

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání – Biologie se zaměřením na vzdělávání



Pavčina Těšínská

***Raphidiopsis raciborskii* – hlavní producent cylindropermopsinu**
***Raphidiopsis raciborskii* – the main producer of cylindropermopsin**

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Yvonne Němcová, PhD.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis:

Poděkování

Děkuji především své školitelce doc. RNDr. Yvonne Němcové, PhD. za vedení práce, velikou trpělivost a spoustu cenných rad, oprav a připomínek, které mi při psaní práce poskytla. Také děkuji své rodině, za jejich trpělivost a neustálou motivaci k dokončení práce.

Abstrakt

Raphidiopsis raciborskii je globálně rozšířený druh sinice, který tvoří vodní květ a který se v posledních dvaceti letech nalézá stále častěji ve sladkovodních lokalitách mírného pásma, což je pozoruhodná expanze z původně tropických oblastí. Schopnost tohoto druhu produkovat zdraví nebezpečné cyanotoxiny, cylindrospermopsin a saxitoxin, z ní dělá stále častěji zkoumanou sinici. Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o *Raphidiopsis raciborskii*, především z oblastí ekologie a fyto geografie tohoto druhu, a také dostupné informace o cyanotoxinu cylindrospermopsinu, který *R. raciborskii* vedle dalších druhů sinic produkuje. U cylindrospermopsinu se zaměřuji hlavně na chemickou strukturu této molekuly, biosyntézu, toxicitu, metody detekce a metody odstranění z pitné vody.

Klíčová slova: biogeografie, cylindrospermopsin, *Cylindrospermopsis raciborskii*, toxicita, toxiny sinic, *Raphidiopsis raciborskii*, zdravotní rizika

Abstract

Raphidiopsis raciborskii is a globally widespread bloom producing cyanobacteria that has been observed more frequently in temperate freshwater locations in previous twenty years, which is a considerable expansion regarding its original occurrence in tropical regions. The ability to produce health-threatening toxins, cylindrospermopsin (CYN) and saxitoxin, places this species to the centre of scientific research. The goal of this bachelor's thesis is to sum up the current knowledge on *Raphidiopsis raciborskii*, concerning mainly its ecology and phytogeography, and also to provide information about cyanotoxin cylindrospermopsin, which can be produced by *R. raciborskii* and also by other cyanobacteria species. Regarding cylindrospermopsin, I mainly focused on the chemical structure of the molecule, its biosynthesis, toxicity, methods of CYN detection and removal from drinking water.

Keywords: biogeography, cylindrospermopsin, *Cylindrospermopsis raciborskii*, toxicity, cyanotoxins, *Raphidiopsis raciborskii*, health risk

Seznam použitých zkratk

ITS = internal transcribed spacer

MC = mikrocystin

STX = saxitoxin

CYN = cylindrospermopsin

PSP = paralytic shellfish poison

PKSs = polyketidsyntasa

NRPS = nonribosomální peptidová syntetasa

ALP = alkalická fosfatasa

ROS = reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

kb = kilobase (= 1000 párů bází DNA, či RNA)

MTF = methyltransferasa

PAPS = fosfoadenosinfosulfát

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

LC = průtoková chromatografie (Liquid Chromatography)

MS = hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

PDA = fotodiodové pole (Photodiode Array)

SPE = extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)

ELISA = (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay)

Obsah

1. Úvod	1
2. <i>Raphidiopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Aguilera, Berrendero, Gornez, Kaštovský, Echenique & Salerno	2
2.1 Ekofyziologie a ekologie <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	3
2.2 Fylogeografie	6
2.3 Toxiny <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	8
3. Cylindrospermopsin	9
3.1 Historie	9
3.2 Chemická struktura CYN	10
3.3 Biosyntéza CYN	12
3.4 Metody detekce CYN	13
3.5 Další producenti CYN	15
4. Toxicita	15
4.1 Toxicita u zvířat a bioakumulace v potravním řetězci	16
4.2 Toxicita u lidí	18
4.3 Odstranění z prostředí a degradace	18
4.4 Odstranění CYN z pitné vody	19
5. Závěr	21
6. Reference	23

1. Úvod

Vodní květ je okem pozorovatelné přemnožení řas a sinic, kdy se ve vodním sloupci nahromadí velké množství těchto organismů. Tento jev je možné pozorovat především u tzv. eutrofizovaných vod, které obsahují hodně živin, především dusíku a fosforu. U nás jsou to například chovné rybníky, do kterých je jednak splachována voda z polí s vysokým podílem organických hnojiv, jednak dodáváno krmení s cílem zvýšení produkce ryb.

Sinice se udržují v optimální hloubce vodního sloupce díky aerotopům (plynným vezikulům). Tato potřeba vychází z autotrofního způsobu života, kdy k vykonávání fotosyntézy potřebují zachytávat sluneční záření o určitých vlnových délkách a intenzitě, ale zároveň mají potřebu vstřebávat živiny z okolního prostředí. V případě, že se buňkám dostává pouze malá intenzita světla, začnou tvořit více aerotopů, čímž stoupají k vodní hladině. Tím se zvýší rychlost fotosyntézy a v buňkách se začínají hromadit nízkomolekulární cukry, čímž se v buňkách zvýší turgor. Po překročení určité kritické hodnoty turgoru dojde ke kolapsu aerotopů a buňky klesají vodním sloupcem do míst, kde nízká intenzita světla povede znovu ke tvorbě aerotopů. Některé druhy sinic mohou tvořit škrobová zrna, která sama o sobě přidávají buňkám na hmotnosti a donutí je klesnout i bez kolapsu aerotopů (Kromkamp et al. 1986). Odumřelé buňky klesají až na dno vodní plochy a tam se rozkládají za spotřeby kyslíku. Tím tvoří v blízkosti dna hypoxickou až anoxickou zónu, která není slučitelná se životem většiny organismů, například ryb v chovných rybnících.

Úspěšnost vláknitých sinic je též dána možností tvorby dvou typů specializovaných buněk, tzv. heterocytů a akinet. Heterocyty jsou specializované buňky, obsahující enzym nitrogenázu, který katalyzuje fixaci vzdušného dusíku N_2 za spotřeby chemické energie ATP. Akinety jsou nepohyblivá klidová stádia. Tvoří se dělením buněk sinice v nepříznivých podmínkách a obsahují velká množství živin. Oproti vegetativním buňkám mají velmi ztlustělé buněčné stěny, díky kterým mohou přežívat životaschopné až několik desítek let.

Sinice jsou předmětem zkoumání hlavně z důvodu tvorby nejen člověku životně nebezpečných toxinů, tzv. cyanotoxinů, schopnosti invazivně se šířit do nových vodních ploch a schopnosti přežívat i za nepříznivých podmínek. Ve vodách s vysokým obsahem živin může snadno docházet k jejich přemnožení a případně k produkci cyanotoxinů. Výzkum cyanotoxinů se zaměřuje především na mikrocystiny a saxitoxiny.

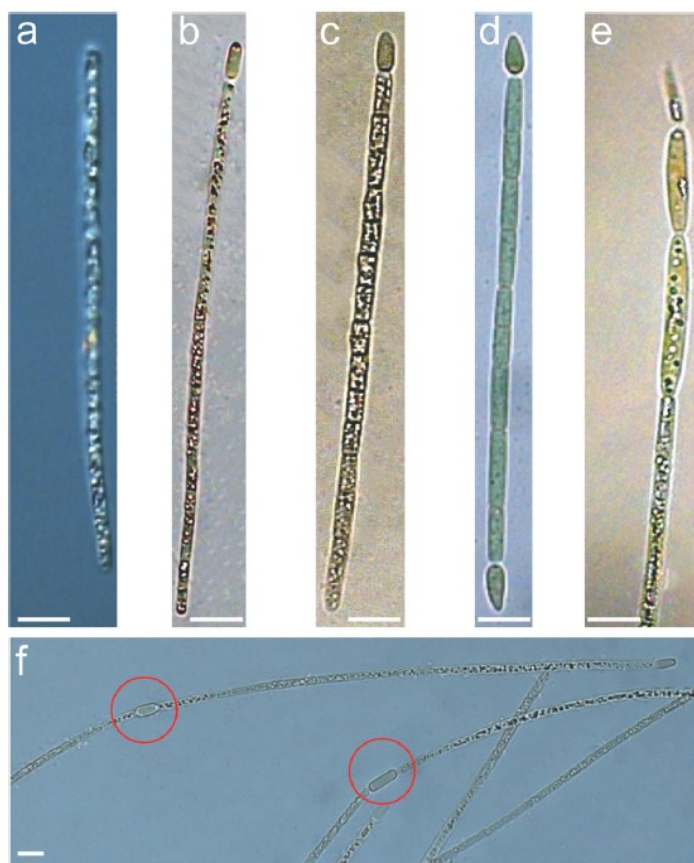
Ve své bakalářské práci se zabývám sinicí *Raphidiopsis raciborskii* a též cyanotoxiny, které mohou buňky tohoto druhu potenciálně produkovat, především cylindrospermopsinem. Aktuálně je *R. raciborskii* jednou z nejvíce zkoumaných sinic, jelikož populace tohoto druhu

byly nalezeny na téměř všech kontinentech a zkoumané cyanotoxiny produkované těmito populacemi mohou způsobovat vážné otravy.

2. *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera, Berrendero, Gornez, Kaštovský, Echenique & Salerno

Raphidiopsis raciborskii (synonymum *Cylindrospermopsis raciborskii*) patří mezi sladkovodní sinice (Cyanobacteria) řádu Nostocales, čeledi Aphanizomenonaceae, pro které jsou charakteristické vláknité mnohobuněčné stélky. Délka vláken se pohybuje v rozmezí 60-200 µm. Hlavním znakem, který odlišuje *R. raciborskii* od ostatních druhů ze stejné čeledi, jsou heterocyty, které se tvoří asymetricky a pouze z terminálních buněk, dále pak specifické aerotopy (plynové vezikuly), tvar trichomů (nijak se nestáčí, ani neohýbají a poměr délka/šířka buněk je zachován) a pozice, kde se oddělují akinety (Horecká & Komárek 1979). *Raphidiopsis raciborskii* se vyznačuje pantropickým rozšířením, zatímco nejbližší příbuzné druhy jsou rozšířeny pouze v tropických oblastech (Vico et al. 2020).

Tato sinice byla popsána v roce 1912 jako *Anabaena raciborskii* Woloszynska. Už tehdy zaznamenala Woloszynska jako hlavní znak tvorbu terminálních heterocytů a dva morfotypy, z nichž jeden měl rovná vlákna a druhý mírně stočená. V roce 1923 popsal Miller nový rod *Anabaenopsis*, který byl charakterizován asymetrickým buněčným dělením a následnou tvorbou heterocytů z terminálních buněk a přeradil *Anabaena raciborskii* do tohoto rodu, vznikla nová kombinace *Anabaenopsis raciborskii* (Miller 1923). V roce 1972 Seenayya a Subba Raju přeradili druh *Anabaenopsis raciborskii* do rodu *Cylindrospermopsis*. Jako hlavní znak označili tvorbu heterocytů z terminálních apikálních buněk (Komárková 1972). Studie z roku 2018 ale nově sjednotila rody *Cylindrospermopsis* a *Raphidiopsis* za použití molekulární analýzy genů 16S rRNA a vyvrácení jejich prakticky jediného morfologického rozdílu, kterým byla tvorba heterocytů v životním cyklu *Cylindrospermopsis* a naopak jejich absence u *Raphidiopsis*, v podmínkách in vitro (Aguilera et al. 2018). Starší rodové jméno *Raphidiopsis* bylo upřednostněno před mladším *Cylindrospermopsis*. Některé z morfologických variant trichomů *R. raciborskii* jsou zobrazeny na obrázku 1.



Obrázek 1 - trichomy *Raphidiopsis raciborskii* (kmen TAU-MAC 1414); (a): trichom bez heterocytu, (b): trichom zúžený na rozhraní susedných buniek, (c): trichom lehce zúžený na rozhraní susedných širokých ekologických valencebuniek, (d): trichom s terminálnymi heterocytami na oboch koncoch, (e): trichom se dvěma akinetami, (f): klidové stádium, trichom se dvěma vmezeřenými heterocytami; měřítko 10 μm ; převzato z Panou et al. (2018)

2.1 Ekofyziologie a ekologie *Raphidiopsis raciborskii*

První odběr *Raphidiopsis raciborskii* byl proveden na ostrově Java z menšího rybníku mezi lety 1899-1900, respektive již v roce 1887 v řece Nil, kde ale byl mylně identifikován jako *Cylindrospermum kaufmannii* (Padisák 1997). Vzorek z Javy byl následně v Polsku identifikován prof. Raciborskii, podle něhož se jmenuje. V té době nebyl určen jako toxický druh (Padisák 1997). Dnes se kromě jeho toxicity potvrzuje i globální rozšíření.

Pro autotrofní organismy bývají nejčastějšími limitujícími faktory teplota, režimy světla (délky cyklů světla a tmy, intenzita) a pro vodní organismy i specifické koncentrace esenciálních prvků. *Raphidiopsis raciborskii* dokáže tolerovat velkou škálu kombinací těchto tří faktorů. Široká ekologická valence je pravděpodobně hlavní příčinou kosmopolitního rozšíření. Úspěšnost tohoto druhu je přisuzována nízkým nárokům na intenzitu světla a též vysoké afinitě buněk k volně dostupnému fosforu ve vodě a schopnosti jej ukládat v buňkách (Piccini et al. 2011). Antunes et al. (2015) považují za hlavní dva důvody úspěšnosti *R. raciborski* fyziologickou plasticitu tohoto druhu a možnou existenci jeho různých ekotypů

(Antunes et al. 2015). Intenzita světla sice indukovala adaptivní změny ve vláknech *R. raciborskii*, ale v rozsahu 20-100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se jednalo pouze o morfologické změny jako prodloužení vláken (rozsah minimální délky vlákna od 132 μm do 200 μm) a průměrný větší objem jednotlivých buněk (rozsah od 414 μm^3 do 1406 μm^3). Při větší intenzitě osvětlení se také zvyšoval poměr karotenoidů k chlorofylu, a to až trojnásobně (Bonilla et al. 2012), pro *R. raciborskii* jsou typickými karotenoidy aphanizophyll a echinenon. Poloha ve vodním sloupci úzce souvisí s preferencí intenzity světla, u *Raphidiopsis raciborskii* se ukazuje, že je druh dominantní spíše u hladiny, pokud je v kompetici s jinými diazotrofičnými druhy (Yu et al. 2014).

Vzorky, které byly zkoumány ve studii Bonilla et al. (2012), prokázaly, že *Raphidiopsis raciborskii* je tolerantní vůči širokému rozmezí teplot a jeho procentuální zastoupení v biomase se signifikantně nemění napříč vodními plochami v oblastech tropických, subtropických a mírného pásma (Bonilla et al. 2012). Teploty vod v místech odběrů se pohybovaly od 11°C do 32°C. Při vyšších teplotách je spíše pozorován vodní květ, naopak při nižších teplotách jsou produkovány akinety (Antunes et al. 2015). Byla také vyslovena teorie, že v oblastech mírného pásma je největším selekčním tlakem nízká teplota, a tedy vyklíčí pouze vybrané akinety, které jsou toho při nižších teplotách schopné a pravděpodobně nějakým způsobem adaptované (Antunes et al. 2015).

Mezi limitující prvky patří u vodních organismů dusík a fosfor. S dusíkem umí *R. raciborskii* dobře hospodařit: střídá fixaci dusíku N_2 ze vzduchu s asimilací různých forem dusíku ve vodě rozpuštěného (jako jsou dusitany, dusičnany, močovina atd.) podle jeho aktuální dostupnosti (Moisander et al. 2012). Fosfor není pro *R. raciborskii* limitující faktor, jelikož zvládá růst i při jeho nízké dostupnosti (Bai et al. 2014). Důvodem je pravděpodobně vysoká afinita a možnost ukládat velké zásoby fosforu ve svých buňkách (Burford et al. 2016). Právě tento fakt může představovat evoluční výhodu oproti kompetičním druhům.

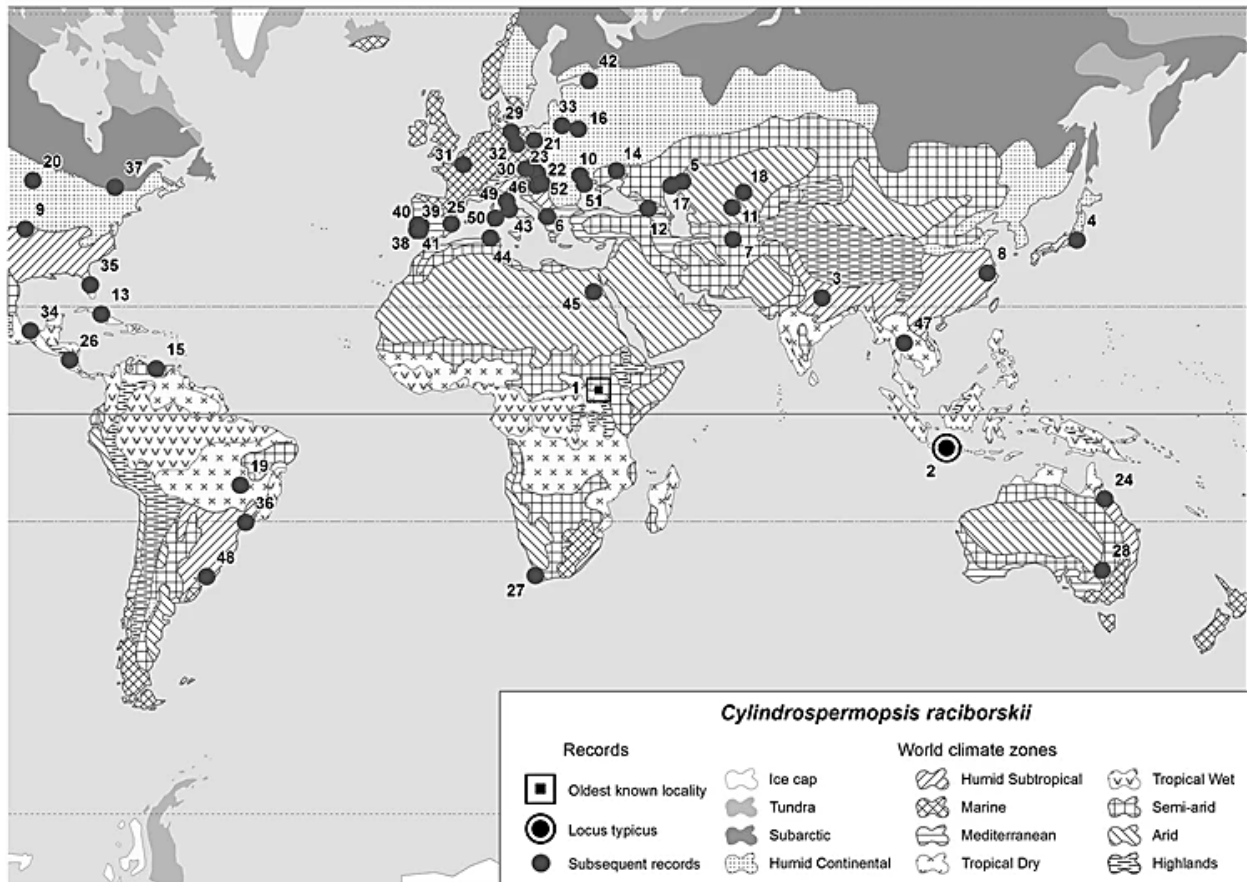
Dalším faktorem, který může činit *R. raciborskii* úspěšnějším, je produkce cyanotoxinu, cylindrospermopsinu. Je otázkou, zdali se toxin dá považovat za alelopatickou látku, protože není aktivně vylučován z buněk, ale na některé organismy (sinice rodu *Microcystis*) má tato látka inhibiční efekt (Rzymiski et al. 2014), zpomaluje jejich růst a nutí je vylučovat alkalickou fosfatasu (ALP), čímž si zajišťuje dostatek fosforu ve vodě (Antunes et al. 2015; Kokociński et al. 2017). Na druhou stranu na růst jiných fytoplanktonních organismů (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*) neměly zvýšené koncentrace CYN žádný významný vliv (Pinheiro et al. 2013). CYN ani analogy nejsou aktivně transportovány z buněk *R. raciborskii*

a do vodního prostředí se dostávají až lyzí buněk, tedy CYN spíše není alelopatickou látkou, pouze toxickou pro některé koexistující druhy (Davis et al. 2014).

Druh *Raphidiopsis raciborskii* preferuje sladké vody, popř. vody s velmi nízkou salinitou (Padisák 1997). Vysoká salinita inhibuje růst tohoto druhu, ale v brakických vodách je v případě zvýšené dostupnosti rozpuštěných minerálů a živin růstu schopný (Calandrino & Paerl 2011; Moisander et al. 2012).

Ideální hodnoty pH pro růst *Raphidiopsis raciborskii* se pohybují mezi 8,1 a 9,4, tedy jsou potřeba mírně zásadité podmínky (Bouvy et al. 1999). Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře vede ke snížení pH vodních ploch na základě rovnováhy tenze páry nad kapalinou, tedy rozpouštění CO₂ ve vodní ploše. Je tedy otázkou, jaký bude mít předpokládaný nárůst koncentrace CO₂ vliv na další expanzi *R. raciborskii* (Holland et al. 2012). Pierangelini et al. (2014) ale odmítají zvýšení koncentrace CO₂ jako vliv na zpomalení, či dokonce zamezení růstu a šíření *R. raciborskii*. Naopak usuzují, že globální oteplování bude mít přesně opačný následek a další expanze *R. raciborskii* je nevyhnutelná (Pierangelini et al. 2014).

2.2 Fylogeografie

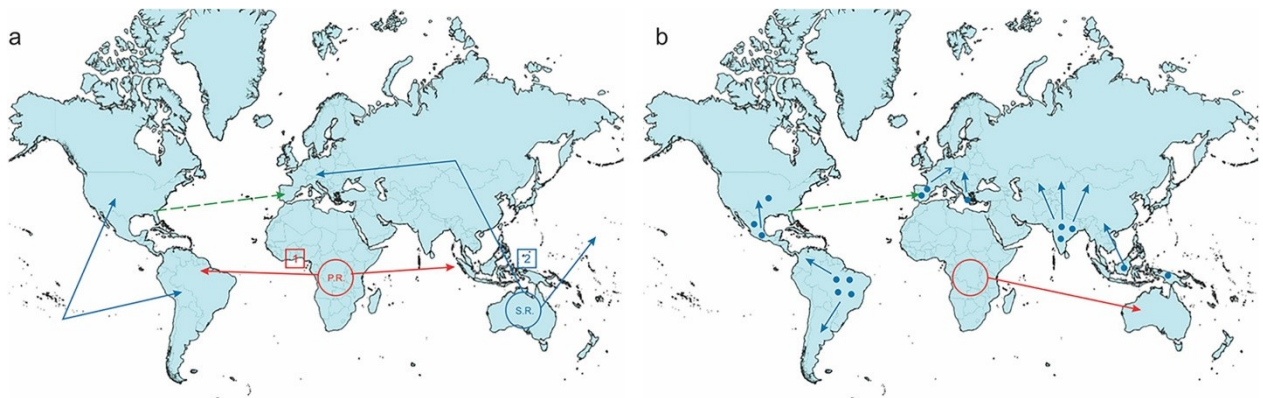


Obrázek 2 – Locus typicus a místa nálezů *Raphidiopsis raciborskii*; po sobě jdoucí čísla popisují pořadí nálezů (1 řeka Nil, 2 ostrov Java, 3 řeka Varanasi, 4 rybník Ganoike, 5 Kaspické moře); převzato z Wilk-Woźniak et al. (2016)

Raphidiopsis raciborskii obecně najdeme ve sladkých vodách, nejčastěji jezerech a rybnících. Prvotní nálezy ukazují na tropický původ (Padisák 1997), v posledních 30 letech ale invazivně osidluje i subtropické a mírné pásmo (Komárek & Komárková 2003). Výskyt z temperátních oblastí byl již potvrzen například v Polsku (Kokociński et al. 2009), Švédsku, Rusku (Sinha et al. 2012) a v Kanadě (Kling 2009). Zmapované nálezy jsou ukázané na obr. 2.

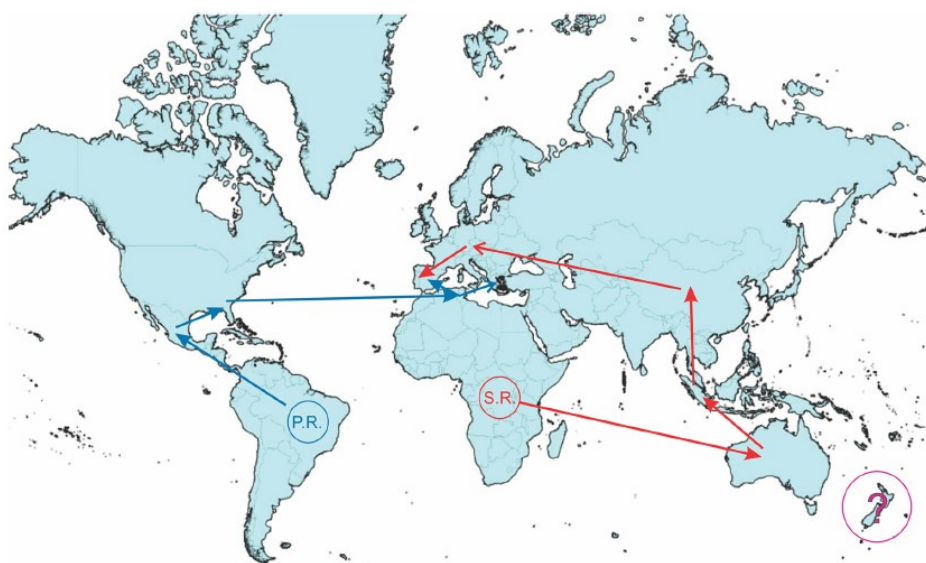
Fylogeografie *R. raciborskii* byla nejprve zkoumána podle ekofyziologických charakteristik, později na základě sekvenování různých molekulárních markerů. Samotná cesta, kterou se *R. raciborskii* globálně rozšířil, není stále zcela jasná, ale bylo vysloveno několik hypotéz. Nejnovější dvě představily studie Panou et al. (2018), viz obr. 3, a (Vico et al. 2020), viz obr. 4.

Na základě pozorování ekofyziologických charakteristik vyslovil Padisák teorii o expanzi *Raphidiopsis raciborskii* ze dvou míst původního výskytu, centrální Afriky a Austrálie, do Ameriky a Asie (viz. obr 3).



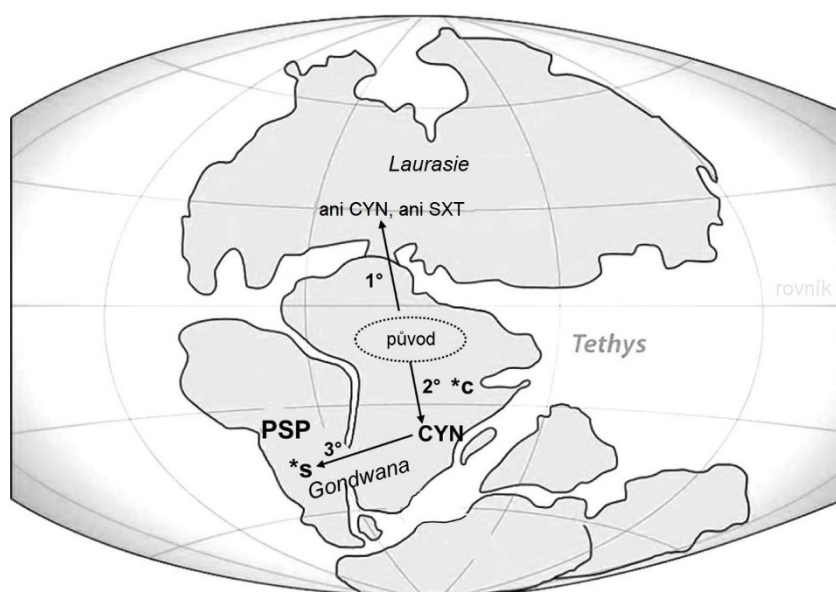
Obrázek 3 – a) cesty rozšíření *Raphidiopsis raciborskii* na základě ekofyziologických charakteristik navržené Padišák (1997) s primárním centrem výskytu (P.R.) v Africe a sekundárním centrem výskytu (S.R.) v Austrálii; b) cesty rozšíření *Raphidiopsis raciborskii* na základě fylogenetických markerů navržené Haande et al. (2008); převzato z Panou et al. (2018)

Na základě molekulárních markerů (16S rDNA, *cpcBA*-IGS, *nifH*, 16S-23S ITS, *rpoC1*) byly kmeny *Raphidiopsis raciborskii* nejprve rozděleny na americké, evropsko-asijské a australsko-africké (viz. obr. 3) (Haande et al. 2008), později na evropské, africko-australsko-asijské a americké biogeografické skupiny (Panou et al. 2018). Po prozkoumání většího souboru sekvenčních dat *R. raciborskii* se rýsuje podobnost mezi evropskými, asijskými a australskými kmeny (Moreira et al. 2011), přičemž již dříve byla zjištěna fylogenetická podobnost že afrických a australských kmenů. Kmeny *R. raciborskii* v Evropě jsou značně odlišné, tedy je pravděpodobné, že ty, které byly odebrány ze Španělska, Řecka a Tuniska, jsou původem z Ameriky, kdežto odběry z Bulharska, Portugalska, Německa a Francie obsahovaly kmeny původně asijské, tedy australské, resp. africké (Cirés et al. 2014; Gkelis & Zaoutsos 2014).



Obrázek 4 – Cesta rozšíření *Raphidiopsis raciborskii* z primárního centra výskytu v Jižní Americe do Severní Ameriky a části Evropy, a dále sekundárního centra výskytu v Africe a rozšíření tohoto kmenu *R. raciborskii* do Austrálie, Asie a části Evropy; převzato z Panou et al. (2018)

Vico et al. (2020) použili pro rekonstrukci cesty šíření *R. raciborskii* kromě genetických markerů také fenotypy toxicity ve vztahu ke genotypu daného kmenu (obr. 5). Za původní místo výskytu označili centrální Afriku, kde se nacházejí netoxické populace, s tím, že se v době Laurasie (geologické období trias, před 250–205 miliony let) druh rozšířil přes severní Afriku do dnešní Severní Ameriky a Evropy (Řecka). Druhá cesta rozšíření se odehrála v období křídý (před 150–100 miliony let) před rozdělením Gondwany přes subsaharskou Afriku do Austrálie, Asie a části Evropy. Kmeny, které se dnes nachází na Novém Zélandu, se tam pravděpodobně dostaly v pozdním oligocénu (před 25 miliony let) z Jižní Ameriky (Vico et al. 2020; Wood et al. 2014).



Obrázek 5 – Cesty rozšíření *Raphidiopsis raciborskii* z původního výskytu v Africe nejdříve do Laurasie (1), kde neprodukuje ani CYN, ani SXT, poté na jih Gondwany, do dnešní Oceánie (2), kde produkuje CYN a nakonec do dnešní Jižní Ameriky (3), kde produkuje PSP a analogy; upraveno podle Vico et al. (2020)

2.3 Toxiny *Raphidiopsis raciborskii*

Raphidiopsis raciborskii je hojně rozšířený druh s širokou ekologickou valencí. Na různých místech ale může produkovat různé toxiny. Nejnovější studie z roku 2020 (Vico et al. 2020) navrhuje různé ekotypy druhu *R. raciborskii*, které jsou ve všech místech výskytu selektovány environmentálními tlaky. *Raphidiopsis raciborskii* může produkovat cytotoxický cylindrospermopsin (CYN), který byl prokázán u kmenů sbíraných v Austrálii, v Jižní Americe, na Novém Zélandu a v Asii (Hawkins et al. 1985; Ohtani et al. 1992; De La Cruz et al. 2013) a o kterém dále pojednává následující kapitola, anebo neurotoxický saxitoxin (STX), který byl prokázán u kmenů nasbíraných v Jižní Americe (Miotto et al. 2017). U kmenů v Severní Americe, Africe a Řecku zatím žádný toxin prokázán nebyl (Vico et al. 2020), existuje pouze

jediný případ kmene *R. raciborskii* odebraného v Tunisku, kde byly u nalezeny fragmenty genového klastru pro produkci mikrocystinu (MC), toxin samotný ale tento kmen neprodukoval (Fathalli et al. 2011). Genové klastry kódující produkci cyanotoxinů mohl získat druh *R. raciborskii* horizontálním genovým transferem (Bolch et al. 1997; Dittmann et al. 2013), ale též existují hypotézy, že přenos mohl proběhnout rekombinací plasmidů (Christiansen et al. 2014). Zatím nebylo potvrzeno, že by některý z kmenů *R. raciborskii* produkoval více toxinů najednou (Vico et al. 2020).

3. *Cylindrospermopsin*

Cylindrospermopsin (CYN) je cyanotoxin, který se stal důležitým předmětem zkoumání především díky hojnému výskytu sinice *R. raciborskii*, ale též pro svou toxicitu a nebezpečné účinky na člověka a jiné organismy. Při požití či kontaktu s lidským organismem se toxin metabolicky aktivuje a může působit ve více místech organismu (cytotoxický, dermatotoxický, genotoxický, hepatotoxický a toxický při vývinu plodu) (Hawkins et al. 1985; Ohtani et al. 1992; Seifert et al. 2007; De La Cruz et al. 2013). Biologická role CYN je nejpravděpodobněji do jisté míry alelopatická, přítomnost CYN ve vodě způsobuje sekreci ALP jiných druhů fytoplanktonu, čímž se zvyšuje koncentrace anorganického fosfátu ve vodě (Bar-Yosef et al. 2010). CYN je převážně intracelulární, do prostředí se dostává až lyzí buněk (Davis et al. 2014).

3.1 Historie

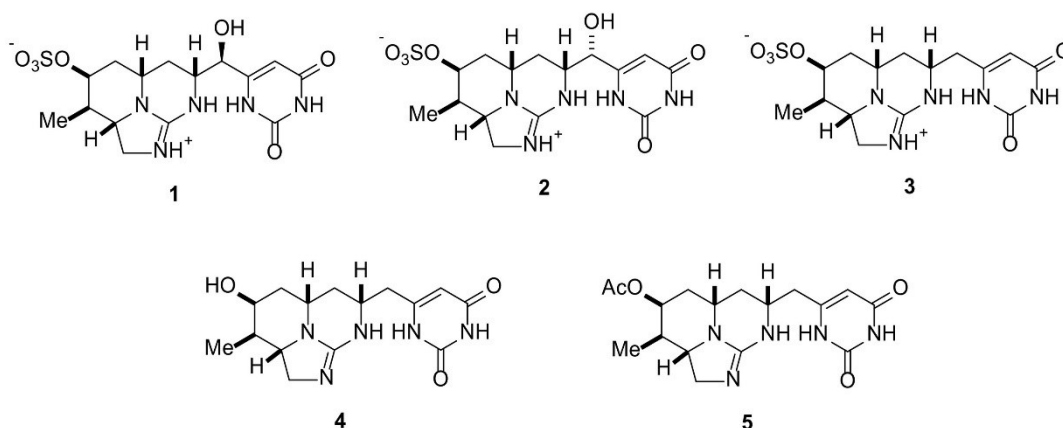
První zaznamenaný případ otravy způsobené CYN je datován do roku 1979, kde ve městě Palm Island v Austrálii muselo být hospitalizováno 148 lidí (138 z toho byli děti do 16 let). Jejich příznaky zahrnovaly nevolnost, zvracení, zvětšená játra, krvavé průjmy a hematurii. Původně byla tato událost publikována v *Medical Journal of Australia* doktorkou Susan Byth, která otravu přisuzovala nezralým plodům manga (Griffiths & Saker 2003). Později ale vyšetřování ukázalo, že pojátkem mezi pacienty je společný zdroj pitné vody, Solomon Dam, který v té době opticky ukazoval známky přemnožení sinic v podobě vodního květu, a též nepříjemného zápachu i chuti. Vodní květ byl odstraněn 1 ppm síranem měďnatým (CuSO₄), ale 5 dní poté byl evidován první případ sdruženého zánětu jater a tenkého střeva. Současně bylo zjištěno, že izolovanější skupina lidí u Palm Island, která využívala vodu ze studny, neměla žádné podobné příznaky záhadného onemocnění. Mezi lety 1981–1984 byly na přehradě studovány přítomné druhy sinic a jimi produkované látky. Studie zjistila přítomnost dříve

nevidovaného *R. raciborskii* a označila metabolity této sinice za možnou příčinu hepatoenteritidy, v té době též známé jako „Palm Island mystery disease“ (Hawkins et al. 1985).

V roce 1992 nastala v Queenslandu další série otrav, tentokrát se jednalo o stádo skotu, v průběhu tří týdnů zemřely 3 krávy a 10 telat (Thomas et al. 1998). Cylindrospermopsin byl označen za možnou příčinu kvůli nálezům *R. raciborskii* v primárním zdroji vody. Ve stejném roce byl CYN poprvé extrahován a pojmenován (Ohtani et al. 1992), jeho toxicita a účinky byly tedy teprve ve fázi zkoumání.

3.2 Chemická struktura CYN

CYN je strukturně tricyklický guanidin s hydroxymethyluracilem. Molekulární hmotnost je relativně malá, 415 Da. Dnes existuje pět známých analogů označovaných jako CYN: v přírodě se vyskytující cylindrospermopsin, 7-epicylindrospermopsin a 7-deoxycylindrospermopsin, a též později syntetizované 7-deoxydesulfocylindrospermopsin a 7-deoxydesulfo-12-acetylcylindrospermopsin (obr. 6) (Kokociński et al. 2017). Není zcela jasné, zda 7-epi-CYN a 7-deoxy-CYN jsou metabolity CYN, prekurzory, nebo úplně samostatné látky (De La Cruz et al. 2013). Z obrázku 5 je patrné, že CYN a 7-epi-CYN mají šest stereogenních center, z nichž se liší pouze konfigurací hydroxylové skupiny na 7. uhlíku (u CYN pozorujeme R konfiguraci, u 7-epi-CYN S konfiguraci), jsou to tedy epimery. Poměry, v jakém se jednotlivé analogy vyskytují v prostředí, jsou kmenově specifické (Neumann et al. 2007; Davis et al. 2014). Všechny analogy jsou dobře rozpustné ve vodě díky charakteru zwitterionu (kladný náboj na amino skupině, záporný na sulfátové skupině).



Obrázek 6 – strukturní vzorce variant CYN: 1 cylindrospermopsin, 2 7-epicylindrospermopsin, 3 7-deoxycylindrospermopsin, 4 7-deoxydesulfocylindrospermopsin, 5 7-deoxydesulfo-12-acetylcylindrospermopsin; převzato z Cartmell et al. (2017)

Hydroxylová skupina na C7 je největším předmětem zkoumání, jelikož 7-deoxy-CYN vykazuje *in vivo* mnohonásobně nižší toxicitu než CYN a 7-epi-CYN (Cartmell et al. 2017;

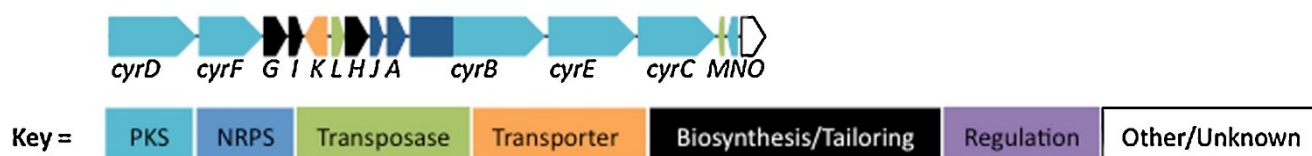
Chiswell et al. 1999). *In vitro* studie ale zjistila, že účinky 7-deoxy-CYN jsou pouze o 20-40% mírnější, než samotného CYN, tedy stejně jako samotný CYN je deoxy derivát cytotoxický a inhibuje proteosyntézu (Neumann et al. 2007). Toxicita obou epimerů je srovnatelná, stereochemie hydroxylové skupiny nemá efekt na biologickou aktivitu molekuly ani její transport skrze buněčné membrány (Hawkins et al. 1985). Sulfátová skupina na C12 nemá žádný vliv na transport skrze membránu jaterních buněk (Seifert et al. 2007), jak u experimentů *in vitro*, tak *in vivo* (Runnegar et al. 2002).

Stabilita CYN byla zkoumána v různorodých podmínkách. Chiswell et al. (1999) zahrnují proměnlivé parametry: teplotu, pH, viditelné a UV světlo (Chiswell et al. 1999). Zkoumaný teplotní rozsah byl od 4 do 50 °C při neutrálním pH. V prvních dvou týdnech experimentu klesla koncentrace CYN za teplot 4, 22 a 35 °C ve vzorcích na cca. 82,5% původní koncentrace, v dalších dvou týdnech se již neměnila. Při 50 °C klesla koncentrace CYN na 83%, přičemž vzrostla koncentrace C5 analogu CYN (podle výsledků hmotnostního spektra v publikaci Chiswell et al. (1999 pravděpodobně isomer CYN). Při povaření roztoku CYN po dobu 15 minut se jeho koncentrace významně nezměnila. Degradace CYN byla zkoumána při pH 4,7 a 10, po 8 týdnech zůstávala koncentrace CYN na 75% koncentrace původní. Umělé světlo nemělo významný efekt na rozklad CYN, naopak sluneční světlo degradovalo CYN po 1 týdně na 5% původní koncentrace (Chiswell et al. 1999). Podstatný efekt slunečního světla je u *R. raciborskii* pravděpodobně zmírněn díky ochranným pigmentům, tedy v přírodě degradace neprobíhá takovou rychlostí. V čistém vodném roztoku nedegraduje samovolně CYN vůbec.

Adamski et al. (2016) zkoumali dva abiotické faktory, teplotu a pH. Ukázali, že CYN je stabilní při kyselých a neutrálních pH, ale při alkalických pH proběhla degradace CYN na 80% původní koncentrace (pH 10) a 17% původní koncentrace (pH 12) (Adamski et al. 2016). Vliv teploty na rozklad CYN se shoduje s výsledky studie Chiswell et al. (1999) pro kyselé a neutrální pH, ale za alkalického pH degraduje CYN při varu po 4 hodinách na 47% původní koncentrace (pH 10) a 18% původní koncentrace (pH 12). Adamski et al. (2016) navrhují větší škálu degradačních produktů CYN, 7-epi-CYN a 6 dalších (z nichž 4 jsou diastereoisomery se sulfátovou skupinou substituovanou hydroxylovou skupinou), které detekovali na chromatogramu po zásaditém rozkladu CYN (Adamski et al. 2016).

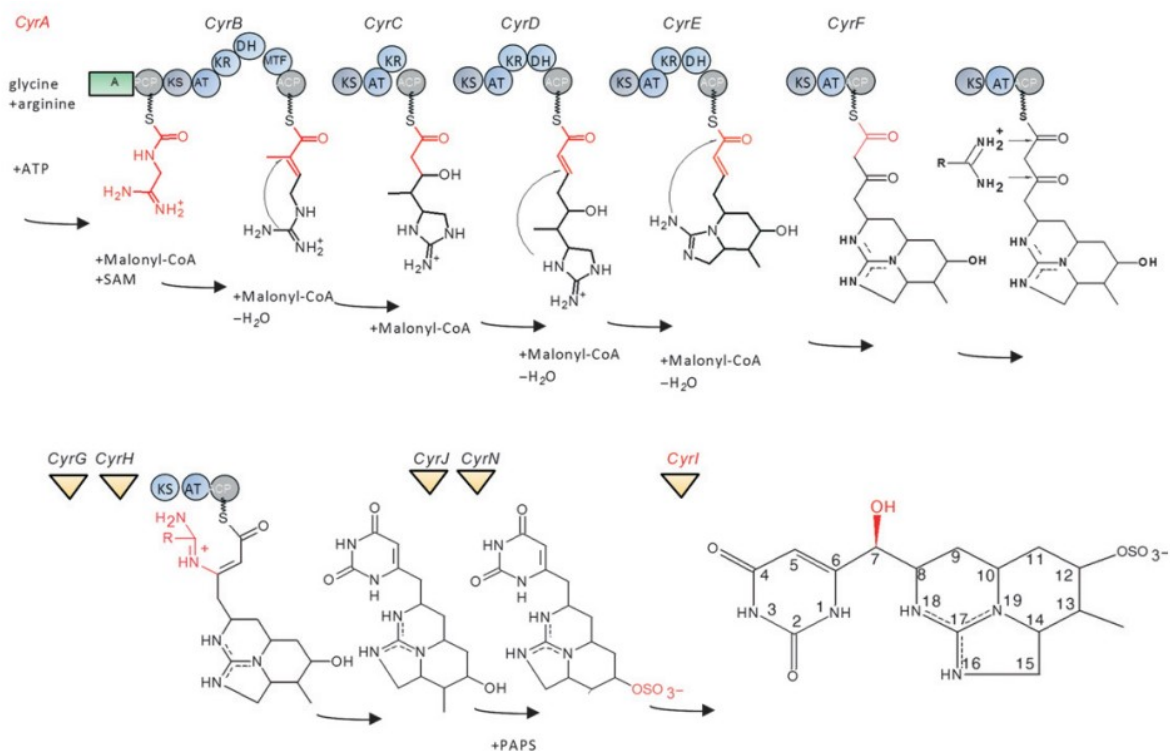
3.3 Biosyntéza CYN

V biosyntéze sekundárních metabolitů sinic figurují dva multienzymové komplexy, polyketid syntetasy (PKSs) a nonribosomální peptidová syntetasa (NRPSs). Geny, které kódují tvorbu těchto komplexů, byly poprvé potvrzeny v australských kmenech AWT205 a CYP020B *R. raciborskii* a zároveň byla potvrzena jejich absence u CYN neprodukujících kmenů stejného druhu, CYP014A a CYP003A (Schembri et al. 2001). Následně byly tyto komplexy prozkoumány detailněji u sinice *Aphanizomenon ovalisporum*, což vedlo k objevení genů *aoaA*, *aoaB* a *aoaC*, které kódují enzym potřebný k CYN biosyntéze, amidinotransferasu (Shalev-Alon et al. 2002). Tento enzym je hybrid NRPS a PKS. Kompletní genový klastr (*cyr* pro *Raphdiopsis sp.*, *aoa* pro *Aphanizomenon sp.*; podobnost je 96%) (obr. 7), který zodpovídá za biosyntézu CYN byl popsán ve studii Mihali et al. (2008). Klastr má 43 kb a kóduje geny potřebné k biosyntéze, regulaci i exportu CYN.



Obrázek 7 – genový klastr *cyr*, *R. raciborskii* AWT205, 43 kb; upraveno podle Pearson et al. (2016)

Biosyntéza CYN (obr. 8) začíná transaminací L-argininu na glycin za vzniku guanidinoacetátu, reakce je katalyzována amidinotransferasou (kódovanou genem *cyrA*). Následuje aktivace guanidinoacetátového skeletu adenylací, reakce je katalyzována ligasou kódovanou genem *cyrB*, která je součástí hybridu NRPS/PKS enzymu. Molekula je dále pětkrát prodloužena polyketidy (ketokarboxylovými kyselinami) a poté je vytvořen uracilový cyklus (Mihali et al. 2008), vznikne meziprodukt desulfo-7-deoxycylindrospermopsin. Nakonec probíhají finální úpravy, sulfatace a hydroxylace, za které jsou odpovědné geny *cyrJ* a *cyrI*. Mihali et al. (2008) ukázal, že pouze kmeny *R. raciborskii*, které mají gen *cyrA* a *cyrJ*, produkují sekundární metabolit CYN. Tento poznatek genetiky dává možnost zjistit možný toxický genotyp sinice a upozornit tak na možná zdravotní rizika v daném prostředí. Bylo jej využito například ve studii Ballot et al. (2011).



Obrázek 8 – schematické zobrazení biosyntézy CYN (červeně jsou označeny karboxylové a amino skupiny, které upravují uhlíkatý skelet CYN; SAM: S-adenosyl-L-methionin, MTF: methyltransferasa, PAPS: fosfoadenosinfosulfát) upraveno podle Dittmann et al. (2013)

3.4 Metody detekce CYN

Detekce přítomnosti CYN ve vodě je důležitá z několika důvodů, jednak kvůli dopadům na životní prostředí a daný ekosystém a v případě monitoringu zdroje pitné vody rovněž kvůli zdravotním rizikům pro člověka. Existuje několik metod pro detekci a stanovení množství CYN ve vzorcích sladkých a brakických vody. Tyto metody se dají rozdělit na chemické (analytické), imunologické a molekulární. V dnešní době ale stále neexistuje metoda, která by se využívala na pravidelný monitoring kvůli vysokým nárokům na drahé analytické vybavení, proškolení pracovníků, kteří monitoring provádí, a složitému odběru, kultivaci a samotné přípravě buněk k analýze (Scarlett et al. 2020).

Analytické metody detekce se v průběhu let zdokonalovaly a zpřesňovaly. Nejprve byla navržena izolace gelovou chromatografií a identifikace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s obrácenými fázemi při vlnové délce 262 nm (vlnová délka, kdy je absorbance uracilového cyklu maximální, oblast UV záření) (Ohtani et al. 1992).

Později byla navržena kombinace metod průtokové chromatografie (LC) a hmotnostní spektrometrie (MS), LC-MS/MS, která dokáže identifikovat i menší množství CYN ve vzorku (Eaglesham et al. 1999). Výhoda tandemové hmotnostní spektrometrie spočívá v její přesnosti, ale velkou nevýhodou je finanční náročnost. Další výhodou je možnost současně určovat

přítomnost více cyanotoxinů ve vzorku při spojení metody LC-MS/MS a SPE (extrakce na pevné fázi) (Zervou et al. 2017). Alternativou k metodě LC-MS/MS je metoda HPLC-PDA, která je méně finančně náročná. Množství CYN spolehlivě detekované touto metodou se pohybovala od 1 do 300 ng CYN (Welker et al. 2002). Metodu SPE použili v Australském národním institutu environmentální toxikologie, kde zkoumali různé iontově-výměnné sorbenty a bylo zjištěno, že grafitové kolonky (Carbograph) extrahují CYN a 7-deoxy-CYN neefektivněji (Norris et al. 2001), s detekčními limity 0,5 a 0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Později byla tato extrakce vylepšena použitím zdvojeným systémem grafitových kolonek, který se skládal z styren-divinylbenzen kopolymerové kolonky, kam se naadsorbovaly hydrofobní nečistoty ze vzorků, a aniontového měniče (anexu), na který se CYN a 7-deoxy-CYN navázaly. Detekční limit pro CYN bylo 0,16 ng (Kubo et al. 2005). Čistota eluovaných CYN a 7-deoxy-CYN byla analyzována LC-PDA a LC-MS, kde byly detekovány vždy pouze dva píky. Gallo et al. (2009) pro extrakci CYN ze vzorků rybích tkání zkombinovali hexanovou extrakci kapalina-kapalina (LLE) a SPE hydrofilně-lipofilními sorbenty (HLB), detekci posléze provedli HPLC a hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí, CYN a 7-deoxy-CYN byly detekovány s nízkými detekčními limity, 0,10 $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro koncentraci CYN ve vodním prostředí a 1,0 $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro koncentraci ve svalech ryb (Gallo et al. 2009).

Imunologická metoda, která je na trhu dnes dobře dostupná pro detekci CYN ve vzorku, je přímá ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Tato metoda funguje na principu reakce polyklonálních protilátek s CYN. Nevýhodou této metody je relativně nízká selektivita pro CYN analogy a také možné zkreslení výsledků křížovými reakcemi jiných látek obsažených ve zkoumaném vzorku (Moreira et al. 2013). Při srovnání detekce CYN metodami ELISA a LC-MS/MS ukázala studie Bláhová et al. (2009), že kvalitativní stanovení CYN ve vzorcích jsou téměř stejné, jen u ELISA metody byly vždy o stejnou systematickou chybu vyšší. Existují případy, ve kterých metoda ELISA stanovila CYN ve vzorku, ale citlivější metoda LC-MS/MS přítomnost CYN vyvrátila (Graham et al. 2010).

Metoda molekulární detekce amplifikace genů *aoaA*, *aoaB* a *aoaC* (popř. *cyrA*, *cyrB* a *cyrC*) z genového klastru *aoa* (popř. *cyr*) může být použita k určení potenciální toxicity daného kmenu. Dodnes je ale využívána pouze pro analýzu vzorků ve výzkumu, ne plošně při determinaci zdravotního rizika dané vodní plochy. Zjištění, zda daný kmen obsahuje jmenované geny sice se stoprocentní spolehlivostí neřekne, zda produkuje CYN, ale může upozornit na tuto možnost. Následně může být daná vodní plocha pravidelně monitorována pomocí analytických metod, které s jistotou určí, zda tato vodní plocha CYN obsahuje či nikoliv.

Z dostupných publikací vyvozují závěr, že nejpoužívanějšími metodami k detekci CYN jsou HPLC v kombinacích s PDA a LC metody. Velikou výhodou analytických metod, LC/MS a HPLC/PDA je jejich přesnost a citlivost, nevýhodou je časová náročnost, jelikož tento typ metod vyžaduje extrakci lyofilizované biomasy a využívá specializovaného vybavení laboratoře. Dostupnější jsou imunologické metody, ELISA, avšak jejich nevýhodou je právě možná falešně pozitivní detekce CYN díky křížovým reakcím.

3.5 Další producenti CYN

Produkce CYN není specifická pro druh *Raphidiopsis raciborskii*. Jak je již v předchozí podkapitole zmíněno, genový klastř *cyr*, který kóduje enzymy potřebné pro biosyntézu CYN, byl zkoumán i u jiných druhů. Kromě tohoto druhu tedy produkují CYN také některé sinice rodů *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Lyngbya* a *Uzumeia* (Shalev-Alon et al. 2002; Preußel et al. 2006; McGregor & Sendall 2015; Kokociński et al. 2017). Je vhodné poznamenat, že pro každý druh, který je schopný produkovat CYN, existují kmeny tohoto druhu, které CYN aktivně neprodukují (Kokociński et al. 2017).

4. Toxicita

CYN je hepatotoxický, cytotoxický, dermatotoxický, genotoxický a toxický při vývinu plodu (Runnegar et al. 2002). Mechanismus toxicity CYN spočívá především v inhibici proteosyntézy, zvýšení koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) a v poškození a aberaci DNA v průběhu mitózy (Scarlett et al. 2020). Hlavním zasaženým orgánem jsou téměř vždy játra, ale kvůli cytotoxickému mechanismu bývají zasaženy i další orgány jako ledviny, slezina, střeva, brzlík a srdce (Pichardo et al. 2017).

Mechanismus toxicity byl zkoumán na hepatocytech *Cyprinus carpio*, přípravou několika syntetických analogů CYN a pozorováním jejich efektů na buňky. Potvrdilo se, že uracilový cyklus je klíčový pro toxický efekt CYN. Dále se ukázalo, že absence hydroxylové skupiny významně snižuje toxikologickou aktivitu (Cartmell et al. 2017). Hydroxylová skupina je pravděpodobně potřeba k přenosu molekuly do buňky nebo k tvorbě vodíkových můstků. Všechny připravené analogy, které obsahovaly uracilový cyklus, guanidinový ion a hydroxylovou skupinu, vykazovaly stejné aktivity jako CYN: zvýšení intracelulární koncentrace ROS, peroxidaci lipidů a karboxylaci proteinů (Evans et al. 2019). Akutní genotoxicita je zprostředkována metabolity tvořenými cytochromem p-450 (CYP450) (Pearson

et al. 2016), cytotoxicita může být způsobena inhibicí biosyntézy glutathionu (GSH) (Humpage et al. 2005; Runnegar et al. 2002), ale tato hypotéza nebyla dodnes potvrzena.

4.1 Toxicita u zvířat a bioakumulace v potravním řetězci

Bioakumulace CYN nebyla doposud zcela prozkoumána. Ve studiích, které jsou na toto téma dostupné, se rozpětí koncentrací CYN v mořských organismech pohybuje od 0,00007 do 4,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace CYN byla zjištěna v hepatopankreatu *Cherax quadricarinatus* (Saker & Eaglesham 1999). Berry et al. (2012) zjistili, že bioakumulace CYN u ryb se liší u jednotlivých druhů. Při odběru ze stejného místa byly koncentrace CYN ve svalových tkáních *Oreochromis aureus* 0,00009 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, zatímco u *Heterandria jonesii* 0,00126 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Bioakumulační faktor (BAF), který udává poměr koncentrace CYN v potravě vůči koncentraci v zevním prostředí, se v dohledaných studiích pohyboval od 4 do 171. Bioakumulace u zvířat je zkoumaná především na vodních organismech, z bezobratlých u měkkýšů a korýšů, z obratlovců u obojživelníků a ryb. Shrnutí výsledků studií je v tabulce 1.

Hromadění CYN u druhu *Anodonta* bylo zkoumáno v hemolymfě a vnitřnostech, koncentrace po 2 týdnech vystavení 14–90 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ CYN (postupně byl cyanotoxin z média odebírán) byly v hemolymfě 61,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CYN a ve vnitřnostech 5,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ CYN. Ani po 15 dnech se nepodařilo zcela eliminovat nahromaděný CYN v organismech, cca. 50% ve tkáních zůstalo (Saker et al. 2004).

První studie, která se zabývala bioakumulací CYN u obratlovců, zkoumala hromadění toxinu v rybách *Cherax quadricarinatus* a *Melanotaenia eachamensis*. Voda, ze které prováděli odběry, obsahovala 589 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CYN, ve svalech *C. quadricarinatus* pak detekovali koncentrace CYN 900 μg CYN na 1 kg lyofilizované tkáně, v hepatopankreatu 4300 μg CYN na 1 kg lyofilizované tkáně. Hladká svalovina *M. eachamensis* obsahovala 1200 μg CYN na 1 kg lyofilizované tkáně (Saker & Eaglesham 1999).

Studie na pulcích a dospělých druhu *Bufo marinus* zjistila, že letální dávka pulců musí vyšší než 400 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ CYN, naproti tomu mortalita dospělců byla již při 232 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ CYN 66%. Také bylo zjištěno, že vystavení CYN má u pulců negativní vliv na růst. Bioakumulaci CYN v tkáních *B. marinus* se nepotvrdila, jelikož bioakumulační faktory (BAF) vždy vyšly menší než 1 (White et al. 2007)

Studie na egyptských tilapiích (*Oreochromis niloticus*) ukázala, že CYN se hromadí ve střevech a v játrech. Koncentrace extracelulárního CYN ve zkoumaném rybníku se pohybovaly v rozmezích 0,4–2,37 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, koncentrace naakumulovaného CYN ve střevech tilapií byly

mezi 1,84–417 ng.g⁻¹, koncentrace naakumulovaného CYN v játrech tilapií byly v rozmezí 50–1500 ng.g⁻¹. Studie se zabývala i obsahem CYN ve svalech, kde se koncentrace CYN pohybovaly mezi 19–280 ng.g⁻¹ (čerstvé hmotnosti). Všechny koncentrace CYN byly nejvyšší v září, nejnižší v zimních měsících, což odpovídalo koncentraci CYN v rybníku, CYN samotný neměl žádný pozorovaný efekt na tilapie, letální dávky byly determinované až nad koncentrace 10 µg.dm⁻³ (Mohamed & Bakr 2018).

Studie na hromadění CYN v rostlinách se zabývají především vodními rostlinami, a také rostlinami, které lidé využívají jako potravu, např. salát (*Lactuca sativa*), arugula (*Eruca sativa*) (Cordeiro-Araújo et al. 2017) a další zelenina (Prieto et al. 2018).

Studie na hromadění CYN analogů u zvířat a v potravních řetězcích nejsou zatím žádné.

Tabulka 1 – shrnutí dostupných informací o bioakumulaci CYN u vodních zvířat; upraveno podle Scarlett et al. (2020)

taxonomická supina	místo odběru	datum odběru	druh	typ tkáně	velikost vzorku	metoda detekce CYN	maximální koncentrace CYN (µg.g ⁻¹ čerstvé tkáně)	BAF	zdroj
bezobratlí (Gastropoda)	jezero Catemaco, Mexiko	říjen 2009	<i>Pomacea patula catemacensis</i>	celé tělo	-	HPLC a LC/MS	0,00335	157	Berry a Lind 2010
			<i>Vaughitia fenestrata</i>	svalová tkáň	n=1	ELISA	0,00081	38	
	Veracruz, Mexiko	říjen 2009	<i>Pomacea patula</i>	celé tělo	n=2	ELISA	0,00158	74	Berry et al. 2012
		<i>Copepods sp.</i>	celé tělo	n=1	ELISA	0,00104	49		
bezobratlí (Crustacea)	jezero Eacham, Townsville, Austrálie	srpen 1997	<i>Cherax quadricarinatus</i>	hepatopankreas	n=2	HPLC	0,54 (µg.g ⁻¹ lyofilizované tkáně)	-	Saker va Eaglesham 1999
					n=2	HPLC	4,3 (µg.g ⁻¹ lyofilizované tkáně)	-	
				svalová tkáň	n=2	HPLC	0,12 (µg.g ⁻¹ lyofilizované tkáně)	-	
					n=2	HPLC	0,9 (µg.g ⁻¹ lyofilizované tkáně)	-	
bezobratlí (Bivalvia)	Awoonga Dam, Austrálie	-	<i>Alathyria pertexta pertexta</i>	celé tělo	-	neznámé	0,56	-	Scarlett et al. 2020
obratlovci (Osteichthyes)	jezero Albano, střední Itálie	září 2006	<i>Salmo trutta</i>	vnitřnosti	n=2	ELISA	0,0027	-	Messineo et al. 2009
			<i>Salmo trutta</i>	svalová tkáň	n=2		0,0008	-	
			<i>Salmo trutta</i>	vaječník	n=1		0,00007	-	
	Veracruz, Mexiko	říjen 2009	<i>Bramocharax cabballeri</i>	svalová tkáň	n=2	ELISA	0,00081	38	Berry et al. 2012
			<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	svalová tkáň	n=1		0,00026	12	

			<i>Heterandria jonesii</i>	svalová tkáň	n=1		0,00126	59	
			<i>Oreochromis aureus</i>	svalová tkáň	n=2		0,00009	4	
			<i>Rhamidia sp.</i>	svalová tkáň	n=2		0,00024	11	
			<i>Cichlasoma helleri</i>	svalová tkáň	n=2		0,00015	7	
			<i>Vieja sp.</i>	svalová tkáň	n=1		0,00042	20	
			<i>Vaughtia fenestrata</i>	svalová tkáň	n=1		0,00081	38	
			<i>Dorosoma mexicana</i>	svalová tkáň	n=2		0,0008	38	
	jihovýchodní Asie	-	<i>Oreochromis niloticus</i>	játra	n=1	UPLC-MS/MS	0,1034	171	Gaget et al. 2017
				vajíčka	n=1		0,0469	-	
	jezero Eacham, Townsville, Austrálie	srpen 1997	<i>Melanotaenia eachamensis</i>	vnitřnosti	n=5	HPLC	1,2 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ lyofilizované tkáně)	-	Saker & Eaglesham 1999
	provincie Sohaq, Egypt	říjen 2010 – září 2013	<i>Oreochromis niloticus</i>	střeva	n=24	ELISA a HPLC	0,417	-	Mohamed & Bakr 2018
				játra	n=24		1,5	-	
				svalová tkáň	n=24		0,280	-	

4.2 Toxicita u lidí

Vystavení člověka působení cyanotoxinu CYN může proběhnout přímým kontaktem s kůží (např. při koupání, příp. rekreačních aktivitách spojených s vodou) anebo při orálním požití toxinem kontaminované vody a jídla (rostlinné i živočišné potraviny mohou CYN akumulovat). V podkapitole 3.1 Historie jsou uvedeny případy známých otrav způsobených CYN.

Aktuálně experimentálně determinovaný tolerovatelný denní příjem pro člověka je $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti a maximální doporučená koncentrace CYN v pitné vodě $1 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Humpage & Falconer 2003). Doporučené maximální koncentrace (GV, guideline values) se ve světě pohybují od 0,5 do $20 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro pitnou vodu a pro vody určené k rekreačnímu užitku od 1 do $20 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Scarlett et al. 2020).

4.3 Odstranění z prostředí a degradace

Přirozená degradace CYN v prostředí je velmi omezeně prozkoumaná a studie se zabývají pouze samotným CYN, ne jeho analogy. Hlavní mechanismy přirozeného odstranění CYN z vod jsou pravděpodobně fotolýza a biodegradace.

Fotolýza CYN byla zkoumána v roce 2010 v Valmayor Reservoirs v Madridu po dobu 22 dní (Wörmer et al. 2010). Za tuto dobu proběhla degradace CYN na 27% původní

koncentrace. Nejúčinněji působilo na CYN UVA záření (320–400 nm), které rozložilo cca. 75% CYN a i UVB záření (280–320 nm). Záření v oblasti 400–700 nm (fotosynteticky aktivní záření) nemělo na degradaci CYN žádný pozorovatelný efekt. V přirozeném prostředí je fotodegradace účinná zhruba do hloubky 1 m, v hloubce 4 m již není pozorován žádný efekt (Wörmer et al. 2008).

Biodegradace CYN může být v přírodě částečně způsobena i bakteriemi, které tomuto toxinu byly dříve vystaveny. Dvě studie na toto téma se ale neshodují, jedna zkoumala soubor bakterií izolovaných ze Španělska (Wörmer et al. 2008), druhá z Austrálie (Smith et al. 2008). Španělská studie po 40 dnech detekovala stále koncentrace CYN vyšší než 90% koncentrace původní. Australská studie zkoumala tamní endemické bakterie, ale jeden z jejich závěrů říká, že za biodegradaci je zodpovědné právě společenství bakterií, ne pouze jeden druh (Smith et al. 2008). Martínez-Ruiz et al. (2020) ukázali, že chemolitotrofní bakterie, které oxidují mangan (*Pseudomonas* sp., *Comamonadaceae* sp., *Ideonella* sp.), jsou schopné degradovat veškerý CYN v prostředí, pokud k tomu mají dostatek manganatých iontů, rychlostmi v rozmezí 0,38–37,01 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ za den. V půdě a sedimentech se CYN nehromadí, respektive tato cesta odstranění toxinu z vodního prostředí není možná. Studie zabývající se usazováním CYN v jednotlivých vrstvách půdy a sedimentů ukázala, že filtrace pískem a písčnými půdami není v odstraňování CYN sorpci efektivní (O'Reilly et al. 2011). Přítomnost hlíny ani bahna sorpci CYN nezvýšila, přítomnost organické hmoty naopak ano. Studie z roku 2012 potvrdila, že přidání rozpuštěné organické hmoty a uhlíku rapidně urychlí biodegradaci CYN, také ukázala, že v anoxických podmínkách degradace CYN neprobíhá (Klitzke & Fastner 2012).

4.4 Odstranění CYN z pitné vody

Najít efektivní mechanismus odstranění CYN při ošetření pitné vody je potřeba, jelikož orální podání toxinu může být pro člověka velmi nebezpečné a jsou zaznamenány případy takovýchto otrav (De La Cruz et al. 2013).

Jedním z navržených způsobů je destratifikace, tedy mechanické provzdušňování vody a promíchávání jednotlivých vrstev. Tato metoda má za následek změnu teploty, koncentrace rozpuštěného kyslíku a také dostupných živin v daném vodním sloupci. Destratifikace je často používána pro zlepšení kvality vody ve vodních nádržích. Růst *Raphidiopsis raciborskii* je ovlivňován jeho polohou ve vodním sloupci, promícháním je možné do určité míry zamezit dalšímu růstu této sinice, nebo jej minimálně zpomalit (De La Cruz et al. 2013; Scarlett et al. 2020).

Metodou, která se při ošetření pitné vody již používá, je písková filtrace, na koncentraci CYN ale nemá zjevný efekt. Membránové filtrace, jako jsou např. nanofiltrace a reverzní osmóza by zde mohly najít své využití. První studie, která se zabývala nanofiltračním odstraněním CYN z vody zjistila, že filtry s póry, které propouští částice pouze s molekulovou hmotností do 300 Da zbaví vodu až 90% CYN (Dixon et al. 2011). Na druhou stranu magnetická nanofiltrace (filtry s částicemi Fe_3O_4) nebyla pro odstraňování CYN efektivní, ale např. pro mikrocystiny a nodulariny ano (González-Jartín et al. 2020).

Aktivní uhlí (v prášku, PAU, i granulované, GAU) je další zkoumanou možností, jak odstranit CYN z pitné vody. Mechanismus spočívá v přenosu toxinu z fáze rozpuštění ve vodě na fázi aktivního uhlí. PAU dokáže navázat CYN efektivněji, zvláště pak takové, které má menší póry (s průměry 2–50 nm) a dokáže tedy naadsorbovat i molekuly s menší molekulovou hmotností (Ho et al. 2011).

V současnosti se používají tři způsoby chemického ošetření vody s cílem odstranit cyanotoxiny: rozpuštění CuSO_4 , flokulace (vločkování) a oxidace. Síran měďnatý je výhodný díky své bezpečnosti pro člověka (toxický je až nad koncentrace $11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i pro životní prostředí a cenovou dostupnost. Nevýhodou je mechanismus, kterým na sinice působí: od koncentrace CuSO_4 ve vodě $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ způsobuje lyzi sinicových buněk, čímž se CYN uvolňuje do prostředí, ale zároveň zamezuje jeho degradaci při neutrálním pH. To je pravděpodobně způsobeno denurací bakteriálních enzymů, které jsou za biodegradaci zodpovědné (Smith et al. 2008). Flokulace, kde se jako flokulační činidlo používá síran hlinitý, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, není příliš prozkoumaná při odstraňování CYN. Hoeger et al. (2004) ukázali, že flokulace odstraní okolo 46% původní koncentrace CYN. Zásadní je doba, kdy se flokulace provede, pokud ještě nedošlo ke kolapsu vodního květu (tedy buňky sinic nejsou poškozené a CYN není extracelulárně uvolněný), je tato metoda ošetření vody účinná při odstranění samotných buněk (Hoeger et al. 2004). Oxidace je běžnou metodou využívanou při čištění vody. Z běžně dostupných oxidačních činidel byly na odstranění CYN testovány chlor, oxid chloričitý, chloraminy, manganistan draselný a ozon. Oxidace molekuly CYN může probíhat na několika místech (sulfátová skupina, hydroxylové skupiny či guanidin), ale nejčastěji proběhne na uracilovém cyklu. Chlorinace není z hlediska odstranění CYN efektivní, většina forem chloru není dostatečně silným oxidantem, např. v prostředí kyseliny chlorné, HClO , má poločas rozpadu CYN hodnotu 1,7 min, v prostředí oxidu chloričitého, ClO_2 , 14,4 hod. Velkou roli hraje i pH a teplota, u kterých se optimum pro CYN liší od např. mikrocystinu, tedy není možné odstraňování směsi toxinů najednou (Merel et al. 2010). Oxidace manganistanem draselným proběhne primárně na místech dvojných vazeb. Oxidace ozonem vede přes adice na

dvojně vazby a molekulové přesmyky k rozpojení uracilového cyklu, a také k tvorbě dalších silných oxidačních činidel, hydroxylových aniontů, OH⁻. Tato oxidace probíhá optimálně při pH 4-10 a je považována za nejefektivnější pro degradaci CYN (Onstad et al. 2007). Oxidace CYN lze docílit i při ošetření vody UV zářením v kombinaci s oxidem titaničitým (Chen et al. 2015).

5. Závěr

Raphidiopsis raciborskii je dnes celosvětově přítomnou sinicí. Je pozoruhodné, že ne vždy produkuje člověku nebezpečné toxiny, nicméně jakožto významný producent cylindrospermopsinu je určitě sinicí, jejíž výskyt by se měl pravidelně monitorovat a opatření pro zabránění vytvoření vodního květu a vysoké produkci CYN by měla být dále prozkoumávána a zdokonalována. Ekologická valence *R. raciborskii* je velmi široká. Tato sinice toleruje výkyvy teplot, nízké intenzity světla, malé dostupnosti fosforu a dusíku. *Raphidiopsis raciborskii* preferuje mírně zásadité pH a minimální salinitu prostředí. Aktuální výskyt *R. raciborskii* ve srovnání s fylogeografií tohoto druhu upozorňuje na expanzi z tropických oblastí do temperátních, která se na rozdíl od rozšíření do tropických lokalit pravděpodobně udála v posledních třiceti letech. Tato invaze může být důsledkem globálního oteplování, anebo evoluce samotného druhu, případně jeho ekotypů.

Cylindrospermopsin představuje veliké nebezpečí jak pro člověka, tak pro celé vodní ekosystémy. Z hlediska chemické struktury tohoto cyanotoxinu je významná hydroxylová skupina na C7, její přesná role ale dosud nebyla odhalena. Biosyntéza CYN je na druhou stranu známa celá, od genetického klastr kódující jednotlivé enzymy, po jednotlivé reakce a meziprodukty (obr. 7 a obr. 8). CYN je primárně hepatotoxický, ale jsou zaznamenány i cytotoxické, dermatotoxické a genotoxické důsledky vystavení CYN.

Z metod detekce, kdy nejjednodušší z hlediska rychlosti a náročnosti jsou pravděpodobně ELISA metody a nejpresnější zatím LC-MS metody, je potřeba vypracovat protokol, nebo univerzální metodu, která by se dala používat při pravidelném monitoringu na místech s potvrzeným výskytem *R. raciborskii*, popř. dalších druhů sinic produkujících CYN, a byla méně náročná, jak finančně, tak v oblasti proškolení personálu, který by monitoring prováděl. Metody HPLC jsou zatím využívány nejčastěji, ovšem stejně jako ostatní analytické metody vyžadují specializované vybavení laboratoře. Metody odstraňování CYN z pitné vody by též měly být zdokonaleny, stoprocentně účinná metoda zatím neexistuje, což může být do

budoucná závažným problémem. Prozatím je dostatečné ošetření pitné vody flokulací, kdy podle Hoeger et al. (2004) záleží nejvíce na době odběru vody obsahující CYN produkující sinice (před kolapsem vodního květu) a která je efektivní při odstraňování celých neporušených buněk sinic.

Budoucí výzkum by se měl také zaměřit na více *in vivo* účinků, protože z dostupných informací je zřejmé, že CYN a jeho analogy účinkují jinak při *in vitro* a *in vivo* studiích, přičemž samotných výzkumů, prováděných *in vivo*, je zatím velmi málo. Také je potřeba prozkoumat bioakumulaci CYN v potravním řetězci, např. co se stane při požití ryby dravcem, co se stane při požití ryby vystavené CYN člověkem.

6. Reference

- Adamski, M., Zmudzki, P., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Zabaglo, K., Latkowska, E., & Bialczyk, J. (2016). Effect of pH and temperature on the stability of cylindrospermopsin. Characterization of decomposition products. *Algal Research*, 15, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.020>
- Aguilera, A., Gómez, E. B., Kaštovský, J., Echenique, R. O., & Salerno, G. L. (2018). The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia*, 57, 130–146. <https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- Antunes, J. T., Leão, P. N., & Vasconcelos, V. M. (2015). *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00473>
- Bai, F., Liu, R., Yang, Y., Ran, X., Shi, J. & Wu, Z. (2014). Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 39, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.015>
- Ballot, A., Ramm, J., Rundberget, T., Kaplan-Levy, R. N., Hadas, O., Sukenik, A., & Wiedner, C. (2011). Occurrence of non-cylindrospermopsin-producing *Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena bergii* in Lake Kinneret (Israel). *Journal of Plankton Research*, 33, 1736–1746. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr071>
- Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-Mozzini, Y., & Kaplan, A. (2010). Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Current Biology* 20, 1557–1561. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.032>
- Berry, J. P., Jaja-Chimedza, A., Dávalos-Lind, L., & Lind, O. (2012). Apparent bioaccumulation of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxins by finfish in Lake Catemaco (Veracruz, Mexico). *Food Additives & Contaminants - Part A; Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29, 314–321. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.597785>
- Berry, J. P., & Lind, O. (2010). First evidence of ‘paralytic shellfish toxins’ and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in ‘teogolo’ snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*, 55, 930–938. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.035>
- Bláhová, L., Oravec, M., Maršálek, B., Šejnohová L., Šimek, Z., & Bláha, L. (2009). The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon*, 53, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.014>
- Bolch, C. J. S., Blackburn, S. I., Jones, G. J., Orr, P. T., & Grewe, P. M. (1997). Plasmid content and distribution in the toxic cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann

- (Cyanobacteria: Chroococcales). *Phycologia*, 36, 6–11. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-36-1-6.1>
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lürling, M., Antoniadou, D., Padišák, J. & Kruk, C. (2012). What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 594–607. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x>
- Bouvy, M., Molica, R., De Oliveira, S., Marinho, M., & Beker, B. (1999). Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, 20, 285–297. <https://doi.org/10.3354/ame020285>
- Burford, M. A., Beardall, J., Willis, A., Orr, P. T., Magalhaes, V. F., Rangel, L. M., Azevedo, S. M. F. O. E., & Neilan, B. A. (2016). Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 54, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.012>
- Calandrino, E. S., & Paerl, H. W. (2011). Determining the potential for the proliferation of the harmful cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Currituck Sound, North Carolina. *Harmful Algae*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.003>
- Cartmell, C., Evans, D. M., Elwood, J. M. L., Fituri, H. S., Murphy, P. J., Caspari, T., Poniedziłek, B., & Rzymiski, P. (2017). Synthetic analogues of cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and their toxicological activity. *Toxicology in Vitro*, 44, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.007>
- Lin, C., Zhao, C., Dionysiou, D. D., & O’Shea, K. E. (2015). TiO₂ photocatalytic degradation and detoxification of cylindrospermopsin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 307–308, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.03.013>
- Chiswell, R. K., Shaw, G. R., Eaglesham, G., Smith, M. J., Norris, R. L., Seawright, A. A., & Moore, M. R. (1999). Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology*, 14, 155–161. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<155::AID-TOX20>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<155::AID-TOX20>3.0.CO;2-Z)
- Christiansen, G., Goesmann, A., & Kurmayer, R. (2014). Elucidation of insertion elements carried on plasmids and *in vitro* construction of shuttle vectors from the toxic cyanobacterium *Planktothrix*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4887–4897. <https://doi.org/10.1128/AEM.01188-14>
- Cirés, S., Wörmer, L., Ballot, A., Agha, R., Wiedner, C., Velázquez, D., Casero, M. C., & Quesada, A. (2014). Phylogeography of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxin-producing *Nostocales* cyanobacteria from Mediterranean Europe (Spain). *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1359–1370. <https://doi.org/10.1128/AEM.03002-13>

- Cordeiro-Araújo, M. K., Chia, M. A., & Bittencourt-Oliveira, M. d. C. (2017). Potential human health risk assessment of cylindrospermopsin accumulation and depuration in lettuce and arugula. *Harmful Algae*, 68, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.08.010>
- Davis, T. W., Orr, P. T., Boyer, G. L., & Burford, M. A. (2014). Investigating the production and release of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by *Cylindrospermopsis raciborskii* over a natural growth cycle. *Harmful Algae*, 31, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.09.007>
- Dittmann, E., Fewer, D. P., & Neilan, B. A. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 23–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x>
- Dixon, M. B., Falconet, C., Ho, L., Chow, C. W. K., O'Neill, B. K., & Newcombe, G. (2011). Removal of cyanobacterial metabolites by nanofiltration from two treated waters. *Journal of Hazardous Materials*, 188, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.111>
- Eaglesham, G. K., Norris, R. L., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., Davis, B. C., Neville, G. R., Seawright, A. A., & Moore, M. R. (1999). Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environmental Toxicology*, 14, 151–154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<151::AID-TOX19>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<151::AID-TOX19>3.0.CO;2-D)
- Evans, D. M., Hughes, J., Jones, L. F., Murphy, P. J., Falfushynska, H., Horyn, O., Sokolova, I. M., Christensen, J., Coles, S. J., & Rzymiski, P. (2019). Elucidating cylindrospermopsin toxicity via synthetic analogues: an *in vitro* approach. *Chemosphere*, 234, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.021>
- Fathalli, A., Jenhani, A. B. R., Moreira, C., Azevedo, J., Welker, M., Romdhane, M., Antunes, A., & Vasconcelos, V. (2011). Genetic variability of the invasive cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* from Bir M'cherga reservoir (Tunisia). *Archives of Microbiology*, 193, 595–604. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0704-y>
- Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., & Humpage, A. R. (2017). Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Research*, 118, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025>
- Gallo, P., Fabbrocino, S., Cerulo, M. G., Ferranti, P., Bruno, M., & Serpe, L. (2009). Determination of cylindrospermopsin in freshwaters and fish tissue by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 3279–3284. <https://doi.org/10.1002/rcm.4243>
- Gkelis, S., & Zaoutsos, N. (2014). Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: A multi-disciplinary approach. *Toxicon*, 78, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.11.010>
- González-Jartín, J. M., de Castro Alves, L., Alfonso, A., Piñeiro, Y., Vilar, S. Y., Rodríguez, I., Gomez, M. G., Osorio, Z. V., Sainz, M. J., Vieytes, M. R., Rivas, J., & Botana, L. (2020). Magnetic

- nanostructures for marine and freshwater toxins removal. *Chemosphere*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127019>
- Graham, J. L., Loftin, K. A., Meyer, M. T., & Ziegler, A. C. (2010). Cyanotoxin mixtures and taste-and-odor compounds in cyanobacterial blooms from the Midwestern United States. *Environmental Science and Technology*, 44, 7361–7368. <https://doi.org/10.1021/es1008938>
- Griffiths, D. J., & Saker, M. L. (2003). The Palm Island Mystery Disease 20 Years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, 18, 78–93. <https://doi.org/10.1002/tox.10103>
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M., & Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*, 7, 692–701. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.02.010>
- Hawkins, P. R., Runnegar, M. T. C., Jackson, A. R. B., & Falconer, I. R. (1985). Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1292–1295. <https://doi.org/10.1128/AEM.50.5.1292-1295.1985>
- Ho, L., Lambling, P., Bustamante, H., Duker, P., & Newcombe, G. (2011). Application of powdered activated carbon for the adsorption of cylindrospermopsin and microcystin toxins from drinking water supplies. *Water Research*, 45, 2954–2964. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.014>
- Hoeger, S. J., Shaw, G., Hitzfeld, B. C., & Dietrich, D. R. (2004). Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon*, 43, 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.019>
- Holland, D. P., Pantorno, A., Orr, P. T., Stojkovic, S., & Beardall, J. (2012). The impacts of a high CO₂ environment on a bicarbonate user: The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Water Research*, 46, 1430–1437. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.015>
- Horecká, M., & Komárek, J. (1979). Taxonomic position of three planktonic blue-green algae from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. *Preslia*, 51, 289–312.
- Humpage, A. R., & Falconer, I. R. (2003). Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*, 1, 94–103. <https://doi.org/10.1002/tox.10104>
- Humpage, A. R., Fontaine, F., Froschio, S., Burcham, P., & Falconer, I. R. (2005). Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68, 739–753. <https://doi.org/10.1080/15287390590925465>
- Kling, H. J. (2009). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria): A brief historic overview and recent discovery in the Assiniboine River (Canada). *Fottea*, 9, 45–47.

<https://doi.org/10.5507/fot.2009.002>

- Klitzke, S., & Fastner, J. (2012). Cylindrospermopsin degradation in sediments - The role of temperature, redox conditions, and dissolved organic carbon. *Water Research*, 46, 1549–1555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.014>
- Kokociński, M., Cameán, A. M., Carmeli, S., Guzmán-Guillén, R., Jos, Á., Mankiewicz-Boczek, J., Metcalf, S., Moreno, I. M., Prieto, A. I., & Sukenik, A. (2017). Cylindrospermopsin and congeners. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch12>
- Kokociński, M., Dżiga, D., Spoof, L., Stefaniak, K., Jurczak, T., Mankiewicz-Boczek, J., & Meriluoto, J. (2009). First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of Western Poland. *Chemosphere*, 74, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.027>
- Komárek, J., & Komárková, J. (2003). Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales); Review 2002. *Czech Phycology*, 3, 1–30.
- Komárková, J. (1972). The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). *Anais Dos IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Brasileira de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. - Secretaria Do Meio Ambiente Do Estado de São Paulo I*, 327–340.
- Kromkamp, J., Konopka, A., & Mur, L. R. (1986). Buoyancy regulation in a strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae): The importance of carbohydrate accumulation and gas vesicle collapse. *Journal of General Microbiology*, 132, 2113–2121. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-8-2113>
- Kubo, T., Sano, T., Hosoya, K., Tanaka, N., & Kaya, K. (2005). A new simply and effective fractionation method for cylindrospermopsin analyses. *Toxicon*, 46, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.020>
- De La Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He, X., Loftin, K., O’Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T. J., & Dionysiou, D. D. (2013). A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 15, 1979–2003. <https://doi.org/10.1039/c3em00353a>
- McGregor, G. B., & Sendall, B. C. (2015). Phylogeny and toxicology of *Lyngbya wollei* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) from north-eastern Australia, with a description of *Microseira* Gen. Nov. *Journal of Phycology*, 51, 109–119. <https://doi.org/10.1111/jpy.12256>
- Merel, S., Clément, M., & Thomas, O. (2010). State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon*, 55, 677–691. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.028>
- Messineo, V., Melchiorre, S., Di Corcia, A., Gallo, P., & Bruno, M. (2009). Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with

- cylindrospermopsin occurrence in the volcanic lake Albano, Central Italy. *Environmental Toxicology*, 25, 18–27. <https://doi.org/10.1002/tox.20469>
- Mihali, T. K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K. D., & Neilan, B. A. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 716–722. <https://doi.org/10.1128/AEM.01988-07>
- Miller, V. V. (1923). K sistematike roda *Anabaena* a Bory. Arch. Russk. Protistolog., 2, 116-126.
- Miotto, M. C., Dy Fonseca Costa, L., Brentano, D. M., Nader, C., dos Santos Souza, L., Gressler, P. D., Laudares-Silva, R., Yunes, J. S., Barufi, J. B., & Rörig, L. R. (2017). Ecophysiological characterization and toxin profile of two strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from a subtropical lagoon in Southern Brazil. *Hydrobiologia*, 802, 97–113. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3243-y>
- Mohamed, Z. A., & Bakr, A. (2018). Concentrations of cylindrospermopsin toxin in water and tilapia fish of tropical fishponds in Egypt, and assessing their potential risk to human health. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 36287–36297. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3581-y>
- Moisander, P. H., Cheshire, L. A., Braddy, J., Calandrino, E. S., Hoffman, M., Piehler, M. F., & Paerl, H. W. (2012). Facultative diazotrophy increases *Cylindrospermopsis raciborskii* competitiveness under fluctuating nitrogen availability.” *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 800–811. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01264.x>
- Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A., & Vasconcelos, V. (2013). Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 605–620. <https://doi.org/10.1111/jam.12048>
- Moreira, C., Fathalli, A., Vasconcelos, V., & Antunes, A. (2011). Genetic diversity and structure of the invasive toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Current Microbiology*, 62, 1590–1595. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9900-x>
- Neumann, C., Bain, P., & Shaw, G. (2007). Studies of the comparative *in vitro* toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 70, 1679–1686. <https://doi.org/10.1080/15287390701434869>
- Norris, R. L. G., Eaglesham, G. K., Shaw, G. R., Senogles, P., Chiswell, R. K., Smith, M. J., Davis, B. C., Seawright, A. A., & Moore, M. R. (2001). Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 16, 391–396. <https://doi.org/10.1002/tox.1048>
- O’Reilly, A. M., Wanielista, M. P., Loftin, K. A., & Chang, N. B. (2011) Laboratory simulated Transport of microcystin-LR and cylindrospermopsin in groundwater under the influence of stormwater ponds: implications for harvesting of infiltrated stormwater. *IAHS-AISH Publication* 342, 107–111.
- Ohtani, I., Moore, R. E., & Runnegar, M. T. C. (1992). Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from

- the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 114, 7941–7942. <https://doi.org/10.1021/ja00046a067>
- Onstad, G. D., Strauch, S., Meriluoto, J., Codd, G. A., & von Gunten, U. (2007). Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation. *Environmental Science and Technology*, 41, 4397–4404. <https://doi.org/10.1021/es0625327>
- Padisák, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: Worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv Für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beitrage*, 107, 563–593.
- Panou, M., Zervou, S. K., Kaloudis, T., Hiskia, A., & Gkelis, S. (2018). A Greek *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: missing link in tropic invader's phylogeography tale. *Harmful Algae*, 80, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.10.002>
- Pearson, L. A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S. E., D'Agostino, P. M., & Neilan, B. A. (2016). The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae*, 54, 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C., & Bonilla, S. (2011). Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, 10, 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.016>
- Pichardo, S., Cameán, A. M., & Jos, A. (2017). *In vitro* toxicological assessment of cylindrospermopsin: a review. *Toxins*, 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9120402>
- Pierangelini, M., Stojkovic, S., Orr, P. T., & Beardall, J. (2014). Elevated CO₂ causes changes in the photosynthetic apparatus of a toxic cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1091–1098. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.003>
- Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S., & Vasconcelos, V. (2013). Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia*, 70, 27–42. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1372-x>
- Preußel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I., & Fastner, J. (2006). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*, 47, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.013>
- Prieto, A. I., Guzmán-Guillén, R., Díez-Quijada, L., Campos, A., Vasconcelos, V., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2018). Validation of a method for cylindrospermopsin determination in vegetables: application to real samples such as lettuce (*Lactuca Sativa L.*). *Toxins*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins10020063>
- Runnegar, M. T., Xie, C., Snider, B. B., Wallace, G. A., Weinreb, S. M., & Kuhlenkamp, J. (2002). *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicological Sciences*, 67, 81–87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.1.81>
- Rzymiski, P., Poniedziałek, B., Kokociński, M., Jurczak, T., Lipski, D., & Wiktorowicz, K. (2014).

- Interspecific Allelopathy in cyanobacteria: cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*, 35, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.03.002>
- Saker, M. L., & Eaglesham, G. K. (1999). The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, 37, 1065–1077. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00240-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00240-2)
- Saker, M. L., Metcalf, J. S., Codd, G. A., & Vasconcelos, V. M. (2004). Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon*, 43, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.022>
- Scarlett, K R., Kim, S., Lovin, L. M., Chatterjee, S., Scott, J. T, & Brooks, B. W. (2020). Global scanning of cylindrospermopsin: critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards. *Science of the Total Environment*, 738, 139807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139807>
- Schembri, M. A., Neilan, B. A., & Saint, C. P. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 16, 413–421. <https://doi.org/10.1002/tox.1051>
- Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., & Shaw, G. (2007). First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow Ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*, 6, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.07.001>
- Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R., & Kaplan, A. (2002). A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 209, 87–91. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11114.x>
- Sinha, R., Pearson, L. A., Davis, T. W., Burford, M. A., Orr, P. T., & Neilan, B. A. (2012). Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones - is climate change responsible?" *Water Research*, 46, 1408–1419. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.019>
- Smith, M. J., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K., Ho, L., & Brookes, J. D. (2008). Elucidating the factors influencing the biodegradation of cylindrospermopsin in drinking water sources. *Environmental Toxicology*, 23, 413-421. <https://doi.org/10.1002/tox.20356>
- Thomas, A. D., Saker, M. L., Norton, J. H., & Olsen, R. D. (1998). Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in Northern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 76, 592–594. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb10233.x>
- Vico, P., Bonilla, S., Cremella, B., Aubriot, L., Iriarte, A. & Piccini, C. (2020). Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii*: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106824>

- Welker, M., Bickel, H., & Fastner, J. (2002). HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Research*, 36, 4659–4663. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00194-X)
- White, S. H., Duivenvoorden, L. J., Fabbro, L. D., & Eaglesham, G. K.. (2007). Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures.” *Environmental Pollution*, 147, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.010>
- Wilk-Woźniak, E., Solarz, W., Najberek, K., & Pocięcha, A. (2016). Alien cyanobacteria: an unsolved part of the "expansion and evolution" jigsaw puzzle? *Hydrobiologia*, 764, 65–79. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2395-x>
- Wood, S. A., Pochon, X., Luttringer-Plu, L., Vant, B. N., & Hamilton, D. P. (2014). Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae*, 39, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.013>
- Wörmer, L., Cirés, S., Carrasco, D., & Quesada, A. (2008). Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae*, 7, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.07.004>
- Wörmer, L., Huerta-Fontela, M., Cirés, S., Carrasco, D., & Quesada, A. (2010). Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin. *Environmental Science and Technology*, 44, 3002–3007. <https://doi.org/10.1021/es9036012>
- Yu, Z., Zhou, J., Yang, J., Yu, X., & Liu, L. (2014). Vertical distribution of diazotrophic bacterial community associated with temperature and oxygen gradients in a subtropical reservoir. *Hydrobiologia*, 741, 69–77. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1832-6>
- Zervou, S. K., Christophoridis, C., Kaloudis, T., Triantis, T. M., & Hiskia, A. (2017). New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.020>