko skrb za zdravje okolja, živali in ljudi predstavljajo biološko dejavne snovi, ki jih proizvajajo cianobakterije. Med njimi najdemo številne neobičajne, strupene ali kako drugače biološko dejavne snovi, med katerimi so **cianopeptidi** najbolj znani in raziskani ter imajo velik pomen s toksikološkega in ekotoksikološkega vidika (Sedmak in sod., 2008a, b). Zavirajo lahko delovanje številnih encimov tudi pri sesalcih (Bubik in sod., 2008). Glede na njihovo strupenost

jih lahko razvrščamo v hepatotoksine, nevrotoksine in citotoksine; poznamo pa tudi nehepatotoksične cianopeptide. Tako cianobakterije pomenijo izjemno bogat vir snovi, ki so potencialno uporabne v farmaciji, medicini, kmetijstvu in različnih tehnoloških procesih. Pogosto jih uporabljajo tudi kot orodja za razumevanje temeljnih življenjskih procesov in naravnih zakonitosti.

Cianobakterijsko cvetenje

Obremenjevanje površinskih voda in s tem povečana vsebnost hranil v vodnem telesu (eutrofikacija) lahko hitro pripelje do množičnega pojava cianobakterij, kjer se nekatere vrste tako namnožijo, da popolnoma prevladajo v vodnem telesu - temu pravimo **cvetenje**. Cvetenje cianobakterij v povezavi z eutrofikacijo površinskih voda je v zadnjih desetletjih vedno bolj pogost pojav po vsem svetu (Harper, 1992) in tudi pri nas (Sedmak in Kosi, 1997; 2002). Predvsem so skrb vzbujajoča vodna telesa v bližini črpalnišč pitne vode. V Sloveniji poznamo redna cvetenja cianobakterij, ki se pojavljajo predvsem na kmetijsko intenzivnih območjih severovzhodne Slovenije, kjer so površinske vode zelo obremenjene (Sedmak in Kosi, 1997) (slika 1A). Močno ogroženo je tudi Blejsko jezero, kjer prihaja do cvetenja strupene vrste cianobakterije *Planktothrix rubescens* (slika 1B).

Proces cianobakterijskega cvetenja je zelo podrobno opisan proces, medtem ko proces razgradnje cianobakterijskega cveta ostaja slabo raziskan. Vemo pa, da je razgradnja cveta ključni dogodek pri pojavu strupenih učinkov cianobakterijskih biološko dejavnih snovi v okolju, saj se te v trenutku razpada celic sprostijo v vodno telo. Občutljivejš



*Slika 1: Cianobakterijsko cvetenje v Podgradu (A) in na Bledu (B). Cianobakterijsko cvetenje najpogostejše zaznamo kot zgoščeno površinsko plast. Barva površinskega cveta je odvisna od vrste cianobakterij, ki prevladujejo v cvetu. V večini je gošča zelene do modrozeleno barve (A), v primeru cvetenja cianobakterije *Planktothrix rubescens* pa opazimo značilno rdečkasto barvo, ki je posledica vsebnosti specifičnih barvil (B). Cvet v Podgradu pri Gornji Radgoni smo posneli avgusta leta 2009, cvet na Blejskem jezeru pa novembra leta 2010.*

Foto: Anja Bubik.



živalske in rastlinske vrste namreč takšnih fizikalno-kemijskih sprememb okolja ne preživijo, kar vodi v siromašenje življenjskega prostora po cvetenju cianobakterij (Sedmak in Kosi, 1998).

Primeri zastrupitev

V svetu so znani številni primeri zastrupitev ljudi s cianobakterijskimi toksini. Najnevarnejši vir zastrupitve je pitna voda, saj večina biološko dejavnih snovi iz cianobakterij deluje neposredno strupeno na jetra ali možgane. Nevarnost predstavljajo tudi rekreativne vode, kjer smo cianobak-

terijam in njenim produktom izpostavljeni preko aerosolov in kože. Do zastrupitev lahko pride tudi pri dializi. Mesto Caruaru v Braziliji je leta 1996 prizadela huda zastrupi-

tev s cianobakterijskimi toksini zastrupljeno vodo, ki so jo uporabili za bolnišnično dializo. Močnih zastrupitev so zabeležili 115, od tega je bilo kasneje kar 60 smrtnih žrtev (Pouria in sod., 1997). Zaenkrat primerov zastrupitev ljudi s cianobakterijskimi toksini v Sloveniji še ne poznamo, mogoče pa je opaziti dogodke, kot so pomori rib in zmanjšana biološka raznolikost, ki kažejo na negativni vpliv pogostih cvetenj na ekološke skupnosti tudi pri nas. In kaj pravi zakonodaja? V Braziliji so leta 2000 na podlagi vse hujših zastrupitev uvedli stro-

go zakonodajo, ki narekuje obvezno spremljanje cianobakterij in cianobakterijskih toksinov pri nadzoru pitne vode. Svetovna zdravstvena organizacija priporoča različne varnostne ukrepe, ki obsegajo spremljanje in nadzorovanje cianobakterijskih cvetenj. Pomemben ukrep je tudi krepitev javne zavesti in obveščanje širše javnosti (WHO 2003). Nekatere evropske države predpisujejo podobno zakonodajo, ki se nanaša na kakovost kopalnih voda. V bližnji prihodnosti bo sprejeta še zakonodaja Evropske unije, ki bo narekovala smernice tudi v Sloveniji. Posebno pozornost moramo nameniti preprečevanju fitoplanktonskih cvetenj, ki mora temeljiti predvsem na zmanjševanju in preprečitvi evτροφikacije voda, saj imajo nekateri drugi ukrepi mnogokrat ekološko škodljive stranske učinke. Evropska direktiva 2000/60/EC, ki vzpostavlja okvir za delovanje skupnosti na področju upravljanja z vodami, predvideva nadzor in zaščito vseh vodnih virov in vzpostavitev »dobrega stanja« v petnajstih letih. Vse več primerov zastrupitev namreč opozarja, da je treba v skrbi za ohranjanje zdravja ljudi in okolja vodne vire zaščititi ter omogočiti in zagotoviti strokovno spremljanje stanja vodnih teles s stališča fitoplanktonskih cvetenj in pojavljanja toksinov v njih ter obveščanje javnosti.

Znanost v ta namen razvija številne tehnologije in metodologije, ki bi preprečevale cvetenja cianobakterij. V preteklosti so v vodnih sistemih, ki se ne iztekajo oziroma mešajo z ostalimi vodami ter ne vsebujejo rastlin in živali, na katere lahko deluje strupeno, pogosto uporabljali bakrov sulfat (CuSO_4). Postopek je temeljil na enakomernem »posipavanju« bakrovega sulfata po vodni površini, učinkovitost postopka pa naj bi bila zagotovljena približno tri tedne. Posledica prisotnosti bakrovega sulfata je razpad cianobakterijskega površinskega cveta ali gošče, vendar se pri tem sproščajo vse toksične ali kako drugače biološko dejavne snovi. Iz vidika toksičnega potenciala

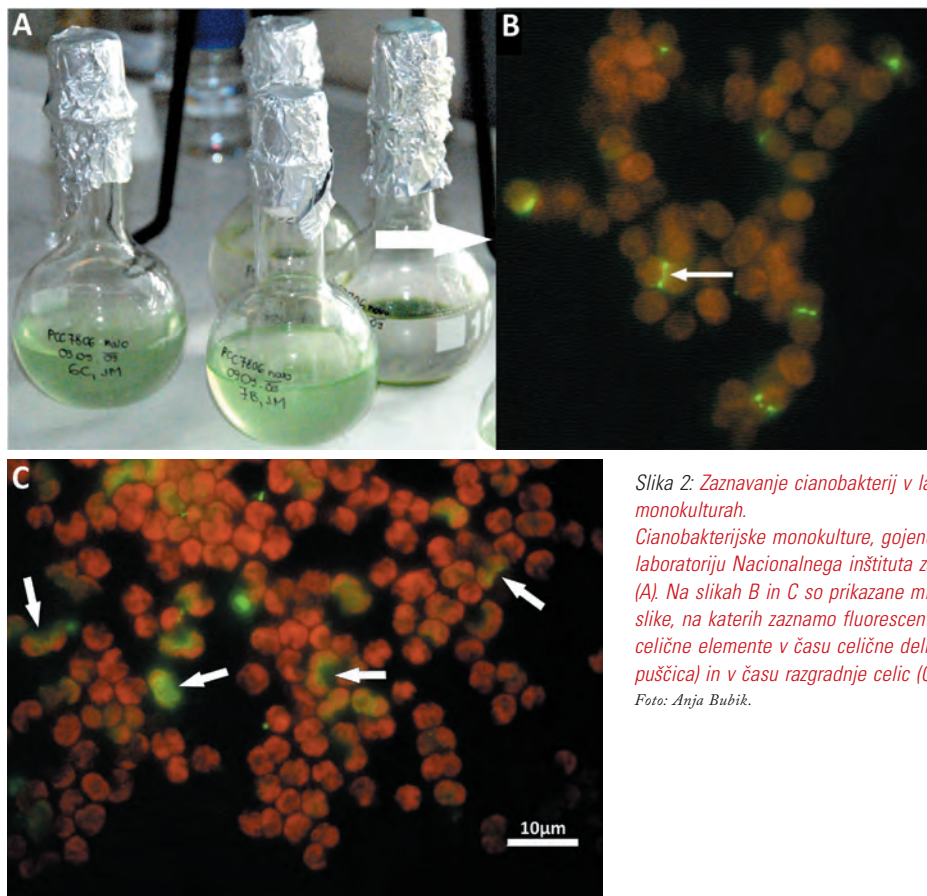
sproščenih snovi v okolje je ta način slaba rešitev za preprečevanje negativnih učinkov cianobakterij v površinskih vodah. V zadnjih letih so v porastu tudi druge rešitve; predvsem tehnologije, ki temeljijo na povečevanju pretočnosti vodnega telesa, urejanje kanalizacije ter omejevanje kmetovanja in čezmernega hranjenja (ob)vodnih organizmov.

Spremljanje cianobakterijske populacije je torej zelo pomembna dejavnost, zato se ekotoksikološke raziskave usmerjajo tudi v razvoj novih alternativnih metod, ki bi olajšale in dopolnile spremljanje stanja cianobakterij in na podlagi tega omogočile sklepanje o nevarnosti za okolje.

Nove raziskave

Na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani smo pred leti predpostavili mehanizem hitre razgradnje cianobakterijskega cveta, ki vključuje sprožitev razgradnje z virusi okuženih cianobakterij, ki proizvajajo ciklične ciano-peptide (Sedmak in sod., 2008a). Raziskave smo nato usmerili še v razvoj novih uporabnih metod, ki bi omogočale spremljanje razpada oziroma razgradnje cveta. Ob razgradnji cianobakterijskega cveta se namreč v okolje sproščajo snovi, ki imajo velik ekotoksikološki učinek, saj lahko ne samo izzovejo propad cianobakterijskih cvetov, ampak tudi toksično, genotoksično in rakotvorno vplivajo še na ostale vodne organizme ter na zdravje celotnega ekosistema in ljudi. Raziskava mehanizma razgradnje in spremljanje tega procesa na naravnih tarčah nam lahko omogoči razumevanje okoljskih učinkov cianobakterij in posledično sklepanje na njihove učinke na različne organizme, tudi človeka.

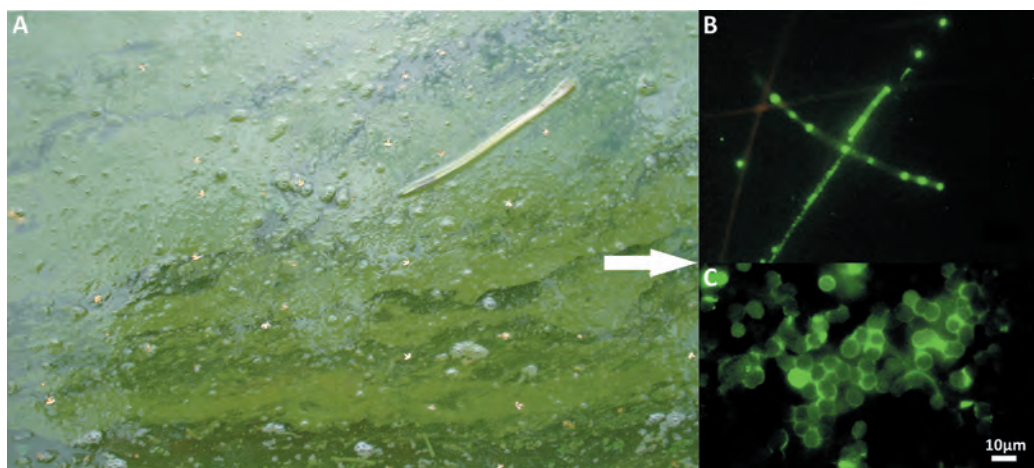
V ta namen smo razvili metodo, ki omogoča uspešno zaznavanje cianobakterijskega celičnega ogrodja in s tem spremljanje cianobakterijske populacije v različnih vzorcih, od laboratorijskih monokultur (slika 2)



Slika 2: Zaznavanje cianobakterij v laboratorijskih monokulturah.

Cianobakterijske monokulture, gojene v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo (A). Na slikah B in C so prikazane mikroskopske slike, na katerih zaznamo fluorescentno označene celične elemente v času celične delitve (B, puščica) in v času razgradnje celic (C, puščice).

Foto: Anja Bubik.



Slika 3: Zaznavanje cianobakterij v kompleksnih okoljskih vzorcih.

Cianobakterijski površinski cvet (A) in njegove mikroskopske slike (B, C). V okolju velikokrat zasledimo kompleksne vzorce - cvet sestavljajo različne vrste cianobakterij in v vseh vrstah lahko opazimo fluorescentno označene celične elemente (B, C; zeleno), ki nam omogočajo spremljanje fitoplanktonske populacije. Foto: Anja Bubik.

do kompleksnih okoljskih vzorcev (slika 3). Metodologija temelji na fluorescentnem označevanju izbranih strukturnih elementov cianobakterij. Naše raziskave so pokazale, da se zelene strukture bolje obarvajo in jih lažje zaznamo pod mikroskopom, če so celice poškodovane ali že v fazi razpada (Sedmak in sod., 2009). Posledično nam metoda omogoča zaznavanje razpada cveta, ki je lahko spontan ali umetno izzvan proces. Metoda se je pokazala za učinkovito pri spremljanju obeh, naravno (slika 4) in umetno (slika 5) povzročenega razpada cianobakterijskih celic.

Z vidika dolgoročnega spremljanja cvetenj in stanja površinskih voda lahko trdimo, da je naša metoda zelo uporabno, enostavno, ponovljivo in obetavno orodje za:

- ločevanje med živimi, poškodovanimi in mrtvimi celicami fitoplanktona,
- sledenje uspešnosti sanacijskih programov,
- spremljanje naravnega ali umetnega razpada cianobakterijskega cveta,
- preučevanje vpliva antropogenih in naravnih hranil na populacijo vodnega telesa,
- spremljanje, sledenje fitoplanktonskih vrst,

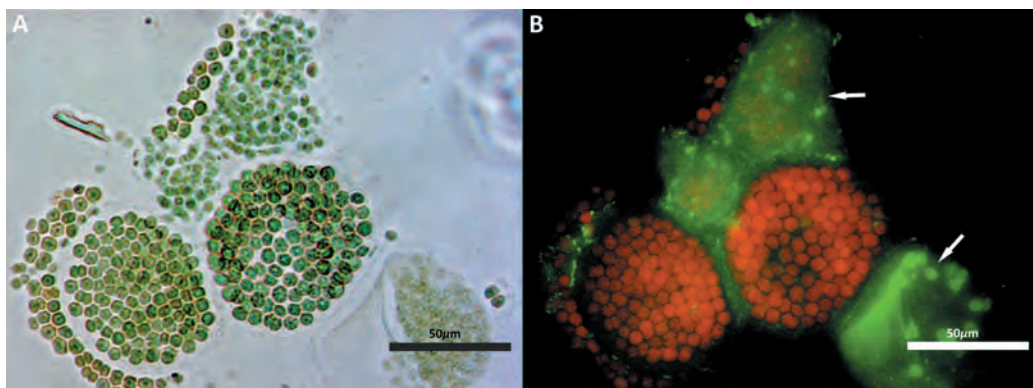
- zaznavanje cianobakterij, zelenih alg in diatomej.

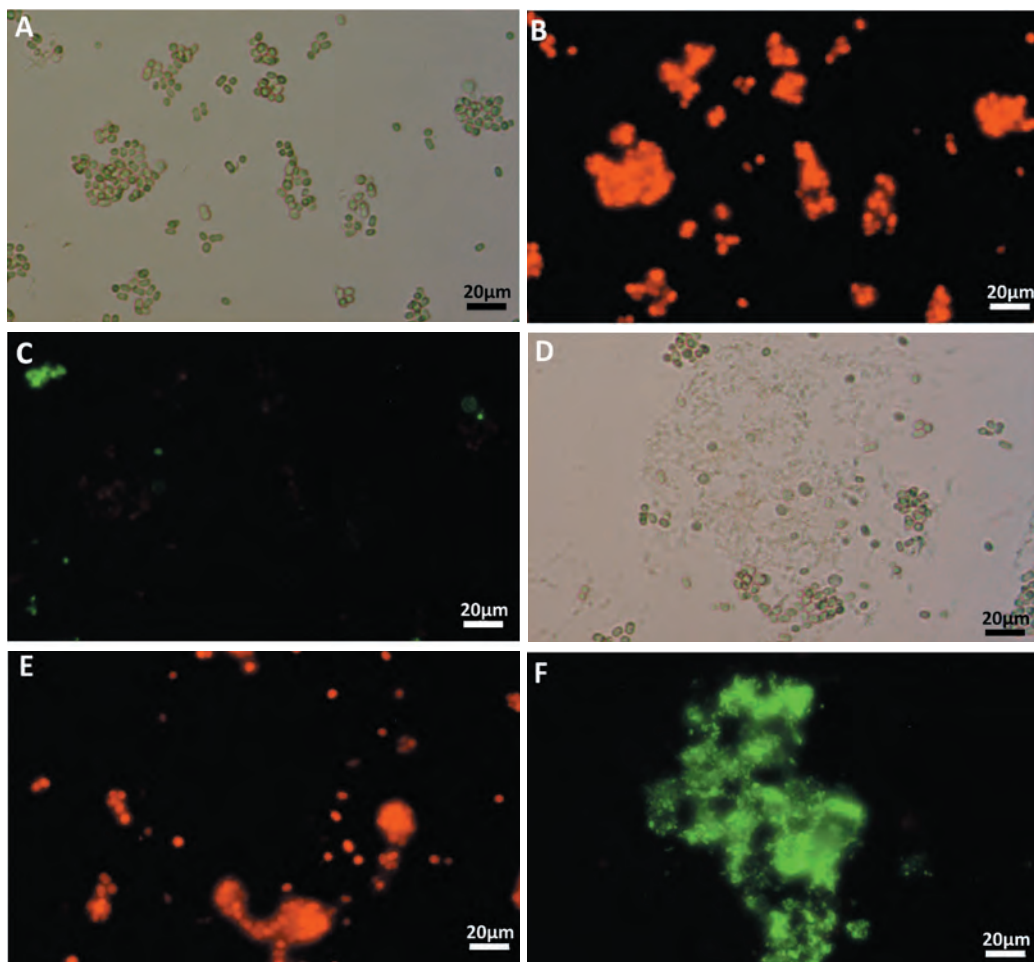
Zaključek

Razvoj nove uporabne metode omogoča opazovanje cianobakterijskih celičnih elementov, kar nam posredno omogoča spremljanje cianobakterijske populacije ter boljši vpogled v osnovne celične procese. Prav tako nam nov postopek ponuja novo alternativno metodologijo za spremljanje izpostavljenosti okolja in ljudi različnim cianopeptidom ali drugim okoljskim dejavnikom.

S poskusi želimo prispevati tudi k odkrivanju pomena in učinkovanja cianobakterijskih produktov v naravnem okolju ter k hitrejšemu razvoju novih ekotoksikoloških metod in novih molekularnih tarč, kar je zelo pomembno za zdravje ljudi. Rezultati naših raziskav kažejo tudi, da so cianobakterijski produkti dobra orodja pri raziskavah procesov v naravi. Pridobljeni podatki so ekotoksikološko zelo uporabni, saj so ključni za ocenjevanje tveganja ter uvedbo ustreznih zaščitnih ukrepov pri izpostavljenosti okolja, živali in ljudi tem snovem.

Slika 4: Spremljanje naravne cianobakterijske razgradnje. Cianobakterije iz naravnega vzorca. Slika A prikazuje celice pod svetlobnim mikroskopom, kjer opazimo razpad posameznih celic. Razpadle, poškodovane, mrtve celice lahko z našo metodo bolje zaznamo in dobro spremljamo pod fluorescentnim mikroskopom (B, zeleno, puščice). Foto: Anja Bubik.





Slika 5: Spremljanje cianobakterijske razgradnje, sprožene z bakrovim sulfatom (CuSO_4).

Cianobakterijske celice, posnete pod svetlobnim (A, D) in fluorescentnim mikroskopom (B, C, E, F). V prvi vrstici so prikazane celice, ki niso bile izpostavljene nobenim dejavnikom in so žive, nepoškodovane (A). Cianobakterijske fotosintetske pigmente lahko opazimo s pomočjo avtofluorescence (B), medtem ko celičnega ogrodja pri nepoškodovanih celicah skoraj ne zaznamo (C). V drugi vrstici so celice, ki smo jih izpostavili bakrovemu sulfatu. Vidimo, da je veliko celic razpadlo in so poškodovane (D). V takšnem primeru postanejo znotrajcelični elementi dostopni za barvila in s fluorescenco lahko uspešno zaznamo razpad celic (F). V primeru razpada celic ne opazimo več avtofluorescence fotosintetskih barvil (E). Foto: Anja Bubik.

Slovarček:

Citotoksin. Toksin, ki učinkuje strupeno na celice.

Ekosistem. Ekološki sistem, ki vključuje vse žive organizme in okolje na določenem območju ter deluje skupaj kot enota.

Evtrofikacija. Proces povečanja hranilnih snovi v vodnem telesu, predvsem nitratov in fosfatov.

Fitoplankton. Mikroskopski organizmi s fotosinteznimi barvili, ki lebdi v vodnem telesu ter v njem živijo in se razmnožujejo.

Fluorescenca. Oddajanje svetlobe snovi, ki je absorbirala svetlobo ali kakšno drugo elektromagnetno valovanje.

Genotoksično. Strupeno za dedni material.

Hepatotoksin. Toksin, ki učinkuje strupeno na jetra.

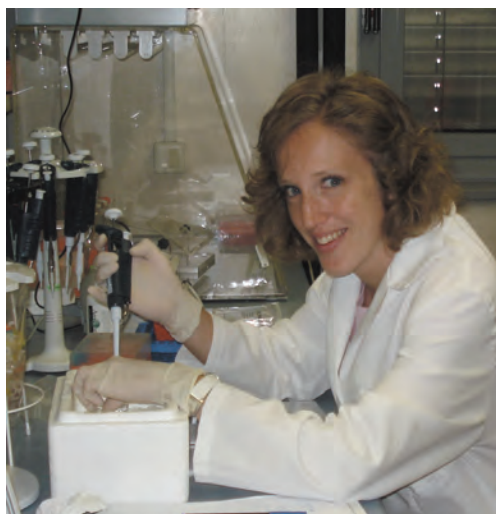
Monokultura. Kultura (skupnost) celic iste vrste in istega rodu.

Monitoring površinskih voda. Spremljanje, oblika nadzora oziroma preverjanja, ali površinske vode izpolnjujejo vse zahteve v skladu s pravilniki in zakonodajo.

Nevrotoksin. Toksin, ki deluje strupeno na živčni sistem.

Toksično. Strupeno.

Toksin. Strupena snov, ki moti normalno delovanje celic; lahko povzroči tudi smrt celic ali organizmov.



Anja Bubik, univerzitetna diplomirana biokemičarka, je na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka zaposlena kot mlada raziskovalka od leta 2008. Pod mentorstvom dr. Bojana Sedmaka se ukvarja s področjem ekotoksikologije, natančneje s preučevanjem izbranih ekoloških, bioloških in biokemijskih učinkov ne-hepatotoksičnih cikličnih peptidov iz cianobakterij. V skupini razvijajo nove metodologije za spremljanje cianobakterij in preučujejo vpliv cianobakterijskih peptidov na proizvodnje same ter na človeške celice in vitro.

Literatura:

Bubik, A., Sedmak, B., Novinec, Lenarčič, B., Lah, T. T., 2008: *Cytotoxic and peptidase inhibitory activities of selected non-hepatotoxic cyclic peptides from cyanobacteria. Biological Chemistry*, 389 (10): 1339-1346.

Harper, D., 1992: *Eutrophication of freshwaters. First edition. London: Chapman & Hall. Str. 326.*

Pouria, S., Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J. Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H., Codd, G. A., 1998: *Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. The Lancet*, 352: 21-26.

Sedmak, B., Kosi, G., 1997: *Microcystins in Slovene freshwaters (Central Europe)-First report. Natural Toxins*, 5: 64-73.

Sedmak, B., in Kosi, G., 1998: *The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. Journal of Plankton Research*, 20: 691-708; Erratum, 20: 1421.

Sedmak, B., Kosi, G., 2002: *Harmful cyanobacterial blooms in Slovenia – bloom types and microcystin producers. Acta Biologica Slovenica*, 45: 17-30.

Sedmak, B., Carmeli, S. in Eleršek, T., 2008a: *"Non-toxic" cyclic peptides induce lysis of cyanobacteria – an effective cell population density control mechanism in cyanobacterial blooms. Microbial Ecology*, 56: 201-209.

Sedmak, B., Eleršek, T., Grach - Pogrebinsky, O., Carmeli, S., Sever, N., Lah, T. T., 2008b: *Ecotoxicologically relevant cyclic peptides from cyanobacterial bloom (Planktothrix rubescens) – a threat to human and environmental health. Radiology Oncology*, 42(2): 102-113.

Sedmak, B., Carmeli, S., Pompe - Novak, M., Tušek - Žnidarič, M., Grach - Pogrebinsky, O., Eleršek, T., Žužek M. C., Bubik, A., Frangež, R., 2009: *Cyanobacterial cytoskeleton immunostaining: the detection of cyanobacterial cell lysis induced by planktopeptin BL1125. Journal of Plankton Research*, 31(11): 1321-1330.

WHO, 2003: *Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva. Str. 219.*