

AUTOREFERAT

Dariusz Dziga, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin,
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytet Jagielloński

1. Nazwisko i Imię: Dariusz Dziga

2. Przebieg edukacji i zatrudnienia:

Obecne stanowisko - Adiunkt w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, UJ
Ph.D. 2001. doktor nauk biologicznych, specjalność biochemia, Instytut Biologii
Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, promotor: Prof. Anna M. Kordowiak

MSc 1997. Magister biologii, specjalność biologia molekularna, Instytut Biologii
Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński

1989-1992 Liceum Ogólnokształcące w Tuchowie

3. Podsumowanie dorobku naukowego (szczegóły w załączonej liście publikacji oraz wykazie osiągnięć):

(i) 23 publikacje oryginalne i 1 praca przeglądowa w czasopismach naukowych z listy ISI Web of Science;

(ii) 2 recenzowane publikacje w innych czasopismach naukowych;

(iii) 29 abstraktów z międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych;

(iv) współautorstwo 3 rozdziałów (w tym pierwszy autor rozdziału Biological treatment for the destruction of cyanotoxins) w monografii *Water Treatment for Purification from Cyanobacteria and Cyanotoxins*, Eds: M. Antoniou, A. Hiskia, D. D. Dionysiou. John Wiley & Sons Inc; ISBN-10: 111892861X; na etapie przygotowania do druku.

(v) sumaryczny 5-letni Impact Factor dla publikacji z listy ISI Web of Science: 57,012;

(vi) sumaryczny 5-letni Impact Factor dla publikacji wchodzących w skład jednotematycznego cyklu proponowanego do wszczęcia postępowania habilitacyjnego: 19,222;

(vii) łączna liczba cytowań wg bazy Web of Science (stan z 4 maja 2016): 270;

(viii) indeks Hirscha wg bazy Web of Science (stan z 4 maja 2016): 9;

(ix) kierowanie 5 krajowymi i międzynarodowymi projektami badawczymi (finansowane przez KBN, NCN, CIMO) oraz 2 projektami uczelnianymi, ponadto udział w 2 innych projektach;

(x) recenzowanie manuskryptów dla 10 międzynarodowych czasopism naukowych;

4. Osiągnięcie naukowe proponowane jako podstawa do wszczęcia postępowania habilitacyjnego, zgodnie z art. 16 Ustawy:

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod łącznym tytułem "Mikrobiologiczna degradacja toksyn sinicowych mikrocystyn", obejmujący 6 publikacji, zestawionych poniżej wraz z Impact Factor czasopism za ostatnie 5 lat, liczbą cytowań i procentowym udziałem.

Załącznik 1

1. (A) S.M.K. Nybom, D. Dziga, J.E. Heikkilä, T.P.J. Kull, S.J. Salminen, J.A.O. Meriluoto. Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria. *Toxicon*, 2012: 59171–181. cytowań: 12, IF = 2.708

udział: 40%, w tym sformułowanie idei badań, zaplanowanie i wykonanie analiz aktywności enzymów proteolitycznych; analiza danych, interpretacja wyników, napisanie większej części pracy

2. (B) D. Dziga, B. Władyka, G. Zielińska, J. Meriluoto, M. Wasylewski. Heterologous expression and characterisation of microcystinase. *Toxicon*, 2012: 59, 578-586 cytowań: 8, IF = 2.708

udział: 60%, w tym sformułowanie idei badań, zaplanowanie i wykonanie testów aktywności MlrA, testów toksyczności cyklicznej i acyklicznej mikrocytyny, analiz produktów degradacji metodą MSⁿ; analiza danych, interpretacja wyników, napisanie większej części pracy

3. (C) D. Dziga, M. Wasylewski, A. Szetela, O. Bocheńska, B. Władyka. Verification of the Role of MlrC in Microcystin Biodegradation by Studies Using a Heterologously Expressed Enzyme. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25: 1192-1194, cytowań: 5, IF = 3.620,

udział: 70%, w tym sformułowanie idei badań, zaplanowanie i wykonanie testów aktywności MlrC, kierowanie testami MSⁿ, wykonanie testów toksyczności Adda; analiza danych, interpretacja wyników, napisanie całości pracy

4. (D) Dziga, D., M. Wasylewski, B. Władyka, S. Nybom, J. Meriluoto. Microbial degradation of microcystins. *Chemical Research in Toxicology*, 2013, 26 (6): 841-852. Cytowań 12, IF = 3.620

udział: 60%, w tym zaplanowanie schematu pracy przeglądowej, napisanie całości wstępu i zakończenia, całości rozdziałów 3, 5, 7, 8, współudział w pisaniu części 2, 4, 9, wykonanie Rys. 1, Tabeli 1 oraz Schematu 2.

5. (E) D. Dziga, M. Lisznianska, B. Władyka. Bioreactor study employing bacteria with enhanced activity toward cyanobacterial toxins microcystins. *Toxins*, 2014, 6 (8): 2379-92. Cytowań: 1, IF = 3.283

udział: 70%, w tym sformułowanie idei badań, zaplanowanie i kierowanie pracą oraz wykonywanie części eksperymentów; analiza danych, interpretacja wyników, napisanie całości pracy

6. (F) D. Dziga, G. Zielinska, B. Władyka, O. Bochenska, A. Maksylewicz, W. Strzałka, J. Meriluoto. Characterization of enzymatic activity of MlrB and MlrC proteins involved in bacterial degradation of cyanotoxins microcystins. *Toxins*, 2016, 8,76. Cytowań: 0, IF = 3.283

udział: 60%, w tym sformułowanie idei badań, zaplanowanie i kierowanie pracą oraz wykonywanie części eksperymentów; analiza danych, interpretacja wyników, napisanie większości pracy

5. Opis osiągnięć w działalności naukowej

5.1. Osiągnięcia naukowe proponowane jako podstawa do wszczęcia postępowania habilitacyjnego

Wprowadzenie

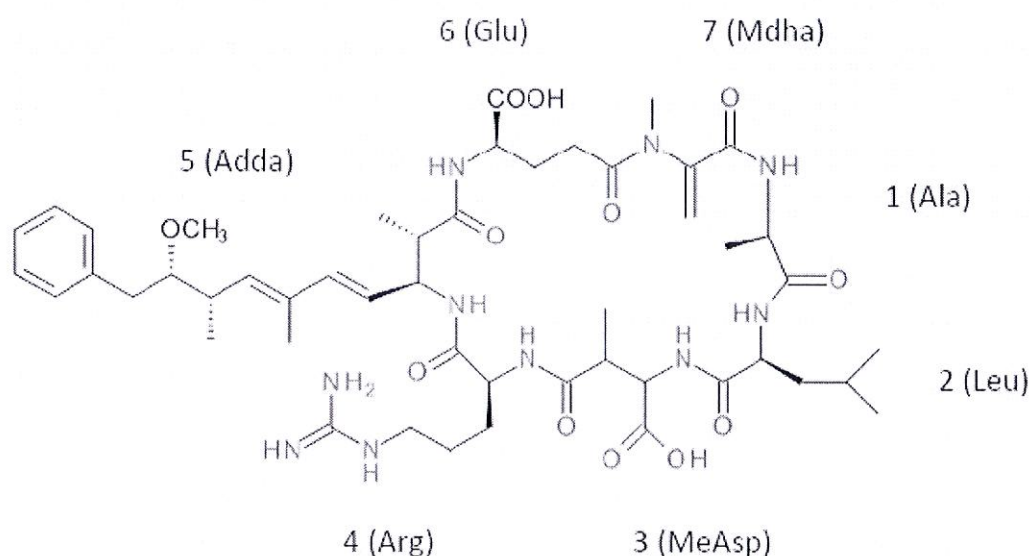
Wzrastająca eutrofizacja wód śródlądowych i morskich skutkuje coraz powszechniejszym występowaniem toksycznych zakwitów sinic i w konsekwencji wysokim stężeniem różnych toksycznych metabolitów wtórnych. W zbiornikach słodkowodnych najczęściej notowane są hepatotoksyczne mikrocystyny (MCs, Rys. 1) produkowane przez szczepy drobnoustrojów takie jak *Microcystis aeruginosa*. Mikrocystyny to wyjątkowo stabilne cykliczne peptydy, które stanowią istotny problem dla zdrowia publicznego. Przyjęcie przez konsumenta znaczącej dawki toksyn powoduje drastyczne uszkodzenie wątroby, z kolei nawet śladowe, ale chroniczne przyjmowanie toksyn w wyniku spożywania zanieczyszczonej wody może skutkować rozwojem nowotworu wątroby (Svircev et al., 2009). Z tego powodu Światowa Organizacja Zdrowia rekomenduje normy dopuszczalnego stężenia MCs w wodzie pitnej na poziomie $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Chorus i Bertram, 1999). Konwencjonalne metody oczyszczania wody nie zawsze są skuteczne w eliminacji toksyn sinicowych, ponadto ich akumulacja w organizmach wodnych stwarza dodatkowe ryzyko transferu do organizmu człowieka poprzez spożywanie zanieczyszczonego pokarmu (Kankaanpaa, 2005). Z tego powodu ochrona przed toksynami sinicowymi nie może się ograniczać jedynie do fizycznych czy chemicznych metod uzdatniania wody pitnej. Proponowanych jest wiele nowatorskich sposobów usuwania MCs z wody. Przykładem niezwykle efektywnego procesu jest adsorpcja przy użyciu syntetycznych polimerów (Bialczyk et al., 2014) czy też połączenie procesów adsorpcji i fotooksydacji MCs (Długosz et al., 2015). Alternatywą mogą być także systemy oparte na biologicznej degradacji.

Stężenie toksyn sinicowych w naturalnym środowisku jest funkcją wielu różnych czynników, włączając spontaniczny rozpad, adsorpcję na powierzchni naturalnych cząsteczek, bioakumulację oraz biodegradację. Wiele bakterii ma zdolność do utylizacji toksycznych metabolitów wtórnych sinic wykorzystując je jako dodatkowe źródło organicznych związków. Obiecującą grupą bakterii aktywnych wobec toksyn sinicowych są szczepy z rodzaju *Shingomonas*, zdolne do hydrolizy różnych wariantów MCs. W przełomowej pracy grupy Bourne'a (1996) zaproponowano trzystopniowy model rozkładu MCs rozpoczynający się od linearyzacji cyklicznej cząsteczki. Został także scharakteryzowany klastery zawierający geny kodujące białka uczestniczące w utylizacji MCs (Bourne et al., 2001). W obrębie jego

Załącznik 1

sekwencji zidentyfikowano 4 geny (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC* i *mlrD*), z których trzy pierwsze kodują enzymy hydrolizujące MCs, a czwarty białko transportujące liniową formę z przestrzeni periplazmatycznej do wnętrza komórki. Do tej pory zidentyfikowano kilkanaście szczepów posiadających klaster *mlr* (Dziga et al., 2013) oraz kilka innych grup bakterii posiadających zdolność do rozkładu MCs, ale prawdopodobnie wykorzystujących odmienne ścieżki metaboliczne (m.in. Lemes et al., 2008; Manage et al., 2009; Yang et al., 2014). Zaproponowano także kilka pilotowych bioreaktorów z immobilizowanymi komórkami bakterii z rodzaju *Sphingomonas* (Bourne et al., 2006; Tsuji et al., 2006; Ho et al., 2006), które mogłyby stanowić alternatywny, niedrogi system ochrony przed zanieczyszczeniami pochodzenia sinicowego. Dodatkowym, niezwykle ważnym aspektem badań nad biodegradacją MCs jest analiza i monitoring mikroorganizmów pod kątem ich zdolności do degradacji toksyn sinicowych obecnych zarówno w zbiornikach rekreacyjnych i wody pitnej, a także w istniejących systemach uzdatniania wody (Li et al. 2012; Shimizu et al. 2013; Ho et al., 2012).

Rys. 1. Struktura MC-LR z tradycyjną numeracją aminokwasów.



Przedmiotem prac naukowych autora, prowadzonych w ciągu kilku ostatnich lat i stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, były szeroko zakrojone i wielokierunkowe badania dotyczące zjawiska mikrobiologicznej degradacji toksyn sinicowych, które można zwięźle zawrzeć w następujących punktach:

Załącznik 1

1. Ekspresja rekombinowanych enzymów bakteryjnych odpowiedzialnych za biodegradację mikrocytyn.
2. Charakterystyka molekularna i biochemiczna pozyskanych białek.
3. Identyfikacja nowych produktów bakteryjnej degradacji mikrocytyn.
4. Korekta i modyfikacja częściowo poznanych szlaków biochemicznych rozkładu MCs przez bakterie posiadające klaster *mlr*.
5. Zaproponowanie nowych mechanizmów biodegradacji mikrocytyn przy udziale bakterii probiotycznych.
6. Testowanie działania bioreaktorów wykorzystujących genetycznie zmodyfikowane szczepy bakteryjne zdolne do efektywnej utylizacji mikrocytyn.

Charakterystyka molekularna białek Mlr.

Pomimo detekcji wielu szczepów o dobrze udokumentowanej zdolności do biodegradacji MCs (praca przeglądowa Dziga et al., 2013, **publ. D**) do niedawna wiedza na temat genetycznych i biochemicznych aspektów tych procesów była bardzo ograniczona. Większość badań była skoncentrowana na izolacji nowych szczepów bakteryjnych z różnorodnych środowisk i ewentualnie pobieżnej charakterystyce procesu degradacji, co sprowadza się najczęściej do próby detekcji homologów *mlrA* oraz podstawowego produktu degradacji, czyli liniowej formy MCs. Szczep *Sphingomonas* ACM-3962 jest pierwszym wyizolowanym szczepem bakteryjnym o dobrze udokumentowanej zdolności do biodegradacji MCs. Ponadto, ten właśnie szczep został wstępnie scharakteryzowany na poziomie molekularnym. Z tego powodu został on wybrany jako modelowy przykład bakterii degradujących MCs. Wcześniejsze prace pozwoliły wykazać, że zdolność bakterii do degradacji MCs jest zazwyczaj warunkowana obecnością klastera *mlr*. Pomimo wstępnej charakterystyki genów kodujących białka uczestniczące w biodegradacji mikrocytyn dokonanej przez D. Bourne'a (1996 i 2001) wiele szczegółów na poziomie molekularnym pozostawało niewyjaśnionych. Podczas prac autora nad rekombinowanym białkiem MlrA sekwencja *mlrA* została poddana weryfikacji i korekcie (**publ. B**). W skorygowanej otwartej ramce odczytu dodano dwie zasady (CC) po 85 nukleotydzie, z kolei po 232 nukleotydzie 2 zasady zostały usunięte. Ten zabieg spowodował przesunięcie ramki odczytu sekwencji białka pomiędzy 29 (Asp na Ala) a 78 (Pro na Ala) aminokwasem. Metka His(6)-tag została zaprojektowana na końcu C, ponieważ wcześniejsze badania sugerowały (Bourne et al., 2001), że MlrA może posiadać 26 aminokwasowy peptyd sygnałny kierujący białko do przestrzeni periplazmatycznej. Na podstawie detekcji białka metodą Western blot wykazano,

Załącznik 1

że rekombinowane MlrA, miało niespodziewanie masę 28 kDa zamiast 37 kDa, jak to wynika z sekwencji, co było prawdopodobnie spowodowane potranslacyjnym odcięciem części łańcucha białkowego od N-końca będącego wynikiem aktywności endogennych proteaz *E. coli*. Produkcja rekombinowanego MlrA w *Staphylococcus aureus* 178RI wykazała, że prążek przy 28 kDa nie był obserwowany. Analiza homologii przy użyciu BLAST pozwoliła dowiedzieć, że oprócz homologów MlrA występujących w szczepach bakteryjnych o udokumentowanej zdolności do degradacji MCs, istnieje podobieństwo pomiędzy MlrA, a rodziną błonowych proteaz CAAX (uczestniczących w kotwiczeniu białek do błony komórkowej). Ponadto, dalsze analizy przy użyciu DAS-TMfilter na skorygowanej sekwencji MlrA wykazały, że białko może być lokowane w błonie przez 6 transmembranowych α -helis, a centrum aktywne jest eksponowane do perioplazmy. W celu weryfikacji postulowanego centrum aktywnego H²⁶⁰AIH²⁶³NE²⁶⁵ (Bourne et al., 2001) zaprojektowano muteiny MlrA_{H260A} i MlrA_{E265A}. Wykazany brak aktywności obu konstruktów potwierdził, że zastąpione aminokwasy pełnią kluczową rolę w aktywności katalitycznej MlrA wobec MCs.

Z powodu rozbieżności opinii o długości homologów MlrB u różnych bakterii, określono sekwencję *mlrB* przez odwrotny PCR. Po korekcie błędów w sekwencji, powodujących przesunięcie ramki odczytu i w konsekwencji skrócenie końca N i C, określono pełną sekwencję (**publ. F**), która dobrze koresponduje z homologami w *Sphingopyxis* sp. C-1 i *Sphingomonas* sp. USTB-05 (Okano et al., 2009, Wang et al., 2010). Wcześniejsze analizy MlrB wykazały, że jest to proteaza serynowa (Bourne et al., 1996), która posiada duże podobieństwo sekwencji do białek z rodziny enzymów rozpoznających penicyliny z konserwatywną sekwencją Ser-Xaa-Xaa-Lys, oraz do białek z rodziny β -laktamaz (Bourne et al., 2001; Shimizu et al., 2012). Jednakże, taka aktywność MlrB nie została dotychczas udokumentowana. W laboratorium autora zostało wytypowane i zweryfikowane centrum aktywne enzymu; poprzez podstawienie Ser (S77) i Lys (K80) resztami Ala uzyskano nieaktywne mutanty.

W przypadku metaloproteazy MlrC, mimo że wykazano już wcześniej inhibicję tego białka w obecności EDTA i fenantroliny (Bourne et al., 1996), nie znana była konserwatywna sekwencja typowa dla metaloenzymów. W najnowszej publikacji autora (**publ. F**) przedstawione są wyniki analiz przy użyciu BLASTP algorithm (BLOSUM 62 matrix) wskazujące, że MlrC szczepu *Sphingomonas* sp. ACM-396 wykazuje 25% identyczność i 40% podobieństwo sekwencji do MlrC-podobnej metalopeptydazy szczepu *Mesorhisobium* sp. BNC1, o znanej strukturze krystalograficznej. Badania strukturalne białka MlrC-podobnego (Bohuslavsek et al., 2001) pozwoliły stwierdzić, że reszty aminokwasowe D¹³⁸,

Załącznik 1

H¹⁴⁰ i H¹⁶² wiążą jony cynku. Co szczególnie interesujące, w MlrC pochodzącym ze szczepu *Sphingomonas* ACM-3962 analogiczne reszty aminokwasowe D¹⁶⁷, H¹⁶⁹ i H¹⁹¹ są obecne w tej samej odległości od siebie. Zaprojektowanie mutein MlrC_{D167A}, MlrC_{H169A} i MlrC_{H191A}, które okazały się być nieaktywne, pozwoliło na potwierdzenie hipotezy, że wskazane aminokwasy są prawdopodobnie zlokalizowane w obrębie centrum aktywnego enzymu. Ponadto, została potwierdzona pośrednio konieczna obecność dwudodatniego jonu (prawdopodobnie Zn²⁺) w centrum aktywnym badanego enzymu (informacje poniżej).

Podsumowując, spośród wszystkich zaprojektowanych mutantów punktowych badanych białek, żaden nie wykazywał aktywności wobec MCs (muteiny MlrA) lub liniowej formy MCs (muteiny MlrB i MlrC) (Tabela 1). Ponadto, takie zmutowane, nieaktywne enzymatycznie białka zostały wykorzystane jako próby kontrolne w testach aktywności białek Mlr wobec poszczególnych pochodnych MCs.

Table 1. Zebrane wyniki aktywności enzymów Mlr oraz ich mutein wobec różnych wariantów MC oraz ich pochodnych (na podstawie prac B, C i F, szczegóły poniżej).

MC and its derivatives	MlrA	MlrA _{H260A}	MlrB	MlrB _{S77A}	MlrC	MlrC _{H169A}	*empty plasmids
MC-LR	+	-					
MC-RR	+	-					
MC-LW	+	-					
MC-LF	+	-					
acMC-LR	-	-	+	-	+	-	-
acdmMC-LR	-	-	<i>n.a.</i>	-	+	-	-
acMC-LF	-	-	<i>n.a.</i>	-	+	-	-
acMC-LW	-	-	<i>n.a.</i>	-	+	-	-
acMC-LY	-	-	<i>n.a.</i>	-	+	-	-
acMC-RR	-	-	+	-	+	-	-
acMC-YR	-	-	<i>n.a.</i>	-	+	-	-
hexaMC-LR	+	-	+	-	-	-	-
hexaMC-RR	+	-	+	-	-	-	-
tetrapeptide	-	-	-	-	+	-	-

n.a. – not analysed; *crude extracts and samples purified from total protein extract of *E. coli* cells transformed previously with empty plasmids

Oczyszczanie białek Mlr i analizy biochemiczne

Białko MlrA nie ulega znaczącej nadekspresji w heterologowych układach. Jak dotychczas, najwyższą ekspresję uzyskano po syntezie sztucznego genu *mlrA*, wklonowaniu do plazmidu pET59Dest i ekspresji w *E. coli* BL21(DE3), (badania nie publikowane). Jednakże, pomimo wykonania wielu konstruktów z różnymi metkami nie opracowano dotychczas w pełni efektywnej metody oczyszczania tego białka.

W przeciwieństwie do MlrA, uzyskano wysoką nadekspresję rekombinowanych białek MlrB oraz MlrC (**publ. C i F**). Większa część tych białek jest odkładana w ciałkach

Załącznik 1

inkluzyjnych, ale pomimo tego udało się zwiększyć ilość białek we frakcji rozpuszczalnej poprzez zastosowanie hodowli w pożywce LB z dodatkiem 15% glicerolu i frakcje te posłużyły do efektywnego oczyszczania MlrB i MlrC metodą chromatografii powinowactwa. Oba białka, dzięki obecności metki histydynowej, wiązały się efektywnie do kolumny NiNTA. Jednakże, w przypadku białka MlrC, podczas oczyszczania tą metodą większość aktywności była tracona, co sugerowało częściową dezaktywację enzymu. Ponieważ jony niklu mogą powodować hamowanie aktywności metaloproteaz poprzez podstawienie w centrum aktywnym, zastosowano inną odmianę kolumny, tzw. CoNTA, czyli kolumnę z jonami kobaltu zamiast niklu, co pozwoliło na uzyskanie aktywnej frakcji enzymu. Podobny efekt obserwowano podczas oczyszczania lizostafiny, Zn-metaloproteazy (Szweda et al., 2005). Takie obserwacje wskazują na zależność aktywności MlrC od jonów cynku.

Kluczowe w detoksykacji MCs białko MlrA zostało poddane wstępnym testom biochemicznym (**publ. B**). Wyznaczono wartości IC_{50} dla stosowanych inhibitorów - EDTA i *o*-fenantroliny (odpowiednio 37.6 ± 3.1 and 1.48 ± 0.31 mM). Wykazano, że enzym jest aktywny wobec cyklicznej MC-LR w szerokim zakresie pH. Zakres optymalny dla aktywności MlrA (ponad 75% aktywności względnej w porównaniu do wartości maksymalnej) określono w przedziale pH 6.4 – 9.4, co wskazuje, że MlrA jest neutralną proteazą. Jednakże nawet w skrajnych testowanych wartościach pH obserwowano około 25% (w pH 5) oraz około 50% (w pH 10) aktywności względnej.

Badania kinetyki linearyzacji MC-LR przez MlrA pozwoliły na obliczenie podstawowych parametrów kinetycznych ($K_{0.5} = 159 \pm 1$ μ M, $h = 1.57 \pm 0.01$, $V_{max} = 0.066 \pm 0.2$ nM min⁻¹). Uzyskane dane dopasowane do modeli Michaelis Menten oraz Hilla wykazały, że kinetyka reakcji jest znacznie lepiej dopasowana do sigmoidalnej krzywej wysycenia. Lepsze dopasowanie do modelu Hilla zostało potwierdzone także testami statystycznymi. Obliczony współczynnik Hilla ($h = 1.57$) wskazuje na dodatnią kooperację MlrA wobec MC-LR. Może to wskazywać na oligomeryzację białka i występowanie MlrA (w warunkach eksperymentalnych) w formie dimeru.

Nowe produkty degradacji oraz modyfikacje szlaku rozkładu MCs.

Najciekawsze z punktu widzenia docelowej aktywności białek klastra *mlr* są ustalenia dotyczące udziału MlrA, MlrB i MlrC w dekompozycji cząsteczek MCs oraz specyficzności wobec pochodnych mikrocystyn. Wiedza (na poziomie biochemicznym) nt. procesu degradacji MCs przez bakterie posiadające klastr genowy *mlr* była do niedawna ograniczona do wykazania kilku produktów degradacji oraz rozpoznania trzech reakcji hydrolizy. Nie

Załącznik 1

zostały poznane ani końcowe produkty degradacji, ani też kolejność ich powstawania. Wykorzystanie rekombinowanych białek pozwoliło na zdobycie szeregu nowych informacji oraz korektę utartego poglądu dotyczącego roli białek MlrA, MlrB i MlrC w dekompozycji MCs.

Pierwszy dobrze udokumentowany szlak rozkładu MCs (Bourne et al., 1996, 2001) zakładał sekwencyjną degradację tych hepatotoksyn przez białka MlrA, MlrB i MlrC. Zaproponowana ścieżka rozkładu MC-LR wyglądała następująco: enzym MlrA (wykazujący aktywność wobec cyklicznych MCs oraz nodularyny, pentapeptydu strukturalnie podobnego do MCs) powoduje linearyzację cząsteczek. Kolejny etap to katalizowana przez MlrB hydroliza liniowej formy MCs do tetrapeptydu (przecięcie wiązania pomiędzy aa w pozycjach 1 i 2), który z kolei jest hydrolizowany przez MlrC z uwolnieniem wolnego aminokwasu Adda (przecięcie wiązania pomiędzy Adda i Glu, Harada et al., 2004). Co prawda w pracy Hashimoto et al. (2009) zaproponowano niemal kompletny schemat rozkładu MC-LR, jednak był on oparty jedynie na śledzeniu kolejności pojawiania się półproduktów poddanych derywatywacji. Uzyskane w ten sposób dane wydają się wątpliwe z tego powodu, że do badań wykorzystywano ekstrakty komórkowe bakterii, w których mogły być obecne różne peptydy uznane jako produkty degradacji MCs. Ponadto, w pracy tej nie zajmowano się udziałem poszczególnych enzymów w procesie rozkładu hepatotoksyn. Ostatecznie, generalna opinia była taka, że MCs są linearyzowane przez MlrA i takie liniowe heptapeptydy są kolejno rozkładane przez MlrB i MlrC.

Aktywność MlrA wobec różnych wariantów MC została szeroko przebadana i przedstawiona w pracy autora (publ. B). Wykazano, że MlrA hydrolizuje wiązanie peptydowe pomiędzy Adda (pozycja 5) i aminokwasem w pozycji 4, niezależnie od wariantu MC (Tabela 1). Natomiast pierwsze odkrycie kwestionujące sekwencyjny schemat działania enzymów Mlr zostało opublikowane w pracy z 2012 (**publ. C**). Udokumentowano, że liniowe pochodne różnych wariantów MCs mogą być dalej rozkładane nie tylko przez MlrB, ale także przez MlrC i że te enzymy mogą działać na liniowe formy MCs równolegle wobec różnych wiązań peptydowych hydrolizowanych cząsteczek. Wykazano, że MlrC odcina pojedynczy aminokwas Adda od końca N. Ponieważ w czasie tych analiz nie udało się zidentyfikować pozostałych pochodnych fragmentów, sugerowano, że MlrC może działać na liniowe formy MCs w sposób niespecyficzny rozcinając wszystkie lub kilka wiązań peptydowych z wytworzeniem pojedynczych aminokwasów lub di- czy tripeptydów, niewidocznych na chromatogramach. W kolejnej pracy (**publ. F**), przy zastosowaniu innego gradientu w rozdzielaczach HPLC oraz detekcji przy 220 nm udało się zidentyfikować jeszcze jedną grupę

Załącznik 1

produktów powstających pod wpływem działania MlrC na liniowe pochodne MCs. Analiza masowa pochodnej acMC-LR (wykazująca piki o m/z 700.4 oraz 350.7) oraz wzór fragmentacji MS/MS pozwoliły rozpoznać kolejny produkt degradacji powstający pod wpływem MlrC jako heksapeptyd Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg, (w skrócie hexaMC-LR). Fragmenty o m/z 571.3, 553.3 i 488.3 były identyczne z tymi udokumentowanymi przez Imanishi et al. (2005) i potwierdziły, że uzyskany produkt posiada przynajmniej 5 aa (Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg), podczas gdy pik m/z 682.3 to prawdopodobnie fragment Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg z usuniętą cząsteczką wody. Heksapeptydy produkowane przez MlrC z różnych wariantów liniowej MC miały wartości m/z analogiczne do heksapeptydu pochodzącego z MC-LR. Na tej podstawie określono miejsce cięcia liniowych MCs pomiędzy aminokwasami Adda i Glu.

Ponadto wykazano, że MlrC nie tworzy innych produktów z MCs i działa bardzo specyficznym jedynie na wiązanie Adda-Glu, jeśli substratem jest liniowy heptapeptyd lub tetrapeptyd (**publ. F**). Heksapeptydy także nie są już dalej degradowane przez MlrC, natomiast udokumentowano, że zarówno MlrA jak też MlrB katalizują dalsze reakcje rozkładu tych pochodnych (Tabela 1). Przy użyciu nieaktywnych mutein tych białek potwierdzono precyzyjnie, że właśnie MlrA i MlrB, a nie inne białka obecne w ekstraktach z *E. coli* są odpowiedzialne za spadek stężenia substratów (heksapeptydów). Nie udało się jednakże dokonać detekcji dalszych produktów tych reakcji. W dalszej kolejności wykazano, że tetrapeptyd, produkt działania MlrB na liniowe MCs, nie jest dalej degradowany przez MlrA i MlrB.

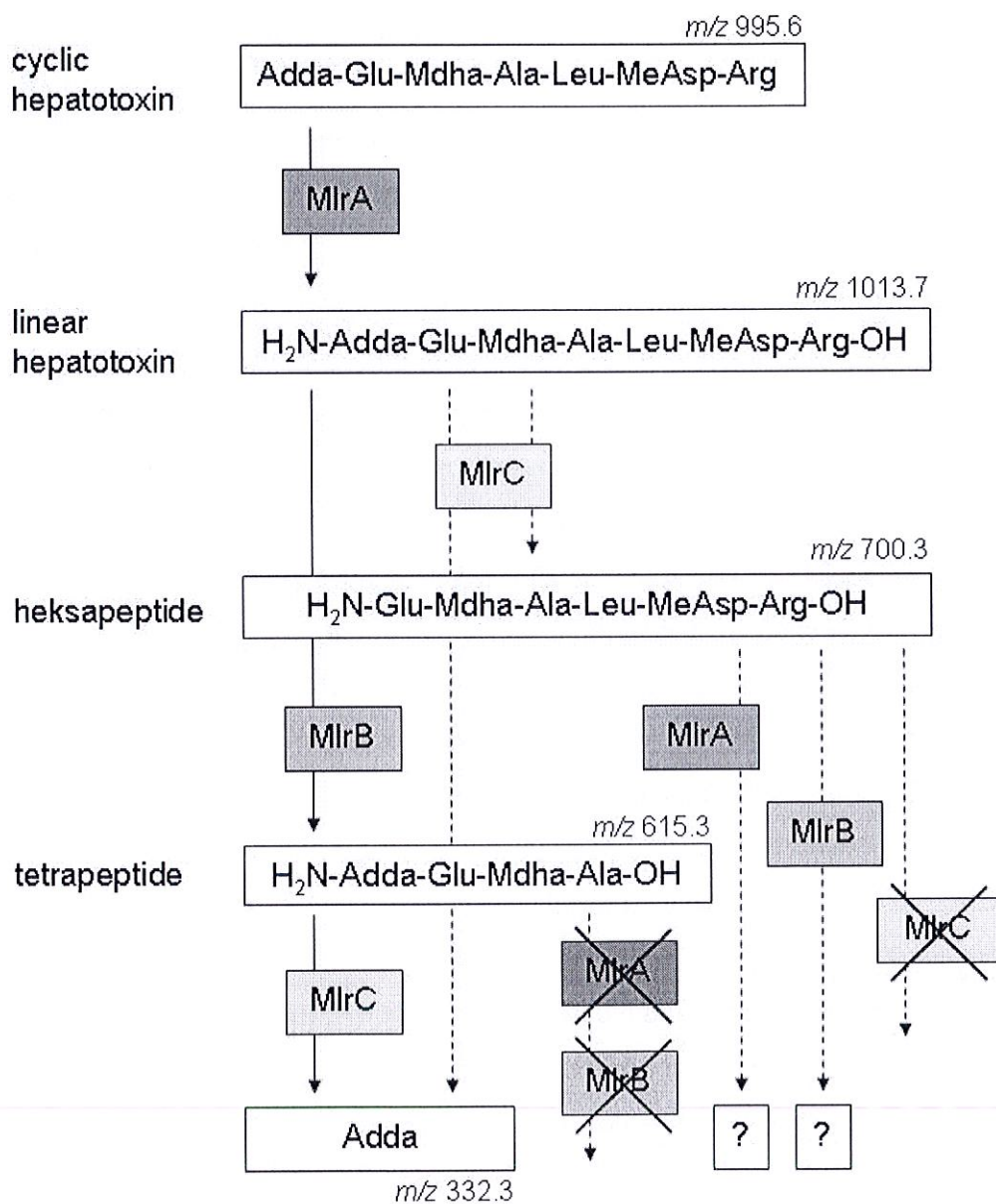
W ten sposób, przy użyciu oczyszczonych kolejnych produktów pośrednich degradacji MCs i przy zastosowaniu mutein białek Mlr jako kontroli negatywnych uzyskano szereg nowych informacji na temat szlaku rozkładu MCs (przedstawionego na Rys. 2): i) MlrB hydrolizuje liniowe warianty MCs niezależnie od aminokwasu w pozycji 2 (Leu in MC-LR, MC-LF, MC-LW, MC-LY, Arg w MC-RR i Tyr w MC-YR); ii) liniowe warianty MCs są hydrolizowane przez MlrC poprzez przecięcie wiązania pomiędzy Adda i Glu, co skutkuje uwolnieniem pojedynczego aminokwasu Adda oraz heksapeptydów; iii) heksapeptydy nie są dalej degradowane przez MlrC, ale iv) są rozkładane przez MlrA i MlrB, jednak produktów tych reakcji dotychczas nie udokumentowano; v) tetrapeptyd nie jest rozkładany przez żaden z trzech znanych enzymów klastera *mlr*.

Wykazana aktywność MlrC rzuca nowe światło na specyficzność substratową tego enzymu. Wyniki autora stanowią mocne przesłanki, że MlrC wykazuje specyficzność jedynie wobec wiązania Adda-Glu liniowych pochodnych MC. Na podstawie analizy degradacji różnych

Załącznik 1

liniowych wariantów przez MlrB można z kolei wysnuć wniosek, że ten enzym jest także bardzo specyficzny i hydrolizuje jedynie wiązanie Ala-X (gdzie X oznacza zmienny aminokwas w pozycji 2 heptapeptydu i heksapeptydu). Taka aktywność MlrB wobec heksapeptydu skutkowałaby powstaniem dwóch tripeptydów (Glu-Mdha-Ala oraz X-(Me)Asp-Z), ale ich tworzenie nie zostało dotychczas potwierdzone.

Rys. 2. Szlak biodegradacji MC-LR występujący w szczepach bakteryjnych posiadających klaster *mlr*. Ten sam schemat degradacji innych wariantów MCs został także potwierdzony. Strzałki z linią przerywaną przedstawiają dane udokumentowane przez autora referatu.



Załącznik 1

Jednakże, najbardziej zaskakującym rezultatem badań było udokumentowanie aktywności MlrA wobec heksapeptydów, niezależnie od wariantów MCs, z których one pochodzą (**publ. F**). Takie odkrycie rzuca nowe światło na rolę MlrA w kompletnej utylizacji hepatotoksyn. Do tej pory potwierdzona była jedynie aktywność tego enzymu wobec cyklicznych cząsteczek mikrocystyn oraz nodularyn, polegająca na linearyzacji tych substratów, co wiąże się także z drastycznym spadkiem ich toksyczności wobec ludzkich hepatocytów. Ponadto, spośród około 50 przetestowanych syntetycznych substratów dla proteaz żaden nie był wrażliwy na działanie MlrA (**publ. B**). Z tego powodu, enzym MlrA jest uznawany za wysoce specyficzny. W naszych badaniach wykorzystując różnorodne, najbardziej powszechne warianty MCs (-LR, -RR, -LW, -LF, -RY i -YR) udokumentowano zdolność tego enzymu do linearyzacji wszystkich przebadanych wariantów, niezależnie od składu wymiennych aminokwasów. Szczególnie interesujące jest to, że obecność różnych aminokwasów w pozycji 4, a więc tych, które tworzą wiązania peptydowe hydrolizowane przez MlrA, nie wpływa na zdolność do hydrolizy. Ponadto, znana jest aktywność MlrA wobec nodularyny, która jest także podobną strukturalnie do MCs cykliczną cząsteczką, posiada aminokwas Adda, ale jest pentapeptydem. Taka aktywność MlrA sugeruje, że kluczowym aminokwasem decydującym o specyficzności substratowej enzymu jest Adda. Ten aminokwas nadaje toksyczne własności MCs, wpływając na ich zdolność do hamowania aktywności fosfataz PP1 i PP2A hepatocytów (Harada et al., 1996). Pewne dane wskazują, że MCs mogą stanowić istotne źródło związków węglowych dla bakterii koegzystujących z sinicami. Ponadto sugerowano, że Adda jest kluczową cząsteczką sygnałną w komunikacji międzykomórkowej. Z punktu widzenia biodegradacji MCs interesujące jest, że Adda indukuje ekspresję genów *mlrA* i *mlrB* (Shimizu et al., 2011) i w ten sposób stymuluje komórki bakteryjne do szybszej degradacji MCs. Nasze badania dostarczają nowych argumentów wspierających tę hipotezę. Zostało udokumentowane, że aktywność MlrA jak też MlrC wobec MCs i ich pochodnych jest zależna od obecności lub braku Adda. MlrC hydrolizuje jedynie wiązania peptydowe pomiędzy Adda i Glu (w liniowym heptapeptydzie oraz w tetrapeptydzie). MlrA z kolei rozpoznaje wiązanie peptydowe od strony pomiędzy Adda, a aminokwasem w pozycji 4, niezależnie od wariantu. Z drugiej strony, inne wiązania peptydowe MCs mogą być także hydrolizowane przez MlrA, ale tylko wtedy, kiedy Adda jest wcześniej odcięte przez MlrC.

Niektóre z wymienionych wyżej propozycji wymagają dalszych badań, ale wedle dotychczasowych ustaleń została postawiona hipoteza, że końcowe produkty aktywności MlrB i MlrC to Adda, Glu-Mdha-Ala and X-MeAsp-Z. To implikuje, że te dwa

Załącznik 1

prawdopodobne tripeptydy są degradowane w dalszej kolejności przez MlrA lub też inne enzymy, niekodowane przez klaster *mlr*.

Weryfikacja hipotezy enzymatycznej degradacji MCs przez bakterie probiotyczne.

Odmienne podejście w badaniach mechanizmów degradacji zastosowano do analiz aktywności bakterii probiotycznych wobec mikrocytyn. We wcześniejszych pracach Nybom et al. (2007, 2008) wykazano skuteczność stosowania tych bakterii w usuwaniu MCs. Najwyższą efektywność procesów eliminacji toksyn uzyskano w przypadku szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG i LC-705 oraz *Bifidobacterium longum* 46. Szczególnie interesujące było potwierdzenie hipotezy, że biologiczna aktywność badanych szczepów, a nie fizyczna adsorpcja na powierzchni ścian komórkowych, jest głównym mechanizmem usuwania toksyn. Wskazywały na to: znacząco podniesiona redukcja stężenia MCs w obecności żywych hodowli bakteryjnych w porównaniu do hodowli liofilizowanych lub nieżywotnych (Nybom et al., 2007) oraz istotne podniesienie efektywności eliminacji MC podczas inkubacji komórek z dodatkiem glukozy (Nybom et al., 2008). W naszej pracy (**publ. A**) postawiono hipotezę, że MCs mogą podlegać biodegradacji w obecności bakterii probiotycznych i że enzymy systemu proteolitycznego bakterii są zaangażowane w ten proces. Do tego typu enzymów zidentyfikowanych u badanych szczepów należą m.in. różne typy zewnątrzkomórkowych proteinaz (Christensen et al., 1999). Badania nad tym zagadnieniem rozpoczęto w czasie pobytu na stypendium naukowym w Department of Biochemistry and Pharmacy, Åbo Akademi University w Turku (Finlandia) w grupie J. Meriluoto (2007-2008) i kontynuowano bezpośrednio później na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie. Udokumentowano, że wewnątrzkomórkowe proteazy systemu proteolitycznego bakterii mlekowych nie są zaangażowane w proces usuwania MCs. Przy użyciu znakowanej radioaktywnie MC-LR (węglem C^{14}) wykazano, że ani MC-LR, ani jej pochodne nie są transportowane do wnętrza komórek badanych szczepów, co wskazywało, że transportery peptydów obecne w błonach komórkowych także nie biorą udziału w obserwowanej degradacji MCs. Analizy te sugerowały, że proces usuwania toksyny zachodzi jedynie we frakcji zewnątrzkomórkowej, a toksyna lub jej pochodne nie ulegają adsorpcji na powierzchni ściany komórkowej. Równoległa analiza aktywności proteinaz ścian komórkowych i tempa usuwania MC-LR wykazała silną korelację tych parametrów w przypadku wszystkich przebadanych szczepów. Ponadto, zarówno aktywność enzymatyczna jak też usuwanie MC były najwyższe w ciągu kilku godzin od podania glukozy, co wskazuje, że są to procesy zależne od dostępu energii. Zastosowanie inhibitorów proteinaz *L.*

Załącznik 1

rhamnosus GG pozwoliło wykazać, że zahamowanie aktywności enzymów powoduje równoczesny znaczący spadek zdolności komórek badanego szczepu do usuwania MC.

Podsumowując, przy użyciu różnorodnych testów wykazano w sposób niebezpośredni, że proteiny związane ze ścianą komórkową bakterii probiotycznych są odpowiedzialne za enzymatyczną degradację MCs (**publ. A**). Przedstawiona charakterystyka procesu usuwania MCs sugeruje, że w przyrodzie może istnieć wiele alternatywnych sposobów hydrolizy peptydowych toksyn, a utylizacja MCs zachodzi w sposób odmienny od dobrze poznanego modelu rozkładu MCs. Szczepy *Sphingomonas* oraz inne posiadające homolog *mlrA* są zdolne do linearyzacji MCs przy udziale enzymu MlrA znajdującego się w przestrzeni periplazmatycznej, natomiast liniowe MCs są transportowane do wnętrza komórki (Bourne et al., 2001; Ishii et al., 2004) i kolejne etapy degradacji MCs zachodzą we frakcji cytozolowej. W opozycji do tego schematu, wszystkie etapy degradacji MCs przez bakterie probiotyczne zachodzą na zewnątrz komórek. Jednakże, analiza LC-MS nie dostarczyła dodatkowych informacji nt. ewentualnych produktów takiej degradacji i zidentyfikowanie takich pochodnych stanowi istotne wyzwanie w dalszych badaniach.

Warto dodatkowo zwrócić uwagę na fakt, że testy inhibicji PP1 potwierdziły efektywność badanych szczepów w detoksykacji MCs. Główną drogą przedostawania się MC do organizmu człowieka jest układ pokarmowy i absorpcja przez ściany jelit, a efekt ekspozycji na subletalne dawki MCs nie jest zwykle zauważalny z powodu braku zdefiniowanych symptomów klinicznych. Bakterie probiotyczne zdolne do usuwania niewielkich ilości MCs obecnych w wodzie pitnej mogą stanowić czynnik ochrony indywidualnej. Dlatego zrozumienie mechanizmów usuwania MCs jest bardzo ważne w kontekście wykorzystania bakterii probiotycznych lub ich enzymów.

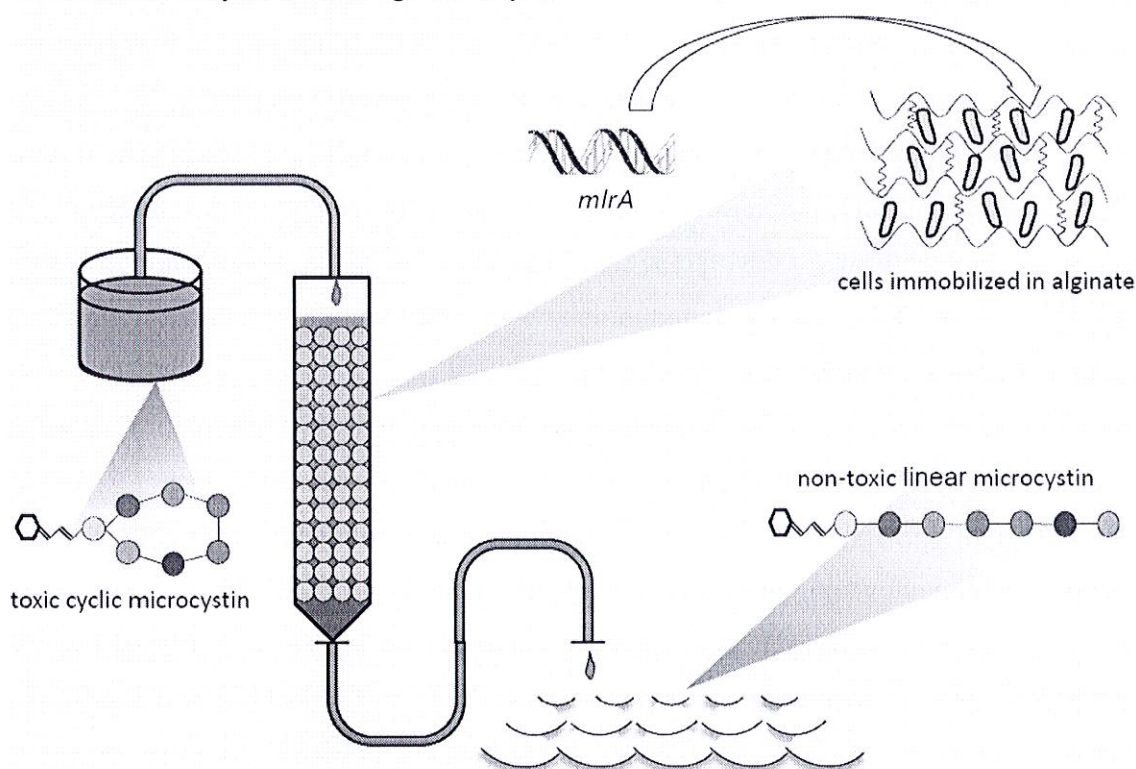
Konstrukcja bioreaktorów.

Badania podstawowe z zakresu mikrobiologicznej degradacji hepatotoksyn pozwalają coraz lepiej rozumieć te zjawiska na poziomie środowiskowym, biochemicznym i molekularnym. Kolejnym podejściem badawczym, wynikającym z takiej wiedzy, są próby praktycznego wykorzystania mikroorganizmów zdolnych do degradacji MCs. W ciągu ostatnich kilku lat przedstawionych zostało wiele takich propozycji, opartych na idei: i) konstrukcji specjalnych bioreaktorów (najczęściej kolumn wypełnionych różnorodnym złożem takim jak piasek, drobiny tworzyw sztucznych, aktywny węgiel); ii) wspomaganie istniejących systemów uzdatniania wody (analiza i monitorowanie istniejących w obrębie stacji uzdatniania wody szczepów zdolnych do biodegradacji MCs); albo też iii) wprowadzeniu bezpośrednio do

Załącznik 1

rezerwarów wodnych mikroorganizmów zdolnych do utylizacji MCs (Sumino et al., 2008; Ji et al., 2009). W tych systemach proponuje się wykorzystanie naturalnie występujących lokalnych szczepów w formie biofilmów tworzonych na różnych powierzchniach, albo też *inoculum* wcześniej wyselekcjonowanego szczepu bakteryjnego. Dotychczas proponowane bioreaktory wykorzystujące naturalnie występujące mikroorganizmy wykazywały jednak stosunkowo niską efektywność w porównaniu z chemicznym oczyszczaniem i możliwość ich praktycznego zastosowania jest kwestionowana.

Fig. 3. Schemat bioreaktora opartego na komórkach BL21(DE3) z ekspresją genu *mlrA* i immobilizowanych w żelu alginianowym.



Badania przedstawione w kolejnej pracy autora (**publ. E**) oparte były na przekonaniu, że w celu uzyskania efektywnych biologicznych systemów utylizacji MCs konieczne jest zdecydowane podniesienie aktywności mikroorganizmów wobec tych toksyn. W tym celu przeprowadzono wstępne testy działania bioreaktorów opartych na immobilizowanych bakteriach BL21_pET21_ *mlrA* wykazujących ekspresję rekombinowanego białka MlrA (Rys. 2). We wcześniejszej pracy (**publ. B**) dokonano korekty danych nt. toksyczności pierwszego produktu degradacji MCs powstającego w wyniku aktywności MlrA. Na podstawie precyzyjnego oczyszczenia produktu oraz testu inhibicji PP1 udokumentowano, że liniowa forma MC-LR jest około 2100 razy mniej aktywna wobec PP1 niż forma cykliczna, co w

Załącznik 1

praktyce oznacza, że jest to półprodukt nietoksyczny. Takie dane wskazują, że wysoka aktywność jedynie białka MlrA w komórkach immobilizowanych w bioreaktorze jest wystarczająca z punktu widzenia praktycznego zastosowania. Należy ponadto zaznaczyć, że pomimo istnienia potencjalnego ryzyka wpływu GEM na środowisko wynikające z możliwego transferu niepożądanych genów do naturalnych mikroorganizmów, zastosowanie GEM jest praktykowane jako atrakcyjna alternatywa w biologicznym oczyszczaniu ścieków czy bioremediacji gleby lub wody gruntowej. Pierwszym szczepem z modyfikacjami genetycznymi, który został oficjalnie zaaprobowany przez U.S. Environmental Protection Agency do użycia w bioremediacji gleby, jest szczep *Pseudomonas fluorescens* HK44, zdolny do degradacji węglowodorów aromatycznych (Ripp et al., 2000). Tego typu rozwiązania są coraz częściej proponowane (Trögl et al., 2012; Cao et al., 2012; Singh et al., 2014; Li et al., 2014) mimo licznych ograniczeń wynikających z istniejących przepisów. W naszych badaniach, prowadzonych z zachowaniem procedur właściwych dla przepisów o tzw. zamkniętym użyciu GMO, istnieje założenie, że działanie wskazanego szczepu jest ograniczone do bioreaktorów i GEM nie są uwalniane do środowiska. Sposób immobilizacji komórek oparty na pułapkowaniu w żelu alginianowym został wybrany m.in. ze względu na ograniczenie wycieku komórek z tego typu złoża.

Założeniem stosowania reaktorów degradujących MCs była redukcja stężenia mikrocystyn do poziomu poniżej $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Dokonano porównania efektywności degradacji MC-LR w systemie otwartym (przepływ ciągły przez kolumnę) oraz zamkniętym (zbiornik ze stałą objętością). Udokumentowano, że system otwarty (kolumnowy) jest bardziej efektywny w przypadku występowania niższych stężeń toksyn (równych lub niższych niż $10 \mu\text{g L}^{-1}$). W tym przypadku, przy zastosowanym przepływie stężenie toksyny dochodziło do poziomu zbliżonego do rekomendowanego przez WHO. W przypadku wyższych testowanych stężeń ($35 \mu\text{g L}^{-1}$) system zamknięty okazał się być bardziej przydatny, gdyż podczas godzinnej degradacji uzyskiwano rekomendowany poziom, którego nie udało się osiągnąć w przepływie ciągłym. Ponieważ jednak najczęściej notowane stężenia toksyn w czasie i po zakwitach sinicowych wahają się w granicach kilku – kilkunastu $\mu\text{g L}^{-1}$, wydają się, że zastosowanie przepływu ciągłego przez kolumnę, w którym występuje stabilne tempo degradacji, jest bardziej adekwatne. Porównanie skuteczności kolumny (z unieruchomionymi w żelu alginianowym komórkami z wysoką ekspresją MlrA) z innymi modelowymi przykładami bioreaktorów degradujących MCs wykazało, że zaproponowany system jest wielokrotnie bardziej skuteczny w szybkiej eliminacji MCs (**Tabela 2**). Warto jest także wspomnieć, że uzyskane w naszej pracy tempo degradacji proponowanego bioreaktora jest porównywalne z

Załącznik 1

systemami opartymi na chemicznej lub fizycznej degradacji MCs. Przykładowo, w jednej z nowszych prac (Jacobs et al., 2013) w przedstawionym nowatorskim modelu fotokatalitycznej dekompozycji MCs tempo degradacji było jedynie dwa razy wyższe niż w przypadku degradacji przy początkowym stężeniu MC-LR na poziomie $35 \mu\text{g L}^{-1}$, oraz niemal identyczne z maksymalnym wykazanym dla stężenia $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 2. Porównanie efektywności działania różnych systemów usuwania MC z wody.

Cited work	Type of reactor	Initial MC concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calculated parameters of MC removal	
			Rate of degradation ($\mu\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$)	Efficiency (%)
Bourne et al., 2006	Slow sand filter with <i>Sphingomonas</i> MJ-PV strain inoculated in column	50	1.3	80
Tsuji et al., 2006	Cells of B-9 strain immobilized on polyester pieces in closed container	200	7.5	90
Ho et al., 2006	Morgan WTP filter sand packed in column colonized by bacteria with <i>mlrA</i> gene	20	40	100
Jacobs et al., 2013	Photocatalytic degradation in continuous treatment system	5	225.0 ^a	85
our results	Column filled with alginate beads, BL21(DE3)- <i>mlrA</i> cells immobilized in gel	10	30.5	86
		35	105.5	85
		100	219.9	62
		35	3.8 ^b	–

Notes: ^a Rate of degradation of the whole system consisting of four 2.6 L reactors lit with four mercury vapor lamps (125 W) and treated with TiO_2 (250 mg L^{-1}); ^b rate of MC-LR degradation after four weeks of continuous flow.

Z punktu widzenia możliwości praktycznego zastosowania bioreaktorów, kluczowym parametrem jest stabilność w środowisku naturalnym. Wcześniejsze propozycje zakładały, że bioreaktory mogą działać wiele tygodni lub miesięcy i że bakterie odpowiedzialne za degradację MCs mogą podlegać regeneracji ze względu na zdolność proliferacji wewnątrz złoża. Ważny jest także czynnik zdolności do współzawodnictwa z innymi mikroorganizmami. Jednakże, w takich układach występuje zwykle długi stan adaptacji, co powoduje, że szybkie przygotowanie takiego systemu jest niemożliwe. Proponowany w **pracy E** system nie oferuje tak długiej stabilności, jak systemy oparte o szczepy naturalne. W trakcie długotrwałego działania efektywność układu znacząco obniża się, co oznacza, że w celu utrzymania poziomu toksyn w wycieku w granicach $1 \mu\text{g L}^{-1}$ konieczne byłoby obniżanie tempa oczyszczania wody. Jednakże, początkowa efektywność bioreaktora była bardzo wysoka i nawet po miesiącu działania kolumny z immobilizowanymi komórkami BL21_*mlrA* tempo degradacji było zbliżone do dokumentowanego dla naturalnych systemów. Ponadto należy podkreślić, że w zbiornikach wodnych wysokie stężenia MCs zwykle nie utrzymują się

Załącznik 1

długo na stałym poziomie, gdyż w sposób powolny dochodzi do wielokierunkowej utylizacji toksyn sinicowych. Jest to przesłanka wskazująca raczej na konieczność poprawy efektywności bioreaktorów (które pozwolą na szybką redukcję stężenia toksyn w razie wystąpienia zagrożenia), nawet kosztem niższej stabilności. Przewagą bioreaktora przedstawionego w naszej pracy jest także duża skuteczność w razie występowania bardzo wysokich stężeń, gdyż wówczas tempo degradacji jest wyższe i jeszcze bardziej przeważa nad naturalnymi systemami, które mogą operować jedynie przy stężeniach nieznacznie przekraczających rekomendowany poziom. Reasumując, opracowane przez nas rozwiązanie (kolumna z unieruchomionymi komórkami o bardzo dużej aktywności wobec MCs) może okazać się niezwykle skuteczne w przypadku konieczności szybkiej reakcji na nagle pojawiające się zagrożenie związane z masowym uwolnieniem MCs do środowiska wodnego. W takich sytuacjach kluczowe jest jak najwyższe tempo degradacji i efektywność usuwania dużych ilości toksyn w krótkim czasie. Kolumny wypełnione złożem z ekstremalnie wysoką aktywnością wobec MCs mogłyby być wykorzystane np. w oczyszczaniu niewielkich zbiorników przeznaczonych do hodowli ryb lub do nawadniania upraw rolnych.

Podsumowując badania przedstawione powyżej, najważniejsze składowe można przedstawić następująco:

1. Charakterystyka genetyczna i biochemiczna enzymów klastera *mlr* biorących udział w degradacji MCs została przeprowadzona przy użyciu rekombinowanych białek. Sekwencje DNA kodujące te enzymy zostały skorygowane i aktywne centra enzymów zostały potwierdzone poprzez konstrukcję nieaktywnych mutein.
2. Wiedza na temat przebiegu kolejnych etapów hydrolizy MC i jej pochodnych przez białka Mlr została zdecydowanie rozszerzona i zaproponowano nowy schemat biodegradacji MCs. Ponadto, udokumentowana aktywność białek Mlr pozwoliła zrozumieć lepiej ich specyficzność i rzeczywistą rolę w całkowitej utylizacji MCs.
3. Hipoteza odmiennej drogi degradacji MCs przez bakterie probiotyczne została pośrednio potwierdzona i wskazano wiele przesłanek, że proteiny zakotwiczone w ścianach komórkowych badanych bakterii są odpowiedzialne za proces usuwania MCs.
4. Zaproponowany został efektywny bioreaktor z bakteriami o wysokiej ekspresji MlrA immobilizowanymi w alginianie. Propozycja ta może być ciekawą alternatywą lub uzupełnieniem wobec innych metod oczyszczania wody z MCs.

Załącznik 1

Jako uzupełnienie prac badawczych prezentowanych powyżej, do jednotematycznego cyklu dołączony został artykuł przeglądowy (**pub. D**), w którym w sposób kompleksowy została przedstawiona obecna wiedza na temat mikrobiologicznej degradacji mikrocyzyn. W pracy tej zawarto informacje, które po części przedstawiono powyżej, a zwłaszcza szczegółowy przegląd szczepów o udokumentowanej zdolności do degradacji MCs, a także biochemiczne i genetyczne aspekty procesu biodegradacji. Ponadto, zostały poddane dyskusji inne istotne aspekty dotyczące zjawiska biodegradacji MCs, m.in: 1) dokonano porównania efektywności biodegradacji wykazywanej przez różne szczepy, oraz 2) przedstawiono odmienne modele szlaków biodegradacji MCs wraz z krytycznymi komentarzami niektórych słabiej udokumentowanych hipotez. Poniżej zostały opisane pokrótce te dwa fragmenty pracy przeglądowej.

1) Z powodu zróżnicowanej metodologii, nie można w sposób bezpośredni porównać danych literaturowych pokazujących efektywność biodegradacji MCs przez różne szczepy bakteryjne. Jednakże, na podstawie prezentowanych wyników można wnioskować, że generalnie tempo biodegradacji MCs różni się znacząco w zależności od szczepu lub badanej próbki wody i jest relatywnie wolne. W niektórych pracach oszacowano, że całkowita biodegradacja MCs (przy stężeniach wyjściowych rzędu kilku-kilkudziesięciu $\mu\text{g L}^{-1}$, a więc typowych dla tych obserwowanych w czasie zakwitów) wymaga co najmniej kilku godzin, a zazwyczaj trwa więcej niż jedną dobę. W pracy przeglądowej (**publ. D**) zaproponowano jednolity i prosty algorytm do przedstawienia ilościowego procesu biodegradacji i wykorzystano dane z szeregu publikacji, aby porównać te parametry. W celu porównania efektywności różnych szczepów najbardziej użyteczną informacją wydaje się tempo tworzenia pierwszego produktu degradacji (zazwyczaj liniowej formy MC), biorąc pod uwagę początkowe stężenie toksyny oraz gęstość badanej hodowli bakteryjnej. Natomiast w przypadku prac aplikacyjnych, bardziej odpowiednie jest pokazanie ilości zdegradowanej MC w przeliczeniu na objętość złoża w danym czasie, co może być łatwo porównane z efektywnością np. chlorowania czy innej chemicznej lub fizycznej metody. Jeszcze inne podejście, wymagające porównania tempa biodegradacji różnych wariantów MCs, względnie nodularyny lub innych peptydów sinicowych o strukturze podobnej do MCs, pozwala na zdobycie informacji o specyficzności substratowej enzymów.

2) Jeśli chodzi o odmienne szlaki biodegradacji MCs, w **pracy D** przedstawiono różnorodne hipotezy na temat możliwych transformacji MCs. W niektórych publikacjach sugerowano, że enzymy inne niż proteazy mogą być zaangażowane w ten proces. Mikroorganizmy mogą wykorzystywać inne reakcje typowe dla degradacji organicznych

Załącznik 1

zanieczyszczeń/metabolitów wtórnych, takie jak dekarboksylacja, demetylacja, czy dehydratacja. Przykładowo, unikatowy mechanizm demetylacji MC-RR, występujący w szczepie *Sphingomonas* sp. CBA4, został zaproponowany przez Ame et al. (2006), jednakże taki hipotetyczny proces nie został później eksperymentalnie zweryfikowany. Nowe reakcje degradacji MC-RR zostały także opisane w pracy Zhang et al. (2010) na przykładzie szczepu *Sphingopyxis* sp. USTB-05.39. W tym przypadku autorzy wskazywali, że pochodne udokumentowane metodą MS są wynikiem utraty dwóch cząsteczek wody poprzez wewnętrzną cyklizację cząsteczki przy udziale dwóch reszt argininy. Ten dość karkołomny model transformacji MC-RR także oparty był wyłącznie na detekcji MS. Podobnie, pojedyncza reakcja dehydratacji w rejonie Phe-MeAsp MC-LF została zaproponowana w pracy Edwards et al. (2008). Cechą wspólną powyższych oraz kilku innych propozycji, alternatywnych wobec opartego na białkach Mlr schematu dróg degradacji MCs jest to, że produkty reakcji były wykazane jedynie przy użyciu spektrometrii masowej. Nie udokumentowano jednak żadnych odpowiadających tym hipotetycznym produktom pików pochodzących z rozdzielów HPLC z detekcją UV, co przy obecności grup chromoforowych typowych dla MCs nie powinno być zadaniem trudnym. Stawia to pod znakiem wiarygodności prezentowanych w cytowanych pracach szlaków biodegradacji. Konkludując, aby w sposób jednoznaczny i nie pozostawiający wątpliwości wykazać powstawanie nieznanych dotąd produktów degradacji MCs, powinna być wykazana równoległa detekcja MS oraz UV tych komponentów, potwierdzona ewentualnie innymi technikami.

5.2. Inne osiągnięcia naukowe, niezwiązane bezpośrednio z tematyką badań, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

Oprócz tematu przewodniego moich badań (tj. biodegradacji mikrocytyn) w ciągu kilku ostatnich lat, przy współpracy z różnymi grupami badawczymi, prowadzone były także doświadczenia, które mieszczą się w obszarze głównych kierunków badań nad najważniejszymi aspektami występowania toksycznych szczepów sinic oraz toksycznych metabolitów wtórnych. Te podstawowe kierunki można nakreślić następująco:

1. Monitorng występowania toksyn sinicowych, dynamika rozprzestrzeniania się toksycznych szczepów oraz zależności środowiskowe pomiędzy sinicami, a innymi przedstawicielami ekosystemów wodnych.
2. Badania toksykologiczne metabolitów wtórnych sinic.

Załącznik 1

3. Próby znalezienia efektywnych metod degradacji lub usuwania toksyn sinicowych, zarówno w wodzie pitnej jak też w zbiornikach wodnych, włączając metody fizykochemiczne oraz biologiczne.

Detekcja i biodegradacja cylindrospermopsyny

W pracy sprzed kilku lat (Kokociński et al., 2008), wykonywanej m.in. wspólnie z grupą z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, przedstawiono wyniki dokumentujące obecność w zbiornikach wodnych w Wielkopolsce innego rodzaju toksyny, cylindrospermopsyny (CYN, cytotoksycznego metabolitu sinic), co było pierwszym udokumentowanym przypadkiem występowania tej toksyny w Polsce. Gatunki sinic produkujące ten rodzaj toksyn uważano do niedawna za typowe dla klimatu gorącego. Jednak mikroorganizmy z rodzaju *Cylindrospermopsis* czy *Aphanizomenon* należą do inwazyjnych i w ostatnich kilkunastu latach pojawiły się doniesienia o występowanie tego typu szczepów sinic także w Europie. Nasza praca po raz kolejny pokazała, że geograficzny zasięg szczepów produkujących CYN, a co za tym idzie, występowania tej toksyny w wodach śródlądowych wykroczył już daleko poza zbiorniki tropikalne czy subtropikalne. Chociaż precyzyjnie nie wskazano, który szczep był producentem CYN w badanych zbiornikach, wskazano na szczepy *Nostocales*: *C. raciborski* lub *Aphanizomenon gracile*. Pojawienie się tego typu toksyny w miejscach, w których wcześniej nie notowano jej obecności, stanowi nowe ryzyko i implikuje konieczność rozszerzenia w tej części Europy monitoringu nie tylko MCs ale innych toksyn produkowanych przez sinice.

Wiedza na temat biodegradacji CYN jest także bardzo ograniczona. W najnowszej pracy dotyczącej tego zagadnienia (Dziga et al., 2016) przetestowano szczepy bakteryjne izolowane ze zbiorników, w których obecnie lub w niedalekiej przeszłości notowano występowanie mikroorganizmów produkujących tę toksynę. Spośród kilkunastu przebadanych szczepów bakteryjnych wyselekcjonowany został jeden, posiadający zdolność do biodegradacji CYN. Na podstawie porównania sekwencji 16S rDNA i rpoD szczep R6 zidentyfikowano jako *Aeromonas* sp. Biodegradacja CYN była zależna od temperatury i pH. Ponadto, co szczególnie interesujące, wykazana została stymulacja wzrostu szczepu R6 w obecności CYN. Te odkrycia wspierają hipotezę, że (analogicznie do znacznie lepiej poznanego zjawiska biodegradacji MCs) w jeziorach z dominacją szczepów sinic produkujących CYN, może zachodzić również proces mikrobiologicznej utylizacji tych metabolitów wtórnych

Załącznik 1

Interakcje sinic z roślinami wodnymi

Niezwykle ważnym kierunkiem badań dotyczącym funkcjonowania toksycznych szczepów sinic w naturalnych ekosystemach jest ich oddziaływanie z roślinami wodnymi. Produkcja i wydzielanie związków allelopatycznych przez wodne rośliny naczyniowe jest jedną ze strategii umożliwiających współzawodnictwo z fitoplanktonem o podstawowe źródła związków mineralnych, a także o światło. Wśród związków allelochemicznych uwalnianych przez rośliny wodne są także związki polifenolowe, powodujące m.in. zahamowanie wzrostu sinic, jednakże mechanizm tego procesu nie został szczegółowo poznany. W kilku pracach zrealizowanych w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin (m.in. Dziga et al., 2007, 2009) przeprowadzone zostały badania nad: możliwym wpływem roślin wodnych na produkcję MCs i ich uwalnianie do środowiska oraz mechanizmami hamowania wzrostu sinic przez fenole roślinne. Głównym postawionym pytaniem był wpływ obecności związków fenolowych na uwalnianie toksyn (MCs) z komórek sinic do środowiska zewnętrznego. W pracy Dziga et al. (2007) potwierdzono, że obecność fenoli roślinnych powoduje zahamowanie wzrostu *Microcystis aeruginosa*, lecz przy wyższych stężeniach tych związków zachodzi liza komórek sinic, co skutkuje uwolnieniem dużych ilości toksyn do środowiska zewnętrznego. To wskazuje, że potencjalne użycie tego typu związków allelochemicznych w celu kontroli wzrostu sinice może być problematyczne.

W badaniach nad mechanizmem hamowania wzrostu sinic (Dziga et al., 2007 i 2009) wykazano, że toksyczny szczep *M. aeruginosa* posiada zdolność do syntezy alkalicznej fosfatazy, aminopeptydazy leucynowej oraz glikozydazy. Enzymy te, wydzielane do środowiska zewnętrznego umożliwiają zwiększenie dostępności związków mineralnych pochodzących z resztek organicznych obecnych w wodzie. Ponadto, analiza aktywności tych enzymów w obecności fenoli roślinnych pozwoliła stwierdzić, że pyrogalol i hydrochinon hamują aktywność powyższych enzymów; w najwyższym stopniu aktywność aminopeptydazy leucynowej. Wykazany niekompetycyjny charakter inhibicji sugeruje, że polifenole mogą modulować (obniżyć) aktywność wielu innych enzymów zewnątrzkomórkowych sinic i w ten sposób zmieniać ich zdolność do konkurencji w środowisku naturalnym. Ponadto wykazano także, że testowane polifenole powodują ograniczenie natężenia fotosyntezy sinic, co może być równoległym działaniem limitującym rozwój kolonii. Tego typu oddziaływania roślin wyższych z fitoplanktonem mogą być skuteczną strategią ograniczenia rozwoju toksycznych zakwitów podejmowaną przez rośliny wodne.

Załącznik 1

Toksyczność MC-LR wobec ludzkich keratynocytów

Innym tematem podejmowanym w naszym laboratorium były badania toksyczności MC-LR wobec ludzkich keratynocytów, przeprowadzone we współpracy z Zakładem Biologii Komórki UJ (Kozdeba et al., 2014). MCs po dostaniu się do organizmu człowieka mają szczególnie negatywny wpływ na komórki hepatocytów (ze względu na szybki transport toksyn do wątroby), jednakże udokumentowana jest też toksyczność MCs wobec innych organów takich jak nerki czy płuca. Skóra stanowi największą powierzchniowo barierę ochronną, a ponieważ epidermalne keratynocyty mogą być bezpośrednio narażone na kontakt z toksynami sinicowymi, podjęto się zadania sprawdzenia czy MC-LR może wpływać na właściwości tego typu komórek.

W szczególności, został przebadany wpływ MC-LR na procesy niezbędne w prawidłowym funkcjonowaniu i regeneracji skóry, takie jak żywotność i ruchliwość keratynocytów oraz strukturę cytoszkieletu. Ogólnie mówiąc, zewnętrzna warstwa epidermy chroni ją przed penetracją toksycznych substancji obecnych w środowisku zewnętrznym. MCs generalnie słabo przenikają do komórek skóry podczas kontaktu z zanieczyszczoną wodą. Jednakże, ich lipofilowy charakter może ułatwiać taką penetrację. W cytowanej pracy wykazano niewysoki stopień przenikania MCs (w stężeniu 10 mM) do komórek keratynocytów po dłuższym czasie ekspozycji, co prawdopodobnie miało wpływ na obserwowane spowolnienie proliferacji, mające charakter zależny od dawki. Zahamowanie proliferacji było ponadto tylko częściowo odwracalne po usunięciu toksyny ze środowiska, co może być istotne w przypadku krótkiej ekspozycji zranionej skóry na wysokie dawki MCs. To wskazuje, że tego typu oddziaływanie może przekładać się na późniejsze negatywne efekty i opóźnienie procesów naprawczych. W przypadku kontaktu z uszkodzoną skórą taka penetracja jest możliwa, co ułatwia bezpośredni dostęp toksyn do głębszych warstw. Komórki podstawne są z kolei bardziej wrażliwe na zakłócenia homeostazy. Komórki badane w naszym układzie eksperymentalnym stanowią populację tworzącą warstwę odnawialną epidermy, więc w stanie homeostazy mogą być odporne na obecność niewielkich ilości toksyn, ale w patologicznych przypadkach (przy uszkodzonej skórze) procesy opisane w pracy mogą zachodzić.

Ruchliwość komórek epidermalnych jest jedną z kluczowych ich cech umożliwiających regenerację, czy prawidłowe procesy dojrzewania komórek. Zostało wykazane, że MC-LR znacząco wpływa na migrację ludzkich keratynocytów jedynie w przypadku wysokich stężeń toksyny (50 mM), które są raczej niespotykane w środowisku naturalnym. Co szczególnie interesujące, w ramach naturalnej heterogeniczności populacji badanych komórek, zaobserwowano występowanie dwóch subpopulacji, z których jedna wykazywała specyficzną

Załącznik 1

wrażliwość na obecność MC-LR, objawiającą się zahamowaniem migracji. Analiza morfologii tej subpopulacji keratynocytów wykazała, że komórki reagujące na toksynę są znacząco większe, natomiast populacja mniejszych keratynocytów, odpowiedzialna za procesy regeneracyjne, była bardziej odporna na MC-LR.

W publikacji wykazano ponadto po raz pierwszy silny wpływ MC-LR na cytoszkielet aktynowy keratynocytów (obserwowany po 24 h ekspozycji na 10 mM stężenia MC-LR). Uwidoczniona depolimeryzacja F-aktyny, obkurczenie komórek i tworzenie pęcherzyków na powierzchni mogą tłumaczyć wyniki opisane powyżej (zmiany żywotności, ruchliwości i morfologii komórek). Odpowiednia organizacja cytoszkieletu aktynowego wymaga precyzyjnej regulacji dynamiki procesów fosforylacji i defosforylacji strukturalnych i enzymatycznych białek, co jest regulowane przez aktywność fosfataz serynowo-treoninowych typu 1 i 2A (Toivola and Eriksson, 1999). MC-LR może być potencjalnym inhibitorem tego typu fosfataz, wpływając w ten sposób na organizację cytoszkieletu, co w konsekwencji może zmieniać ich ruchliwość. Jednakże ten hipotetyczny mechanizm oddziaływania MC-LR na keratynocyty wymaga dalszych badań.

W ramach projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (4905/PO6/2001/20) autor prowadził także badania nie związane z tematyką toksyn sinicowych, dotyczące korzeniowej absorpcji jonów wodoro-węglanowych przez system korzeniowy pomidorów. Poprzez ryzosferę rośliny naczyniowe mogą pozyskiwać pewne ilości rozpuszczalnych związków węgla (DIC), co może znacząco wpływać na całkowitą produkcję biomasy. W naszych pracach testowano wpływ DIC oraz związków azotu na skład tzw. soku ksylemowego siewek pomidora w ich wczesnych fazach rozwoju (Bialczyk et al., 2004). Ponadto, długotrwały efekt tego typu nawożenia był analizowany pod kątem składu węglowodanów (cukrów redukujących, sacharozy i skrobi) oraz wolnych aminokwasów akumulowanych w liściach oraz korzeniach siewek pomidora (Bialczyk et al., 2005, 2007).

Wykonane w naszym laboratorium analizy wykazały istotny wpływ wzbogaconej w jony wodoro-węglanowe pożywki na wzrost produkcji i akumulacji związków organicznych przez rośliny. Zważywszy na to, że CO₂ jest jednym z głównych czynników ograniczających natężenie procesu fotosyntezy, podniesienie przyrostu biomasy poprzez podwyższenie karboksylacji w systemie korzeniowym może okazać się niezwykle skutecznym sposobem wzrostu produktywności roślin.

6. Obecne badania

W ramach obecnie prowadzonych prac badawczych realizowane są dwa projekty finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (programy OPUS). Fundusze pozyskane z tego tytułu umożliwiły powołanie nowego zespołu badawczego (1 etat naukowy oraz ufundowanie dwóch stypendiów dla młodych naukowców). Ponadto, do prac określonych w projekcie włączeni zostali badacze z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz z Åbo Akademi University w Turku.

Pierwszy z projektów, zatytułowany „Nowa propozycja eliminacji toksyn sinicowych z wykorzystaniem bakterii modyfikowanych genetycznie” zakłada poszerzenie wiedzy mającej na celu skonstruowanie efektywnych bioreaktorów usuwających skutecznie MCs oraz modyfikacje genetyczne naturalnie występujących szczepów bakteryjnych w celu podniesienia aktywności wobec MCs. W ramach projektu prowadzone są prace nad uzyskaniem wysokiej ekspresji MlrA w celu efektywnej produkcji i oczyszczenia tego enzymu. Wraz z pracownikami Zakładu Biotechnologii Roślin UJ a także Zakładu Biochemii Analitycznej UJ projektowane są konstrukty z różnymi metkami, które mają umożliwić znalezienie efektywnej metody oczyszczania białka.

Oprócz tego, prowadzone są prace nad wprowadzeniem genu *mlrA* do dzikich szczepów bakteryjnych w celu podniesienia aktywności wobec MCs szczepów posiadających naturalną zdolność do degradacji MCs. Jak dotychczas wykonano część tego etapu polegającą na wbudowaniu *mlrA* do genu 16S rDNA. W następnej kolejności zostanie podjęta próba homologicznej rekombinacji przez wprowadzenie tak zaprojektowanego konstruktu do szczepu z rodzaju *Sphingomonas*.

Równolegle do prowadzonych działań testowane są różnorodne bioreaktory kolumnowe, które mają służyć do szybkiej eliminacji toksyn z wody. W tym celu badane jest działanie reaktorów z różnymi złożami, na których immobilizowane są komórki bakteryjne z nadekspresją *mlrA* jak też złoża z immobilizowanym białkiem MlrA. W tym ostatnim przypadku uzyskano nadzwyczaj skutecznie działający bioreaktor kolumnowy z enzymem unieruchomionym na materiale celulozowym.

Drugi projekt badawczy realizowany w ramach programu OPUS (tytuł „Analiza alternatywnych mechanizmów biodegradacji toksyn sinicowych”) został rozpoczęty w 2015 roku. Celem projektu jest szczegółowe zbadanie procesów biodegradacji CYN oraz alternatywnych procesów degradacji MCs. Poszczególne cele obejmują: pozyskanie szczepów posiadających zdolność do degradacji wymienionych toksyn i ich identyfikację

Załącznik 1

filogenetyczną, zidentyfikowanie nowych produktów degradacji toksyn, oraz rozpoznanie genów i enzymów odpowiedzialnych za procesy biodegradacji.

Do najciekawszych wyników należą te uzyskane ramach współpracy z polską grupą biorącą udział w programie European Multi Lake Survey. Dzięki tej współpracy możliwe było pozyskanie prób środowiskowych z różnorodnej lokalizacji w Polsce. Na bazie prób ze zbiorników wodnych, w których obecnie lub w niedalekiej przeszłości obserwowano toksyczne zakwity sinic przeprowadzono testy potencjalnej zdolności do biodegradacji MCs. Niespodziewanie uzyskano nadzwyczaj ciekawe wyniki wskazujące na istnienie w większości analizowanych prób szczepów bakteryjnych zdolnych do rozkładu MCs. Ponadto, udało się zidentyfikować kilka pochodnych cyklicznej MC, które wskazują, że szlaki biodegradacji mikrocytyn są odmienne od tych wcześniej znanych.

Oprócz dwóch wymienionych powyżej projektów warto zwrócić uwagę na realizację pod moją opieką Studenckiego Projektu Badawczego finansowanego w ramach programu KNOW, który jest obecnie realizowany na WBBiB UJ. Celem projektu jest poznanie podstaw mechanizmu biodegradacji toksyn sinicowych – mikrocytyn (MCs) poprzez analizę ekspresji białek uczestniczących w rozkładzie tych cząsteczek. Jak dotychczas nie jest udokumentowane, czy MCs, jako związki organiczne wykorzystywane przez bakterie do odżywiania, mogą stymulować ekspresję białek uczestniczących w hydrolizie tych heptapeptydów. Z tego powodu podjęta została próba analizy ekspresji białek bakteryjnych w sytuacji stymulacji substratem – MCs. Poszczególne cele projektu obejmują m.in. analizy stymulacji wzrostu bakterii w obecności MCs jako substratu oraz testy ekspresji białek związanych z biodegradacją MCs metodą elektroforezy dwukierunkowej.

Literatura

- Svircev, Z., Krstic, S., Miladinov-Mikov, M. *et al.* (2009) Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 27: 36-55.
- Chorus, I., Bertram, J. WHO Toxic cyanobacteria in water - a guide to their public health - consequences, monitoring and management. E & FN SPON: New York, NY, USA, 1999, p416.
- Kankaanpaa, H.T., Holliday, J., Schroder, H. *et al.* (2005) Cyanobacteria and prawn fanning in northern New South Wales, Australia - a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 243-256.
- Bialczyk, J., Kochanowski, A., Czaja-Prokop, U., Chrapusta, E. Removal of microcystin-LR from water by polymers based on N-vinylformamide structure. *Water Science and Technology – Water Supply*, 14(2): 230-237.
- Długosz, M., Kwiecień, A., Żmudzki, P. *et al.* (2015). A hybrid adsorbent/visible light photocatalyst for the abatement of microcystin-LR in water. *Chem Commun* 51(36): 7649-52.
- Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L. *et al.* (1996) Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (11), 4086–4094.

Załącznik 1

- Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J. *et al.* (2001) Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology*, 16 (6), 523–534.
- Dziga, D., Wasylewski, M., Wladyka, B. *et al.* (2013) Microbial degradation of microcystins. *Chemical Research in Toxicology*, 26 (6), 841–852.
- Lemes, G.A.F., Kersanach, R., Pinto, L.D. *et al.* (2008) Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69 (3), 358–365.
- Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A. (2009) Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (21), 6924–6928.
- Yang, F., Zhou, Y., Yin, L. *et al.* (2014) Microcystin-degrading activity of an indigenous bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* MC-LTH2 isolated from Lake Taihu. *PLoS One*, 9 (1), e86216.
- Bourne, D.G., Blakeley, R.L., Riddles, P. *et al.* (2006) Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Research*, 40 (6), 1294–1302.
- Tsuji, K., Asakawa, M., Anzai, Y. *et al.* (2006) Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake. *Chemosphere*, 65 (1), 117–124.
- Ho, L., Meyn, T., Keegan, A. *et al.* (2006) Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Water Research* 40 (4), 768–774.
- Li, J., Shimizu, K., Maseda, H. *et al.* (2012) Investigations into the biodegradation of microcystin-LR mediated by the biofilm in wintertime from a biological treatment facility in a drinking-water treatment plant. *Bioresource Technology*, 106, 27–35.
- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K. *et al.* (2013) Determination of microcystin-LR degrading gene *mlrA* in biofilms at a biological drinking water treatment facility. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 7, 22–35.
- Ho, L., Tang, T., Monis, P.T. *et al.* (2012) Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere*, 87 (10), 1149–1154.
- Okano, K., Shimizu, K., Kawauchi, *et al.* (2009) Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. *Journal of Toxicology*, 2009 (8).
- Wang, J., Wu, P., Chen, J., Yan, H. (2010) Biodegradation of microcystin-RR by a new isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Chin. J. Chem. Eng.* 18, 1-5.
- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K. *et al.* (2012). Enzymatic pathway for biodegrading microcystin LR in *Sphingopyxis* sp. C-1. *J. Biosci. Bioeng.* 114, 630-634.
- Bohuslavek, J., Payne, J.W., Liu, Y., *et al.* (2001) Cloning, sequencing, and characterization of a gene cluster involved in EDTA degradation from the bacterium BNC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 688-695.
- Szweda, P., Kotłowski, R., Kur, J. (2005) New effective sources of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin. *J. Biotechnol.* 117, 203-213.
- Harada, K., Imanishi, S., Kato, H. *et al.* (2004) Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, 44 (1), 107–109.
- Hashimoto, E.H., Kato, H., Kawasaki, Y. *et al.* (2009) Further Investigation of microbial degradation of microcystin using the advanced Marfey method. *Chemical Research in Toxicology*, 22 (2), 391–398.
- Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M. *et al.* (2005) Bacterial degradation of microcystins and nodularin. *Chemical Research in Toxicology*, 18 (3), 591–598.
- Harada, K.I. Chemistry and detection of microcystins (1996) in: Watanabe, M.F., Harada, K.I., Carmichael, W.W., Fujiki, H., Eds.; Toxic Microcystis, CRC Press: Boca Raton, Floryda, pp. 103–148.
- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K. *et al.* (2011) How microcystin-degrading bacterium expresses degradation activity. *Lakes Reserv. Res. Manage.* 16: 169-178.
- Nybom, S.M., Salminen, S.J., Meriluoto, J.A. (2007) Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 270 (1), 27–33.
- Nybom, S.M., Collado, M.C., Surono, I.S. *et al.* (2008) Effect of glucose in removal of microcystin-LR by viable commercial probiotic strains and strains isolated from dadih fermented milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (10), 3714–3720.

Załącznik 1

- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 76, 217-46.
- Ishii, H., Nishijima, M., Abe, T. (2004) Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Research*, 38 (11), 2667–2676.
- Sumino, T., Ogasawara, T., Park, H.D. 2008. Patent application: Method and equipment for treating microcystin-containing water. [US 7,425,267 B2].
- Ji, R.P., Lu, X.W., Li, X.N. *et al.* (2009) Biological degradation of algae and microcystins by microbial enrichment on artificial media. *Ecological Engineering*, 35 (11), 1584–1588.
- Ripp, S., Nivens, D. E., Ahn, Y. *et al.* (2000) Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environ. Sci. Technol.* 34: 846–853.
- Trögl J, Chauhan A, Ripp S, *et al.* (2012) *Pseudomonas fluorescens* HK44: lessons learned from a model whole-cell bioreporter with a broad application history. *Sensors* (Basel). 12 (2), 1544-71.
- Cao L, Wang Q, Zhang J, *et al.* (2012) Construction of a stable genetically engineered rhamnolipid-producing microorganism for remediation of pyrene-contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012 28 (9), 2783-90.
- Singh K, Chandra S. (2014) Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: a review. *Pak J Biol Sci.* 17 (1), 1-8.
- Li Q, Wang P, Chen R, *et al.* (2014) Construction of genetically engineered bacteria that degrades organophosphorus pesticide residues and can be easily detected by the fluorescence. *Environ Technol.* 35 (5-8), 556-61.
- Jacobs, L.C.V., Peralta-Zamora, P., Campos, F.R., Pontarolo, R. Photocatalytic degradation of microcystin-LR in aqueous solutions. *Chemosphere* 2013, 90, 1552–1557
- Ame, M.V., Echenique, J.R., Pflugmacher, S. *et al.* (2006) Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba - Argentina). *Biodegradation*, 17 (5), 447–455.
- Zhang, M., Pan, G., Yan, H. (2010) Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Journal of Environmental Science*, 22 (2), 168–175.
- Edwards, C., Graham, D., Fowler, N., Lawton, L.A. (2008) Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere*, 73 (8), 1315–1321.
- M. Kokociński, D. Dziga, L. Spoof, K. *et al.* (2009) First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. *Chemosphere*, 74: 669-675.
- Dziga, D., Kokocinski, M., Maksylewicz, A. *et al.* (2016) Cylindrospermopsin Biodegradation Abilities of *Aeromonas* sp. Isolated from Rusalka Lake. *Toxins*, 8, 55.
- Dziga, D., Suda, M., Bialczyk, J. *et al.* (2007) The alteration of *Microcystis aeruginosa* biomass and dissolved microcystin-LR concentration following exposure to plant-producing phenols. *Environmental Toxicology*, 22 (4), 341-346.
- Dziga, D., Goral, T., Bialczyk, J., Lechowski, Z. (2009) Extracellular enzymes of the *Microcystis aeruginosa* PCC 7813 strain are inhibited in the presence of hydroquinone and pyrogallol, allelochemicals produced by aquatic plants. *Journal of Phycology*, 45, 1299–1303.
- M. Kozdeba, J. Borowczyk, E. Zimolag, M. *et al.* (2014) Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes. *Toxicol*, 80, 38-46.
- Toivola, D.M., Eriksson, J.E., (1999) Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicol in Vitro* 13, 521-530.
- J. Bialczyk, Z. Lechowski, D. Dziga. Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with HCO₃⁻ and nitrogen source as NO₃⁻ or NH₄⁺. *Plant and Soil* 2004, 263(1-2) 265-272.
- Bialczyk, J., Lechowski, Z., Dziga, D. (2005) Carbohydrate and free amino acid levels in tomato plants grown in media with bicarbonate and nitrate or ammonium. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4A): 523-529
- Bialczyk, J., Lechowski, Z., Dziga, D. (2007) Fruit yield of tomato cultivated on media with bicarbonate and nitrate/ammonium as the nitrogen source. *Journal of Plant Nutrition*, 30(1): 149-161.