

Škola doktorských studií v biologických vědách
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Fungicidní aktivita sinic rodu *Nostoc*

Disertační práce

Mgr. Jana Tomšíčková

Školitel: Ing. Jiří Kopecký, CSc., MBÚ Třeboň

České Budějovice

2013

Tato práce by měla být citována jako:

Tomsickova, J., 2013: Fungicidní aktivita sinic rodu *Nostoc*. (Fungicidal activity of cyanobacteria from the genus *Nostoc*, Ph.D. Thesis, in Czech) Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice, Česká Republika, 96 pp.

Anotace:

V této práci jsem se zabývala analýzami biomas a kultivačních médií sinic za účelem nalezení fungicidně působících látek. Testování aktivity bylo následně rozšířeno o testování cytotoxicity na buněčných liniích a žábřonozkách (*Artemia salina*). Byl také vizualizován cytoskelet, aby bylo zřejmé, jaký je mechanismus toxického působení. Fungicidně působící substance byla purifikována a analyzována pomocí HPLC. Díky cíleným fragmentacím s použitím hmotnostního spektrometru byly nalezeny chemické struktury všech nalezených fungicidních látek.

Annotation:

I investigated in this thesis extracts of biomasses and cultivation media of cyanobacteria in order to find fungicidally acting substances. The testing was subsequently extended with testing of cytotoxicity to cell lines and brine shrimps (*Artemia salina*). The visualization of cytoskeleton organization was used to make clear what is the mechanism of toxicity. Fungicidally active substance was purified and analyzed by HPLC. With targeted fragmentation using a mass spectrometer were found chemical structures of all fungicidal substances.

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 30.8.2013

.....

Jana Tomšíčková

Tato práce vznikla ve spolupráci Přírodovědecké fakulty Jihočeské University v Českých Budějovicích a Mikrobiologického ústavu AVČR v Třeboni.



Finanční podpora:

Tato práce byla umožněna díky podpoře dlouhodobých výzkumných plánů ministerstva školství České Republiky číslo: MSM0021620858, centrem pro řasovou biotechnologii - Algotech CZ.1.05/2.1.00/03.0110 a částečně grantu LH11129, MSMT.

Poděkování:

Děkuji zejména svému školiteli Jiřímu Kopeckému za jeho trpělivost, rady a vedení, dále všem milým členům laboratoře v Třeboni, zejména Ladě Samcové, Pavlu Hrouzkovi, Danielu Hisemovi a Pavlu Součkovi za pomoc a tvorbu dobré nálady při práci. Janu Černému a Michalu Ondřejovi děkuji za fascinující ukázkou práce na jejich pracovištích. V neposlední řadě patří dík mámě a Lukášovi za dodávání odvahy a posilu v těžkých chvílích.

Seznam publikací a vyjádření o přispění autora:

Hisem D., Hrouzek P., Tomek P., **Tomšíčková J.**, Zapomělová E., Skácelová K., Lukešová A., Kopecký J. (2011). Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*, 57, 76–83. (IF 2,792)

Jana Tomšíčková prováděla kultivace sinice *Nostoc* Luk. 5/96, sklizeň a uchovávání vzorků. Následně připravovala extrakty biomasy, purifikovala je, prováděla frakcionace a analýzy HPLC/MS.

J. Tomšíčková, M. Ondřej, J. Černý, P. Hrouzek, J. Kopecký (2013). Analysis and detection of the scytophycin variants by HPLC-ESI-MSⁿ. *Chemistry of natural compounds*. (Přijato) (IF 0,599)

Jana Tomšíčková prováděla kultivace sinice *Nostoc* Luk. 5/96, sklizeň a uchovávání vzorků. Následně připravovala extrakty biomasy, purifikovala je, prováděla frakcionace, analýzy HPLC/MS, vyhodnocení, sepsala publikaci a komunikovala s recenzenty.

Vyjádření žurnálu:

Dear Jana Tomsickova,

Your manuscript 95.12 (ANALYSIS AND DETECTION OF THE SCYTOPHYCIN VARIANTS BY HPLC-ESI-MS^N) is planned to be published in 6th issue (December) of the journal, year 2013. Your paper will shortly be sent to you for final corrections.

Yours sincerely,
Responsible Secretary

Dr. V.I. Vinogradova
Chemistry of Natural Compounds

Obsah:

1. ÚVOD	8
1.1. Sinice	8
1.2. Kultivace sinic	10
1.3. Toxiny produkované sinicemi	11
1.3.1. Scytophyciny	14
1.4. Purifikace	15
1.4.1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	15
1.4.2. Kapalinová chromatografie	16
1.4.3. Iontová chromatografie	17
1.5. Identifikace	18
1.5.1. Hmotnostní spektrometrie (MS)	18
1.6. Testování aktivity	22
1.6.1. Buněčné linie	22
1.6.2. Žábronožky	23
1.6.3. Houbové patogeny	24
1.7. Vizualizace vnitřního uspořádání buňky	25
2. CÍL PRÁCE	27
3. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	28
3.1 Použité přístroje	29
3.2. Použité chemikálie	30
4. METODY	31
4.1. Původ a kultivace testovaných kmenů sinic	31
4.2. Stanovování obsahu dusičnanů v kultivačním médiu	32
4.2.1. Provedení analýzy	33
4.3. Příprava extraktů z lyofilizované biomasy	33
4.4. Příprava extraktů z kultivačních médií	34
4.5. Optimalizace extrakce látek z aktivního kmene	34
4.6. Sledování vlivu kultivačních podmínek na růst a produkci aktivních u kmene <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	35
4.6.1. Sledování vlivu světla a teploty na růst a produkci aktivních u kmene <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	35
4.6.2. Sledování vlivu základních živin na růst a produkci aktivních u kmene <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	35
4.7. Produkce aktivních látek v průběhu růstu kmene	36
4.8. TLC frakcionace	36
4.9. Izolace aktivních látek ze sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 pro strukturní analýzy	37
4.10. Stanovení inhibiční aktivity extraktů	38
4.10.1. Stanovení inhibiční aktivity extraktů biomas a médií sinic rodu <i>Nostoc</i> proti houbovým patogenům	39

4.10.2. Stanovení inhibiční aktivity extraktů biomasy a média sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 proti žábřonožkám (<i>Artemia salina</i>)	40
4.10.3. Stanovení inhibiční aktivity extraktů biomasy a média sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 proti buněčným liniím	40
4.10.4. Vizualizace mechanismu toxického působení extraktů sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 na buňky	41
4.11. Analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC/ESI/MS) předčištěných extraktů sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96.....	42
5. VÝSLEDKY	44
5.1. stanovení fungicidní aktivity sinic rodu <i>Nostoc</i>	44
5.2. Optimalizace extrakční metody	46
5.3. Závislost specifické růstové rychlosti a produkce aktivních látek na kultivačních podmínkách	47
5.3.1. Vliv dusíku a fosforu na produkci biomasy a vybraných toxinů sinicí <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	53
5.4. Biologická aktivita	54
5.4.1. Inhibiční aktivita surového extraktu sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 a jeho frakcí proti houbovým patogenům	54
5.4.2. Aktivita surového extraktu sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 v rostlinném modelu.....	58
5.4.3. Toxický efekt na buněčné linie a žábřonožky	59
5.5. Vizualizace cytoskeletu	61
5.6. Identifikace toxinů sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 pomocí HPLC/MS/MS	62
6. DISKUZE	71
6.1. Sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	72
6.2. Izolace a přečištění aktivních látek z extraktu sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	73
6.3. Kultivace sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96 a experimenty s kultivačními podmínkami	75
6.4. Biologická aktivita látek z extraktu sinice <i>Nostoc</i> Lukešová 5/96	77
6.5. Strukturní analýza látek <i>m/z</i> 873, 829 a 875	
7. ZÁVĚR	80
8. LITERATURA	81
9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST	89

1. ÚVOD

1.1. Sinice

Sinice jsou velice staré autotrofní mikroorganismy. Objevily se minimálně před 2,7 miliardami let (Schopf et al., 2002) a začaly prvotní redukční atmosféru měnit na tu dnešní obsahující kyslík (Paul, 2008). Následně se z kyslíku vytvářel ozón, který omezil prostup ultrafialového záření, čímž bylo spoluumožněno později vznikajícím mnohobuněčným organismům kolonizovat souš (Friedmann and Ocampo, 1994). Také se dá říct, že sinice (v širším slova smyslu) umožnily vznik složitějších forem života. Buněčné struktury eukaryotických buněk – konkrétně mitochondrie a plastidy, jsou pozůstatkem pradávnejší endosymbiózy s blízkým příbuzným sinic (Giovannoni S.J. et al., 1988; Yoon et al., 2004). Sinice jsou také významným geologickým činitelem. V minerálních vodách dochází vlivem procesu fotosyntézy sinic ke srážení rozpuštěných solí v podobě různých minerálů, např. travertinu, nebo známých stromatolitů (Altermann et al., 2006). Cyanobacteria osidlují téměř všechny biotopy s výjimkou extrémně kyselých lokalit. Můžeme je najít v sladké či slané vodě, v půdě a na skalách, v enormně nehostinných arktických ledových pustinách a nebo v horkých pramenech (Madigan and Marrs, 1997; Whitton and Potts, 2000). Vyvinula se u nich rozmanitá přispůsobení pomáhající přežít nepříznivé podmínky. Na příklad je možno uvést tvorbu specifických buněk umožňujících vodním sinicím efektivně cirkulovat ve vodním sloupci (aerotopy) a schopnosti fixovat atmosférický dusík (heterocyty). Tento přísně kontrolovaný mechanismus probíhá v heterocytech, kam je cíleně zabráněno vstupu kyslíku, jenž by degradoval dusík fixující nitrogenasu. Díky této schopnosti se sinice (např. rod *Nostoc*, *Gloeocapsa*, *Stigonema*) účastní mnoha symbiotických vztahů zejména s lišejníky, nahosemennými rostlinami či prvoky (Santi et al., 2013; Yuan et al., 2005). Dalšími specializovanými buňkami sinic jsou akinety, což jsou vlastně jakási persistentní stadia, díky nimž je organismus schopen rychlého růstu po odeznění pro život nevhodných podmínek.

Velikost buněk sinic je zpravidla 1–10 µm, ale může dosahovat až 60 µm (*Chroococcus giganteus*) (Schopf and Klein, 1992). Rozmnožování je výhradně nepohlavní, dělením. Rozdělují se do pěti řádů: *Chroococcales*, *Chamaesiphonales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Stigonematales*. V současnosti je známo asi 200 rodů s několika tisíci druhy s tím, že tento počet by mohl pravděpodobně růst řádově (Anagnostidis a Komárek, 1985). Chybí totiž detailnější prozkoumání některých oblastí – např. tropů. Někdy se díky značné proměnlivosti (fenoplasticitě) sinic vůbec nepřístupuje k popisování druhů, ale užívají se jen rody – dokonce ještě stále nebyl sjednocen názor, jak definovat druhy. Detailně bylo dosud prostudováno jen nemnoho desítek zástupců. Z biochemických charakteristik se pro taxonomii dá dobře použít například obsah karotenoidů (Aakermann et al., 1992; Karsten and Garcia-Pichel, 1996) či zastoupení mastných kyselin (Li and Watanabe, 2001; Tornabene et al., 1985), zatím stále ale chybějí data na vytvoření obecného závěru. S klasifikací sinic mají taxonomové mnoho problémů a jsou navrhovány různé systémy klasifikace (Oren, 2004), nyní zejména na základě molekulárních analýz (porovnávání sekvencí 16s rRNA). Existují jak vláknité, tak jednobuněčné typy, které současně patří do jednoho řádu na příklad *Oscillatoriales* a *Chroococcales* (Giovannoni et al., 1988). Zajímavým a nikoli překvapivým je také zjištění, že se bakterie ve fylogenetických analýzách 16S rRNA velmi často seskupují do clustřů podle typu stanoviště, tedy že sladkovodní se velmi liší od mořských nebo terestrických populací (Zwart et al., 2002). Dále byly popsány jisté korelace na typ stanoviště a produkci aktivních metabolitů (Hrouzek et al, 2010), ale např. halofilní jednobuněčné sinice, což je zajímavé, vytvářejí dle 16S rRNA monofyletickou skupinu, vzdálenou od ostatních a to bez ohledu na geografický původ (Garcia-Pichel et al., 1998; Margheri et al., 1999).

Ukazuje se, že rod *Nostoc*, kterým se zabývá tato práce, je monofyletický, ale s určitým stupněm polymorfismu (Rudi et al., 1997). Od rodu *Anabaena* je rozpoznatelný tvorbou menších akinet. *Nostoc* je velmi široký rod čítající mnoho zástupců. Typická je pro něj zejména tvorba makroskopických kolonií. Větší část zástupců rodu žije mimo vodní prostředí. Nejčastější zástupce, *N. commune*, tvoří tmavě zelené několika centimetrové kolonie na písčité půdě. Často tyto kolonie nacházíme na okrajích cest, ale i ve stepích a na polopouštích (Tamaru et al., 2005). Velké množství druhů r. *Nostoc* bývá součástí

symbiotických vztahů (např. *N. symbioticus* v *Geosiphon pyriforme*, v lišejníku *Colema* je *N. commune*, několik druhů žije v pletivech cykasů, atd). V rámci rodu *Nostoc* probíhá velmi intenzivní výzkum, např. i proto, že stále nejsou vyjasněny taxonomické vztahy mezi volně žijícími druhy a symbionty (Lokmer, 2004).

Sinice mohou být velmi užitečné. Některé sinice, jako např. *Spirulina* se pěstují ve velkém a jsou pro svůj vynikající nutriční benefit vyhledávaným potravním doplňkem (Borowitzka and Borowitzka L., 1988). *Trichormus doliolum* a některé další sinice se očkují do rýžových polí, která, díky své schopnosti fixovat atmosferický dusík, hnojí. Některé sinice se také pro svůj vysoký obsah karotenoidů přidávají do krmiv pro zlepšení barevnosti např.okrasných rybek. Sinice jsou také tradiční ve východních kuchyních jako přísada do polévek a sushi (Antar and Zorica, 2008). Např. *N. flagelliforme* se používá v čínské kuchyni jako surovina pro přípravu některých polévek. Každoročně je objevována a v odborné literatuře prezentována široká škála nových zajímavých metabolitů sinic (Leão et al., 2013; Zhenga et al., 2013), což naznačuje intenzivní výzkum na tomto poli.

1.2. Kultivace sinic

Jak již bylo řečeno, sinice jsou velmi cenným zdrojem látek potenciálně použitelných ve farmacii, potravinářství a kosmetickém průmyslu. Výhodou zkoumání jejich sekundárních metabolitů je to, že tyto organismy mají krátkou generační dobu a jsou schopny růstu v masových kulturách, které mohou být snadno ovlivňovány kultivačními podmínkami tak, aby bylo dosaženo optimální produkce žádaných bioaktivních látek. Je tedy nezbytné a zásadní nastavit nejlepší růstové podmínky pro produkci biomasy a také pro syntézu metabolitů, což spolu nemusí korespondovat.

Pro studium a prvotní experimenty je používáno laboratorních kultivací v různě velkých Petriho miskách, Erlenmayerových lahvích, kultivačních válcích a akváriích. Pokud je aktivní látka nalezena, je nutno získat větší objemy biomasy, k čemuž bylo vyvinuto několik typů zařízení pro masovou kultivaci. S oblibou je používáno kultivací v dlouhých osvětlených trubcích probublávaných vzduchem, plochých kultivačních nádob, nebo bazénků, v nichž je biomasa mícháním provzdušňována (Materassi et al., 2009; Tredici et al., 1991; Tredici and R., 1992). V oboru masových kultivací jsou MBÚ Třeboň a Nové Hrady předními evropskými pracovišti. Unikátní byl tamější vynález kultivace na

plošinách, který vyžaduje minimum externí energie a poskytuje vysoké výnosy (Setlík et al., 1970).

1.3. Toxiny produkované sinicemi

Brilantní schopnost sinic přizpůsobit se je umožněna nejen specializovanými buňkami – viz kap. 1.1., ale v neposlední řadě také schopností produkovat plejádu látek, sekundárních metabolitů, které nejsou nezbytné pro život, ale svému producentovi poskytují jisté výhody. Zde se zaměříme na toxiny, které se dají třídit na příklad dle mechanismu jejich účinku (biologické aktivity) na inhibitory enzymů, antibiotika, imunosupresiva, látky s účinky fungicidními, cytotoxickými, virucidními apod. (Burja et al., 2001). Dále dle účinku na savčí organismus: hepatotoxiny, neurotoxiny, teratotoxiny atd., nebo dle jejich chemické povahy: peptidy, lipopeptidy, terpenoidy, alkaloidy, makrolidy, mastné kyseliny, polycyklické ethery aj. Obecně lze tedy říci, že sinice produkují ohromné množství chemicky rozmanitých sekundárních metabolitů, přičemž schopnost biosyntézy určité látky je v řadě případů specifická jen pro daný kmen a tudíž nepředstavuje sjednocující znak všech kmenů daného taxonomického souboru.

Některé sinice mohou produkovat několik cyanotoxinů současně (Haider et al., 2003), naproti tomu některé populace jinde toxických sinic mohou na některých stanovištích svou schopnost velmi omezit, nebo dokonce zcela eliminovat (Mbedi S et al., 2005; Vezie C, 1998). Toxicitu vykazují také přímo lipopolysacharidy, které jsou součástí buněčných stěn všech sinic (Weise et al., 1970). Množství toxinů se může také výrazně měnit během vegetační sezóny (Sivonen and Jones, 1999), nebo může být ovlivněno přísunem živin, světla či teploty (Dolman et al., 2012; Rapala et al., 1997b; Sivonen, 1990b). Bylo popsáno mnoho případů úhynu krav, koz, ovcí, psů a dalších zvířat v důsledku otrav z vody zamořené sinicemi (zejména těmi produkujícími mikrocystin, tedy sinicemi rodu *Microcystis*, ale i *Nostoc* a další) (Duy et al., 2000). Jsou popsána i úmrtí lidí. Nejhorší případ se odehrál v Brazílii v 90 letech minulého století, kdy po zamoření nádrže s pitnou vodou zemřelo na 50 lidí (Azevedo et al, 2002). To však byli pacienti s poškozenými ledvinami a sinicové toxiny se dostaly do dializačního roztoku. Sinice produkují také toxiny toxické k jiným cyanobakteriím, bakteriím, řasám a zooplanktonu (Leflaive and Ten-Hage, 2007). Např. extrakty *Microcystis aeruginosa* mají biocidní efekt na *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas*

hydrophila (Foxall and Sasner, 1988). Byly pozorovány případy intoxikace rybího plůdku extrakty *Planktothrix agardhii* (Oberemm et al. 1997).

Sinice se odlišují od ostatních organismů v mnohém, mimo jiné také v mnoha metabolických drahách. Zajímavé je, že produkují neribozomální peptidovou syntézou řadu cyklických a lineárních peptidů, které mají ve své molekule často začleněny méně obvyklé typy aminokyselin, např. β -aminokyseliny, D-aminokyseliny či dehydroaminokyseliny. Příkladem je např. nodularin (Brett et al., 1999). Tyto peptidy bývají ještě dále modifikovány, např. dodatečnou metylací směřovanou na dusík podílející se na peptidové vazbě (Namikoshi et al., 1993). Pravděpodobně nejznámějšími cyanotoxiny jsou mikrocystiny, což jsou cyklické heptapeptidy produkované zástupci sinic rodů *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* aj. Tyto toxiny jsou zodpovědné za největší počet otrav vodním květem. V současnosti je známo téměř 70 strukturních variant mikrocystinů (Perron MC et al., 2012). Působí hepatotoxicky, jejich hlavní mechanismus účinku je založen na inhibici proteinfosfátáz 1 a 2A a následném zborcení cytoskeletu v důsledku hyperfosforylace a jsou považovány za promotory kancerogeneze (Apeldoorn et al., 2007). V literatuře (Bury et al., 1995) je popisován vliv mikrocystinů na růst ryb, jimž způsobují iontovou disbalanci a ryby náležitě nepřirůstají.

Nodulariny jsou monocyklické pentapeptidy produkované planktonními sinicemi rodu *Nodularia*, zejména *Nodularia spumigena*. Tyto látky mají podobný mechanismus účinku jako mikrocystiny. Známa je také netoxická varianta nodularinu (Namikoshi et al., 1994). Depolymerizace aktinu je mechanismem účinku makrolidické cytotoxicky působící látky s názvem Tolytoxin (Patterson et al. 1993). U některých cyanobakteriálních toxinů byla popsána interference s procesem replikace DNA (Teneva et al. 2003). Při extrakci biomasy sinice *Nostoc ellipsosporum* do vody byl izolován cyanovirin-N (Gustafson et al., 1997). Tento protein tvořený 101 aminokyselinami má antivirovou aktivitu vůči HIV-1, HIV-2 a SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Nostocyklamid M je cyklický peptid s aleopatickou aktivitou izolovaný ze sinice *Nostoc* (Jüttner et al., 2001). Jiní zástupci rodu *Nostoc* produkují další biologicky zajímavé peptidy např. banyasid A a B (Pluotno and Carmeli, 2005), nostopeptin BN920, depsipeptid cryptophycin (Trimurtulu et al. 1994, Smith et al 1994), který způsobuje

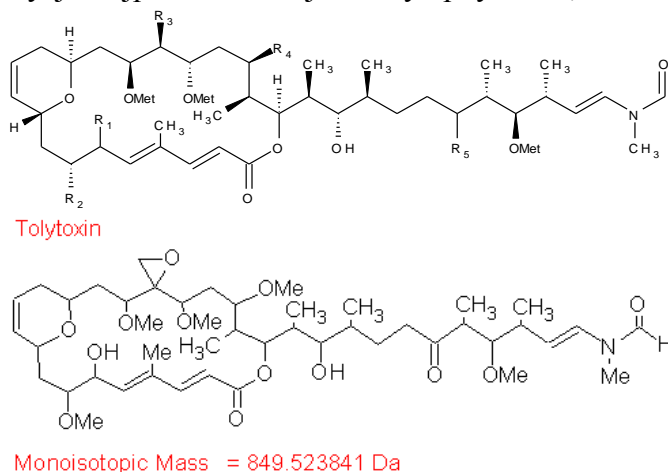
depolymerizaci tubulinu již v nanomolárních koncentracích a je schopen zastavit kancerogenezi (Teicher *et al* 2000), nostoginin BN741 (Ploutno and Carmeli, 2002) nebo microviridiny (Murakami *et al.*, 1997), které působí jako inhibitory proteáz. Mořský kmen sinice *Nostoc linckia* produkuje látku borophycin, která vykazuje silný cytotoxický účinek (Hemscheidt *et al.*, 1994). Borophycin produkovaný *Nostoc linckia* and *Nostoc spongiaeforme var. tenue* je polyketid, který ve své molekule obsahuje atom boru. Jak z chabého výčtu patrně, rod *Nostoc* je velmi bohatým zdrojem bioaktivních metabolitů. Ke zmíněným můžeme přidat nostocin A (Hirata *et al.*, 1996), tenucyclamide A–D (Banker and Carmeli, 1998) produkovaný *N. spongiaeforme*, noscomin (Jaki *et al.*, 1999) a comnostin A–E (Jaki *et al.*, 2000) produkovaný *N. commune*, muscoride (Nagatsu *et al.*, 1995), cyanovirin (Boyd *et al.*, 1997) a nostocarboline (Becher *et al.*, 2005) z *N. linckia*, *N. muscorum*, *N. Ellipsosporum* a dalších druhů rodu *Nostoc*. Sinice produkují toxiny inhibující acetylcholinesterasu, což by bylo potenciálně využitelné pro léčbu Alzheimerovy choroby (Zelík, 2008). Fungicidní aktivita je popsána jen u minima cyanobakterií. Fungicidní aktivita a cytotoxicita byla zjištěna u nostofungicidinu, lipopeptidu izolovaného z *Nostoc commune* (Kajiyama *et al.*, 1998). Cryptophycin (Biondi *et al.*, 2004) a již zmíněný tolytoxin také fungují fungicidně (Ishibashi *et al.*, 1986; Patterson and Carmeli, 1992). U *Goniodoma sp.* byla nalezena látka s fungicidním účinkem, goniodomin A (Takeda *et al.*, 2008). Naproti tomu cytotoxických sloučenin produkovaných sinicemi je celá řada. Některé jsou již zmíněny v předešlém textu, dalšími se zabývají následující práce (Broniatowska *et al.*, 2011; Hrouzek *et al.*, 2005; Patterson and Carmeli, 1992; Trimurtulu *et al.*, 1994). Toxicitu k bunecným liniím popisují práce (Hrouzek *et al.*, 2011; Surakka *et al.*, 2005; van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Výše uvedené příklady představují pouze zlomek dosud nalezených bioaktivních látek. Obecně lze tedy říci, že sinice produkují ohromné množství chemicky rozmanitých sekundárních metabolitů. Na fakt, že sinice produkují mnohdy i velmi silné toxiny nelze odpovídat jen úvahami, jak co nejefektivněji vyhubit vodní květy, ale také je důležité si uvědomit, že to, že jsou sinice schopny takto zamořit prakticky jakýkoliv vodní útvar s dostatkem živin je důkazem jejich fantastické schopnosti přežít a množit se. Sinice se od řas a vyšších rostlin odlišují nejen po stránce fyziologické a biochemické, ale i z hlediska prozkoumaných obsahových látek, které byly u sinic prostudovány jen velmi málo

(Shimizu, 1996). A právě nalezení takovýchto nových producentů mezi autotrofními mikroorganismy je jedním z cílů této práce.

1.3.1. Scytophyciny

Jednou z nejzajímavějších skupin látek produkovaných sinicemi jsou scytophyciny. Tyto látky jsou makrolidy se základem tvořeným cyklem z 21 uhlíků a postranním řetězcem z 12 uhlíkových atomů. Scytophyciny mají molekulovou hmotnost v rozmezí od m/z 806 (Scytophycin C) do m/z 852 (6-hydroxy-7-O-metoxy-Scytophycin-D, resp. E). Substituenty, z nichž některé jsou společné pro všechny skupiny scytophycinů a některé variabilní, jsou důležité jak pro prostorové uspořádání molekuly, tak pro biologickou aktivitu. Scytophyciny byly nalezeny zhruba před 30 lety skupinou kolem profesora Moora z Havajské university. Poprvé byl Tolytoxin (6-OH-7-OMet-Scytophycin B), který je nejprozkoumanějším scytophycinem, izolován z terestrické sinice *Tolypothrix*



Obr. 1. Nahoře obecná struktura scytophycinů, dole chemická struktura tolytoxinu.

conglutinata var. *colorata* Ghose, která byla nalezena na Fanningově ostrově (Havajské souostroví) v roce 1977 (Carmeli et al., 1990; Moore et al., 1986). Tento toxin je hlavně spojován se sinicemi *Scytonema pseudohofmanni* (kmen BC-1-2, ATCC 53141), *Scytonema mirabile* (kmen BY-8-1), *Scytonema burmanicum* (strain

DO-4-1) a *Scytonema ocellatum* (kmeny DD-8-1, FF-65-1, and FF-66-3) (Carmeli et al., 1990). Dále je známo, že tolytoxin produkují i některé další sinice kromě rodu *Scytonema*, na příklad *Cylindrospermum* (Patterson et al., 1994), ale jejich výskyt nebyl nikdy zaznamenán u rodu *Nostoc*. Tolytoxin je velmi silný cytotoxin a také fungicid. Jeho toxicita u myši byla stanovena jako LD50 (ip) 1.5 mg/kg, což je srovnatelné s velmi toxickými jedy (kyanovodík má LD50 také 1.5 mg/kg). Cytotoxická funkce tolytoxinu byla dobře popsána v literatuře (Patterson and Carmeli, 1992). Tento cytotoxin inhibuje polymerizaci F-aktinu a také způsobuje depolymerizaci již zpolymerizovaných jednotek,

bez ovlivnění ostatních struktur cytoskeletu. Tento efekt je zřejmý *in vitro* při koncentracích již 2 nM, což je koncentrace padesáti až tisícinásobně menší, než efekt cytochalasinu B (Chao and Liu, 2006; Patterson et al., 1993) nebo latrunculinu (Spector et al., 1983), které působí obdobně a standardně se používají v buněčné biologii. Zajímavé je, že Tolytoxin je inhibítozem cytokineze v kulturách savčích buněk, jehož efekt po vymytí toxinu odezní, je tedy reveribilní.

1.4. Purifikace

Extrakcí se získá převážně směs látek, které je nutno od sebe oddělit a přečistit. Metod rozdělovacích (separačních) je opět celá řada a mnoho typů. Základními jsou různé chromatografie (Nováková et al., 2013; Skoog and kolektiv, 2007). Ty poskytují informace jak kvalitativní, tak kvantitativní. Existuje několik možností rozdělení chromatografických technik. Můžeme je dělit podle způsobu provedení: kolonová (sloupcová) x plošná (planární); podle principu separace: rozdělovací x adsorpční x iontově výměnná x gelová; podle kvantity výtěžku: analytická x preparativní; nebo například podle typu mobilní fáze: plynová (GC) x kapalinová (LC). Mezi kapalinové chromatografie patří: kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC); gelová permeační chromatografie (GPC); kapalinová adsorpční chromatografie (LSC); iontově výměnná chromatografie (IEC); papírová rozdělovací chromatografie (PC); nebo tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC). Dále se obecněji zmiňme pouze o technikách použitých v této práci.

1.4.1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Při tenkovrstvé chromatografii je analyt unášen spolu s vyvíjecím roztokem (organická rozpouštědla) tak, jak tento vzlíná materiálem chromatografické desky. Pozice výsledné skvrny je dána poměrem veličin charakterizujících míru zadržování ve stacionární fázi ku rychlosti migrace spolu s mobilní fází. Tato veličina se nazývá retenční faktor. U kapalinových plošných chromatografií je stacionární fáze ve formě volné vrstvičky. Buď je to nějaký práškový materiál na inertní podložce u tenkovrstvé chromatografie, nebo je to samotný chromatografický papír (obdoba filtračních papírů) u papírové chromatografie.

Po uschnutí desky a označení čela je možno skvrny zviditelnit ponořením nebo postříkáním vhodným činidlem, jímž může být např. koncentrovaná H_2SO_4 a $KMnO_4$ (destruktivní metody, oxidace většiny látek), I_2 (vizualizace organických látek); dithizon (zviditelní ionty kovů); ninhydrin (pro aminy, aminokyseliny, aminocukry), fluorescamin (aminy, peptidy a sulfonamidy); acidobazické indikátory (kyseliny nebo zásady), atd. Dále mohou být látky vizualizovány pomocí UV. Jedná se o princip fluorescence luminoforů pod UV zářením (excitace při 254 nm), nebo se dá použít naopak zhášení fluorescence tenkovrstvé desky s nanesenými fluorescenčními sondami. Chromatografie na tenké vrstvě slouží spíše ke stanovení počtu a typů jednotlivých látek, ne tolik jejich množství, i když existují TLC desky použitelné pro dělení větších vzorků (Ranný, 1984).

1.4.2. Kapalinová chromatografie

Obecně nepoužívanější metodou používanou pro separaci látek je kapalinová chromatografie. Dějiny používání sloupcové kolonové chromatografie spadají do roku 1903, kdy ruský vědec M.S. Cvět (Cvet, 1903) v efektním pokusu jako první rozdělil na sloupci v uspořádání kapalina-adsorbent listová barviva (chlorofyly a karotenoidy).

Pokud je stacionární fází voda, hovoříme o chromatografii s normální fází. Obvykle bývají ale zakotveny spíše organické kapaliny (obvykle spíše málo polární) – zde hovoříme o obrácené fází. Nosiče zakotvených kapalin mohou mít různé chemické složení. Mezi nejfrekventovanější patří oxid křemičitý, dále sklo, různé polymery, škrob, celulóza a další.

Při volbě mobilní fáze postupujeme podle klesající polarity rozpouštědel, tak jak jsou řazena v mixotropické řadě – voda, methanol, ethanol, aceton, fenol, n-butanol, ethylacetát, diethylether, trichlormethan, benzen, tetrachlormethan, cyklohexan, hexan, parafinové oleje – platí, že podobné rozpouští podobné a čím jsou rozpouštědla v řadě od sebe dále, tím hůře se mísí. Někdy bývá vhodné použít určité směsi těchto rozpouštědel.

Pokud je materiál dělicího média ke všem děleným složkám zcela inertní a specificky nezadržuje žádnou z nich, hovoříme o gelové permeační chromatografii. GPC slouží pro dělení směsí látek podle jejich molekulových hmotností. Běžně tak můžeme dělit směsi relativně nízkomolekulárních látek o hmotnosti řádu tisíců až desetitisíců daltonů i směsi velmi vysokomolekulárních látek s molekulovou hmotností statisíců až milionu. Tato

metoda je založena na rozdílné průchodnosti otvorů a dutých výklenků na částicích stacionární fáze pro různě velké částice dělené směsi. V konečném efektu z chromatografické kolony vyteče jako první složka s největší velikostí a jako poslední složka s nejmenšími. U kapalinových sloupcových chromatografií je dělicí médium – stacionární fáze – umístěno ve skleněných nebo kovových trubicích, v tzv. chromatografických kolonách. Ty mohou mít průměr od 5mm do 50mm a délku od 5 cm do 1 m i více. Pokud protéká eluční roztok jen díky gravitaci, hovoříme o tzv. nízkotlaké kolonové chromatografii. Je ale možno roztoky nutit protékat kolonou zvýšeným tlakem za použití pump (Nováková et al., 2013). Potom lze použít daleko jemnější materiál stacionární fáze a kolony se stávají pro dělení podstatně účinnější, s vyšším počtem teoretických pater a kapacitnější díky většímu povrchu stacionární fáze. Pokud promýváme kolonu elučním činidlem o stále stejném složení, hovoříme o tzv. izokratické eluci. Mnohdy však během eluce musíme složení elučního činidla měnit (např. jeho iontovou sílu, pH, poměr polárních a nepolárních rozpouštědel apod.) a potom se jedná o tzv. gradientovou eluci. K tomu je zapotřebí mít k dispozici programovatelné pumpy míchající roztoky v různém poměru nebo pumpu spojenou s míchačkou gradientů, ke které jsou připojeny dva zásobníky rozdílných roztoků.

Detektorů založených na měření různých fyzikálně chemických parametrů látek vystupujících z chromatografických kolon existuje velké množství. Jejich podrobnější popis by zabral mnoho stran. Liší se od sebe nejen fyzikální podstatou měření, ale i použitelností a citlivostí. Zde vyjmenujeme jen typy těch častěji používaných. Přístroje průtokové jako jsou UV-VIS; DAD (Diode Array Detector); fluorimetry; polarimetry; vodivostní detektory; coulometry; dielektrimetry; refraktometry; radiometry a další. (Nováková et al., 2013).

1.4.3. Iontová chromatografie

Na tomto místě se ještě krátce zmíním o technice iontové, nebo také iontoměničové chromatografie, která byla v prezentované práci použita pro kvantifikaci živin v kultivačních médiích sinic. Iontová chromatografie (IC) je analytická metoda, pomocí které lze stanovit stopové koncentrace některých aniontů, případně kationtů. Podle toho se označuje jako aniontová a kationtová. Její princip je založen na iontových interakcích

molekul analytu iontové povahy s povrchem stacionární fáze, která obsahuje iontové funkční skupiny nesoucí oproti analytu opačný náboj. U IC lze využít detekční systémy různého typu, nicméně univerzálním je detektor vodivostní, určený zejména pro analyt iontového charakteru. Hlavní složkou mobilní fáze je obvykle voda, do níž jsou přidávány různé anorganické i organické kyseliny a zásady. Složení mobilní fáze se pro kationtovou i aniontovou analýzu liší. Většina aplikací pro analýzu aniontů je prováděna isokraticky a díky mobilní fázi na bázi bivalentní/monovalentní soli i velmi rychle bez nutnosti použití gradientu pro urychlení retence vícemocných aniontů. Výhoda oproti gradientovým řešením s využitím např. NaOH je především úspora času během analýz, kdy není třeba čekat na ustálení vodivosti pozadí mezi jednotlivými analýzami a také úspora finanční. Důležitou součástí pro aniontovou analýzu je supresor, který snižuje vodivost pozadí a tím zvyšuje citlivost. Pro kationtovou IC se používají mobilní fáze na bázi vody a silné minerální kyseliny (kyselina chlorovodíková nebo dusičná), většinou v kombinaci s organickými kyselinami. Pro IC je možno použít mnoho různých stacionárních fází tvořených organickými i anorganickými materiály. Všechny na svém povrchu nesou funkční skupiny umožňující iontovou výměnu. Pro praktické účely v IC je nejvhodnější použít stacionární fáze na bázi modifikovaných organických polymerů a silikagelu (Baldrianová and Barath, 2011).

1.5. Identifikace

1.5.1. Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která stanovuje hmotnosti atomů, molekul a jejich částí – molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty (McCloskey, 1990). Základy její historie spadají do roku 1886, kdy německý fyzik Eugen Goldstein dělal pokusy s paprsky nabitého plynu ve vakuu (resp. za sníženého tlaku), které cestovaly od anody ke katodě a naopak dle náboje. V roce 1899 bylo Willhelmem Wienem zkonstruováno první zařízení s paralelním elektrickým a magnetickým polem, které již bylo schopno separovat soubor pozitivně nabitých částic podle jejich poměru náboje k hmotě (Q/m). Jeho práce byla následně vylepšena angličanem Josephem J. Thomsonem, který snížil tlak v trubici. Jeho separace neonových izotopů byla prvním příkladem hmotnostní spektrometrie (Downard, 2009).

Základní schéma v současnosti používaných hmotnostních spektrometrů vypadá takto: dávkování vzorku – ionizační metoda – hmotnostní analyzátor – detektor – PC. Krom prvního a posledního se všechny kroky odehrávají ve vakuu. Hmotnostní spektrometr může být (kontinuálně) napojen na výstup některé separační metody (1D, 2D ELFO, capLC, MudPIT, nebo HPLC), přičemž je ale také možno dávkovat přímo. Nejobvyklejším je spojení HPLC/MS, které bylo použito pro řešení této práce.

Ionizací rozlišujeme několik základních typů. Elektronová ionizace (EI) je konvenčním způsobem ionizace a také nejstarší ionizační technikou. Bývá označována jako “tvrdá” ionizační technika. Ionizovaná molekula při ní získává nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekuly. U tvrdých technik dochází k rozsáhlejší fragmentacím oproti měkkým technikám, při nichž je dodaná energie malá a odštěpují se pouze malé části molekul nebo přednostně zůstávají molekulární ionty s velkou intenzitou. Měkkou ionizační technikou je například ionizace působením elektrostatického pole (FI, FD), kde emitör (katoda) je tenký drátek o průměru 10 μm na nějž je vloženo vysoké napětí (5-20 kV), které vytvoří velký potenciálový gradient (10⁷-10⁸ V/cm), který umožní odštěpení nejslaběji vázaného elektronu z molekuly a jeho zachycení anodou. Vznilý molekulární iont M^+ má malou vibrační energii, proto se fragmentuje minimálně. Další měkkou technikou je chemická ionizace (CI). Od EI se odlišuje přítomností tzv. reakčního plynu ve zdroji (metan, amoniak a další) s tlakem cca 100 Pa. Molekuly reakčního plynu jsou ionizujícími elektrony ionizovány nejdříve a ty poté ionizují molekuly analyzovaných látek. Výhodou této techniky je tvorba i záporných iontů. Záporně nabitě ionty mohou pomoci s identifikací molekulárního iontu a potvrdit také další fragmenty při rekonstrukci molekuly. Dalším typem je například ionizace nárazem rychlými atomy nebo ionty (FAB - Fast Atom Bombardment, FIB –Fast Ion Bombardment). Dříve byl pro tuto techniku používán název “hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů” (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS). Při ionizaci FAB dochází k ionizaci interakcí vysoko-energetických neutrálních molekul vzácných plynů (nejčastěji atomy Xe, nebo Ar) se vzorkem. V případě FIB se místo neutrálních molekul k bombardování vzorku používají urychlené ionty (většinou Cs^+). Další velmi zajímavou technikou je ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI - matrix assisted laser desorption/ionization), která využívá jemné zplynění pevného vzorku laserovým pulzem. Byla vyvinuta F.

Hillenkampem a M. Karasem (Hillenkamp and Karas, 1988). Vzorek analyzované látky je součástí matrice. Hillenkamp s Karasem používali organickou matici na pevném povrchu, kdežto jejich konkurent Koichi Tanaka se zabýval použitím kovového prášku v kapalně matrici (jeho přínos spočívá v aplikaci metody jemné laserové desorpce - SLD, soft laser desorption - k ionizaci velkých molekul, jako jsou proteiny). Krátký mírný laserový pulz z matrice (obsahující analyt) uvolňuje ionty, které je možno analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Nejvíce používaným laserem je dusíkový UV laser (4 ns pulz, UV 337 nm) a dále IČ lasery, které jsou ale dražší. U UV laserů bývají matricí zejména aromatické karboxylové kyseliny např. kyselina dihydroxybenzoová, chlorsalicylová, skořicová apod, protože absorbují při žádané vlnové délce. Dalšími typy ionizací jsou ionizace fotony, ionizace ^{252}Cf (Plasma desorption) a velmi oblíbená ionizace elektrosprejem (ESI), nebo termosprejem. Tato technika je často používanou ionizační technikou a také v naší laboratoři tuto techniku využíváme. Historie této techniky spadá do roku 1988, kdy američan John Fenn (Nobelova cena za chemii 2002 - za vynález ESI a MALDI spolu s Koichim Tanakou a Kurtem Wüthrichem) publikoval své pokusy se zaváděním ředěného roztoku analytu o průtoku několika mikrolitrů za minutu velmi úzkou kapilárkou z vodivého materiálu do rozprašovací komůrky. Na kapiláru se vkládá vysoké napětí (jednotky kilovoltů), což způsobí, že se kapalina rozprašuje ve formě nabitého aerosolu. Rozpouštědlo se z povrchu aerosolových částic rychle odpařuje, hustota náboje stoupá, až dojde k roztržení molekul a vzniknou podstatně menší částice, z nichž se molekuly rozpouštědla vypařují ještě rychleji. Ve zředěné plynné fázi tak rychle vznikají ionty zbavené rozpouštědla. Přidávaný plyn pomáhá ionizovaným částicím zbavovat se rozpouštědla a také nadbytečné kinetické energie, a nakonec se systémem vakuových clon a štěrbinových elektrod vytvoří svazek iontů pro hmotnostně spektrometrickou analýzu. Metoda nachází uplatnění v analýze velmi složitých látek, jako jsou nukleové kyseliny, cukry, peptidy i proteiny. Vícenásobný náboj iontů navíc dovoluje analyzovat s pomocí jednoduchých spektrometrů látky o velmi vysoké molekulové hmotnosti.

Hmotnostní analyzátoři umožňují rozdělit směs iontů prostorově nebo časově podle jejich různých fyzikálně-chemických vlastností. Zmíňme princip několika základních typů. Kvadrupolový analyzátoř, který bývá také zván Paulova past (podle jeho vynálezce

Wolfganga Paula – nobelova cena za fyziku 1989), je tvořen čtyřmi paralelními kovovými tyčemi symetricky uspořádanými vzhledem ke směru procházejících iontů. Ionty, které jsou vytvořeny v iontovém zdroji postupně procházejí přes kvadrupol, čehož je dosaženo měněnými velikostmi napětí na jednotlivých tyčích. Kvadrupolové analyzátoři jsou jednoduché, lineární nebo trojnásobné (triple). Na analogickém principu jako kvadrupolové analyzátoři pracuje Iontová past. Princip cyklotronové resonance s Fourierovou transformací (FT-MS, ICR-MS) je založen na pohybu iontů po kruhových drahách v homogenním velmi silném magnetickém poli. Ionty procházejí několika fázemi usměrnění pomocí vzrůstajícího vakua do ICR cely, která je umístěna uvnitř chlazeného supravodivého magnetu. Hmotnost iontů je přepočítávána pomocí Fourierovy transformace, což je zjednodušeně řečeno převod časových signálů na frekvenční. Velkou výhodou této metody oproti ostatním je to, že při ní nedochází k destrukci iontů na detektoru. Zachycené ionty je možno následně podrobovat dalším analýzám. Průletový analyzátoř (TOF) pracuje tak, že ionty z iontového zdroje jsou urychleny napětím a měří se doba průletu iontu trubicí k detektoru. Dalšími analyzátoři jsou analyzátoři hybridní (Q-TOF, Q-trap, TOF-TOF, trap-TOF, trap-ICR, a další) (Hoffmann and Stroobant, 2007)

Detektory vydávají signál úměrný množství dopadajících iontů. Dělí se do dvou skupin:

1. Detektory pro přímá měření detekují el. proud, který je úměrný počtu dopadajících iontů. El. proud vzniká přímým dopadem stanovovaných iontů.
2. Mnohem častěji jsou užívané tzv. Násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů uvolněných po dopadu iontů. Tyto detektory jsou schopny poskytnout signál pro jednotlivé ionty. Násobiče pracují na principu sekundární emise elektronů.

Výsledkem je záznam iontů ze zkoumaného vzorku, tzv. hmotnostní spektrum, na kterém je v závislosti na hodnotě m/z vyneseno zastoupení (intenzita) jednotlivých iontů (McCloskey, 1990).

1.6. Testování aktivity

1.6.1. Buněčné linie

Buněčné linie jsou odvozeny zejména ze savčích buněk, ačkoli máme i linie kultivované z rostlin, hub, či mikroobů. Pěstování buněčných kultur předcházelo pěstování kultur orgánových a tkáňových. Historie objevu možnosti udržovat buněčné linie spadá do první poloviny 20 století (Carrel and Burrow, 1911), ale již v 19 století byly zkoušeny postupy, jež by vedly v uchovávání buněk při životě mimo jejich přirozenou tkáň. Tehdy Anglický fyziolog Sydney Ringler vyvinul roztok solí (NaCl, KCl, CaCl, MgCl), který byl vhodný pro uchovávání izolovaného savčího srdce a v roce 1885 Wilhelm Roux udržel část kuřecího embrya v živém stavu po několik dní (Alberts, 1998). Buňky odvozené přímo ze subjektu se nazývají primární buňky. S výjimkou některých buněk z nádorů mají primární buněčné kultury omezenou délku života. Po jistém počtu zdvojení (Hayflickův limit) buňky začnou stárnout (senescence) a přestávají se dělit. Pro vývoj „nesmrtelných“ buněčných linií byly buňky buď podrobovány náhodným mutacím, nebo přímým genetickým manipulacím, čímž bylo dosaženo např. ovlivnění exprese telomerázového genu. Mnoho buněčných linií bylo vyvinuto jako model konkrétního buněčného typu (na příklad hepatocyt). Udržování nesmrtelných buněčných linií vyžaduje v podstatě jen kultivaci v předepsaném médiu při kontrolovaných podmínkách (typicky 37 °C, 5% CO₂ pro savčí buněčné linie). Kultivace při jiných podmínkách může vést k produkci rozdílných fenotypů. Růstová média pro různé linie se mohou lišit v hodnotě pH, koncentraci glukózy, růstových faktorech a přítomnosti dalších živin. Růstové faktory, přidávané do jednotlivých médií, jsou vždy odvozeny ze zvířecí krve, např. telecí serum. Buňky mohou růst buď v suspenzi, nebo jako adherentní. Některé buňky přirozeně žijí v suspenzi (krevní buňky), některé buňky byly také modifikovány, aby byly schopny žít v suspenzi, což umožní kultivaci většího množství buněk, než by se mohlo nakultivovat v adherentní kultuře. Adherentní buňky vyžadují povrch, na nějž by se přichytily. Tento může být pokryt speciálními matricemi usnadňujícími přisednutí, tyto matrice mohou také poskytovat signály pro růst a diferenciaci buněk. Většina buněk izolovaných z tkání jsou adherentní. U těchto kultur je výhoda, že kultivační médium může být snadno obměněno.

HeLa buněčné linie pochází z roku 1951. Jedná se o první lidskou buněčnou linii derivovanou z epiteliálních buněk karcinomu děložního čípku 31 leté Henrietty Lacks. Proliferují velmi rychle a to i ve srovnání s jinými rakovinnými buňkami. Jako ony, také

HeLa buňky mají během svého dělení aktivní verzi telomerasy, která zabraňuje zkracování telomer (Gey et al., 1952). Bez tohoto zkracování nedochází k buněčné smrti. Takto buňky nádorů obcházejí Hayflickův limit, který normálně činí cca 40-60 zdvojení. HeLa buněčná linie roste v kultuře v jedné vrstvě. Tyto kultury jsou výhodné pro průběžné mikroskopické pozorování změn buněčné morfologie a postižení buněčných struktur. Buňky jsou dlaždicového tvaru. Buněčný cyklus HeLa buněk trvá zhruba 22 hodin, z toho G1-fáze 8 hodin, M-fáze 1 hodinu, G2-fáze 4 hodiny a S-fáze 9 hodin (Adler et al., 1988). Buněčných linií je veliké množství. Zde používané další linie YAC-1 a SP/2 jsou myší immortalizované buněčné linie lymfoblastomu a myelomu. YAC-1 jsou neadherentní a indukované virem murine leukemia (Mo-MuLV) a SP/2 jsou semiadherentní linie zformované fúzí buněk BALB s buňkami P3X63Ag8 myelomu (Kieśliling et al., 1975; Shulman et al., 1978).

1.6.2. Žábřonožky

Artemia salina je druh vodního korýše, který je příbuzný k listonohům a perloočkám. Jedná se o velmi staré organismy, které se příliš změnilo za posledních 100 miliónů let. Žijí ve slaných jezerech. Dospělci mají 3 oči, 11 párů nohou a mohou dorůst do velikost zhruba 15 mm. Jejich krev obsahuje hemoglobin. Samci se liší od samic výrazně delšími druhými anténami, které jsou přeměněny na uchopovací orgán používaný při páření. Samice produkuje vajíčka buďto oplozená po kopulaci, nebo partenogeneticky. Existují dva druhy vajíček. Tenkostěnné, které se vylíhnou téměř okamžitě a tlustostěnné, které mohou přežít nepříznivé podmínky. Toto dormantní stadium může přežít i po několik let na suchu a vylíhnou se po umístění do vody. Samice produkuje tato tlustostěnná vajíčka, pokud se blíží vyschnutí nádrže a zakoncentrovává se solný roztok, nebo také změnou poměru typů vajíček reagují na stres způsobený například přítomností cyanobakteriálních toxinů (Shurin and Dodson, 1997). Z vajíčka se vylíhne larva (nauplie), která je zhruba 0,5 mm dlouhá. Má pouze jedno jednoduché oko, které zaznamenává přítomnost světla. Nauplie plavou za světlem, zatímco dospělci od světla. Později se vytvoří další 2 oči. Jsou schopny žít ve vodě, která má mnohem méně, nebo více soli, než je normální slanost mořské vody. Tolerují slanost až 50%, což je téměř nasycený roztok, ale jsou velmi citlivé na jód, který je ve standardní kuchyňské

soli. Ve sladké vodě umírají do hodiny. Jejich barva je závislá na koncentraci soli. Pokud je roztok slanější, dostávají narudlou barvu. Živí se hlavně zelenými řasami.

Žábronožky bývají pro svou citlivost často používány jako levný model pro testy cytotoxicity (Lahti et al., 1995). Existují práce ukazující dobrou korelaci výsledků testů prováděných na žábronožkách a testů na buněčných liniích (Anderson et al., 1991) a testech hepatotoxicity (Kiviranta et al., 1991). Nicméně stále častěji se objevují indicie, že testování cytotoxicity na žábronožkách rozhodně s testy na buněčných liniích srovnatelné není (Berry et al., 2004; Jaki et al., 1999; Hisem et al., 2011). Ve zmíněných pracech byly prokázány mnohem častější inhibice růstu buněčných linií, oproti testování na žábronožkách, u nichž se cytotoxické působení mnohdy neprojevovalo. Z toho je třeba vycházet a brát testy na buněčných liniích a žábronožkách jako za sebe nezaměnitelné.

1.6.3. Houbové patogeny

Houbových patogenů je obrovské množství. V následujícím textu se stručně zmíním alespoň o konkrétních druzích, či rodech, na nichž bylo prováděno testování v rámci této práce. *Alternaria* přísluší do říše *Fungi*, podříše *Eumycota* a třídy *Fungi imperfecti: Deuteromycetes*. U některých rodů je známo pohlavní stadium, ale podle některých autorů je *A. alternata* pohlavní stadium rodu *Pleospora* (Kirk et al., 2001). S tímto nejrozšířenějším druhem je v rámci rodu nejvíce taxonomických problémů. Vzhledem k jeho nespecifickým vazbám na hostitele a dalším nejasnostem v determinačních znacích je tento druh označován jako tzv. kolektivní. Je popisováno na 50 druhů rodu *Alternaria*. Jsou nalézány po celém světě a mají vysokou schopnost adaptability na dané prostředí. Osidlují mnoho typů substrátů, napadají jak rostliny, tak živočichy (Andrew and Peever, 2009). U rostlin se napadení projevuje nejčastěji listovými skvrnitostmi, u obilovit tzv. černání špiček zrn. Podílí se často na padání klíčnicích rostlin. Jedná se o významný rostlinný patogen.

O zástupcích rodu *Dendryphon* (říše *Fungi*, podříše *Ascomycota*, třída *Dothideomycetes*, řád *Pleosporales* a čeleď *Pleosporaceae*) se spekulovalo jako o možném nasazení jako regulace stavů porostů máku a tím trhu s opiem (Bailey et al., 2000). Způsobuje totiž tzv. Helminthosporiosu, což je jedna z nejvýznamnějších chorob máku, proti níž je velmi nesnadná ochrana. Z rodu *Botrytis* (*Fungi*, *Ascomycota*, *Leotiomyces*, *Helotiales*,

Sclerotiniaceae) je nejznámějším zástupcem druh *Botrytis cinerea* (plíseň šedá), která poměrně nespecificky napadá téměř jakékoli oslabené rostliny (Govrin and Levine, 2000). K její redukci se používá zejména preparáty na bázi Mancozebu, což je komplexní sloučenina obsahující mangan a zinek. Pokud napadá révu vinnou, tak bývá označována jako ušlechtilá plíseň, protože snižuje obsah vody v hroznu a tím zvyšuje jeho cukernatost. Rod *Sclerotinia* (česky Hlízenka, říše *Fungi*, oddělení *Ascomycota*, podkmen *Pezizomycotina*, třída *Leotiomycetes*, řád *Helotiales*, čeleď *Sclerotiniaceae*) je také významným rostlinným patogenem, který napadá mnoho kulturních plodin (mák, řepka, brambory, slunečnice, a další) (Purdy, 1979). Způsobuje tzv. bílou hnilobu. *Aspergillus* (česky Kropidlák) patří do skupiny vřeckovýtrusných hub z řádu *Eurotiales* (*Fungi*, *Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Eurotiomycetes*, *Eurotiales* (Plesnivkotvaré), *Trichocomaceae*). Způsobují tzv. aspergilosu, tedy potíže s dýcháním nebo kožní problémy u živočichů. Napadá ale také rostliny, např. nedobře uskladněné obilí, nebo burské ořechy. Je významným producentem aflatoxinů. *Phoma pinodella* (česky Bodka (*Fungi*, *Ascomycota*, *Dothideomycetes*, *Pleosporales*)). Napadá specificky bobovité rostliny, kde způsobuje tmavé léze na luscích, ale také na vegetativních částech. Přežívá v půdě, nebo i na semenech po několik let. Pycnidiospory se dále šíří větrem, nebo deštěm.

1.7. Vizualizace vnitřního uspořádání buňky

Možnosti studia vnitřního uspořádání v buňce jsou v podstatě dvojí. Buď extrakce a separace jednotlivých komponent – např. bílkovin a jejich zkoumání, a nebo detekce přímo v buňkách pomocí barvení a následného zobrazení. Pro vizualizaci F-aktinu se nejčastěji používá phalloidin konjugovaný s TRITC, pro vizualizaci G aktinu DNAsa I konjugovaná s Alexa Fluor 488 a pro vizualizaci DNA barva DAPI (Small et al., 1999).

Prvním krokem pro přípravu vzorku je jeho fixace. Ta je nezbytná, protože brání autolýze tkáně a vzorek je takto uchován takřka ve svém přirozeném stavu. Pro fixaci se používá formaldehyd vytvářející kovalentní vazby mezi proteiny v tkáni. Formaldehyd se po příslušné době působení vymyje vhodným roztokem (např. fosfátovým pufrém) a nechá se inkubovat s barvami (např.: phalloidinem-TRITCa DNázou I-Alexa Fluor 488). Poté je nutno opět promýt roztokem, který byl používán prve, čímž se odstraní nenavázané

barvy. Poté je možno přistoupit k pozorování ve fluorescenčním mikroskopu. Aminokyseliny se barví pomocí Coomassie Brilliant Blue, která po navázání změni barvu roztoku z hnědé na modrou, která se následně detekuje při 595 nm. Pokud je nutno kvantifikovat množství, je nutno vytvořit kalibrační křivky podle známých koncentrací. K vizualizaci struktur značených fluorochromem je potřeba použít fluorescenční mikroskop. Fluorochromy jsou barviva, která jsou schopna absorbovat světlo kratší vlnové délky (modré, fialové, UV) a emitovat jej jako světlo s delší vlnovou délkou. Molekuly fluorochromů podléhají při excitaci nevratným konfirmačním změnám a proto emitované světlo postupně slábne (dochází k tzv. vysvícení). Fluorescenční mikroskopy používají jako světelných zdrojů rtuťových, xenonových výbojek, nebo někdy i laseru. Mezi zdroj a vzorek se vkládají filtry, které „vyberou“ ze spektra vhodné vlnové délky vhodné pro excitaci. Jsou schopny zabránit průchodu škodlivého UV záření do okuláru a tedy očí pozorovatele. Dalšími fluorescenčními barvami jsou např. FITC (FluoresceinIsoThioCyanate), TRITC (TetramethylRhodaminIsoThioCyanate), Texaská červeň, nebo DANSYL (1-dimethyl-aminonaftalen-5- sulfonylchlorid) (Alberts, 1998).

2. CÍL PRÁCE

Studium aktivních metabolitů sinic je velmi perspektivní oblastí, ať už kvůli specifickým syntetickým drahám, které mohou vyústit v syntézu netradičních látek, ale také kvůli faktu, že sinice jsou dobře kultivovatelné v masivním měřítku a tudíž výtěžky látek mohou být značné. Zatímco cytotoxicky působících metabolitů produkovaných sinicemi je poměrně hodně (viz kap. 1.3.), látky s fungicidními účinky jsou nacházeny velice zřídka. Tato práce si proto kládla za cíl prozkoumat široké spektrum sinic a nalézt nové fungicidní substance. Komerčně používaných fungicidů je sice celá řada, ale vesměs se jedná buď o sloučeniny kovů, jejichž rezidua se kumulují v půdě a znehodnocují jak rostliny, tak životní prostředí, nebo o látky selektivně inhibující pouze velmi úzkou skupinu houbových organismů. Nalezení aktivní látky v sinici *Nostoc* Luk. 5/96 se jevílo velmi nadějným kandidátem na širokospektrý fungicid. Později se však ukázalo, že se jedná o již známou látku patřící do skupiny scytophycinů. Co je nové a bezesporu přínosné je fakt, že soubor scytophycinů, dříve známé, jakožto metabolity syntetizované sinicemi rodu *Scytonema* a *Planktotrix* byly objeveny v dalším sinicovém rodu. Skupina scytophycinů také nebyla nikdy doposud lépe, než v této práci, strukturně popsána, co se týče analýz hmotnostních spekter.

Celá práce může být rozdělena do několika částí podle dílčích cílů, přičemž část 2-7 se provede pouze s vybranými aktivními kmeny:

1. Provedení screeningu co největšího množství zástupců sinice rodu *Nostoc* za účelem nalezení fungicidně působících metabolitů. Testování surových extraktů připravených z biomasy a kultivačních médií. Na základě výsledků testů vybrání kmenů s nejvyšší fungicidní aktivitou pro další studium.
2. Sledování vlivu kultivačních podmínek na produkci aktivní látky. Sledování vlivu teploty kultivačního média, intenzity osvětlení a některých nutrientů v živném médiu. Sledování produkce aktivní látky v jednotlivých fázích růstu.
3. Určení typu inhibice růstu houbových patogenů získanou aktivní látkou.

4. Vypracování optimálního izolačního postupu aktivních látek z biomasy a kultivačního média.
5. Chromatografická frakcionace surového extraktu. Zjištění aktivní frakce.
6. Purifikace jednotlivých látek na základě výsledků předešlých analýz a příprava dostatečného množství čistých látek s použitím HPLC s „on-line“ UV/MS-ESI detekcí a preparativní HPLC s UV detekcí.
7. Provedení strukturních analýz přečištěných extraktů za účelem stanovení chemické struktury aktivních látek s použitím hmotnostní spektrometrie.

3. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

3.1 Použité přístroje

K provedení této práce byly použity následující přístroje viz Tab 1.

Přístroj	Výrobce (země)	Model
Analytické váhy	Pag Oerlikon AG (Švýcarsko)	Precisa 125A
Autokláv	Adolf Wolf SANOclav (Německo)	AES-75
Centrifuga	Mechanika Precyzyjna (Polsko)	320a
Centrifuga	Andreas Hettich (Německo)	UNIVERSAL 320
Centrifuga	MLW (Německo)	K80
HPLC / ESI- MS	Agilent Technologies (USA)	Agilent 1100 Series LC/MSD Trap
Iontový chromatograf s autosamplerem	Dionex Corp. (USA)	ICS-90, AS40
Laboratorní váhy	Scaltec Instruments (Německo)	SBC 41
Lyofilizátor	Leybold AG (Německo)	LYOVAC GT3
pH metr	WTW (Německo)	inoLab pH Level 1
Preparativní HPLC	- pumpy Scientific Systems (USA)	Prep 100
Preparativní HPLC	- směšovač SunChrom (Německo)	
Preparativní HPLC	- termostat Watrex International (USA)	DeltaChrom™ CTC 100
Preparativní HPLC	- detektor Knauer (Německo)	Variable Wavelength Detector

Rotační vakuová odparka	Heidolph Instruments (Německo)	Laborota 4002 control, Rotavac senso
Termostat	VEB MLW Prüfgerate- Werk (Německo)	U7C
Třepačka	IKA® Werke (Německo)	KS 260 B
Ultrazvuková lázeň	BANDELIN electronic (Německo)	TK 100 H
Zařízení pro přípravu čisté vody	AQUAOSMOTIC (ČR)	03, 06

Tab. 1. Použité přístroje

Další jednotlivé přístroje jsou uvedeny v textu.

3.2. Použité chemikálie

K provedení této práce bylo použito následujících chemikálií (Tab. 2).

Chemikálie	Čistota	Použití
Aceton	p.a.	rozpuštědlo, složka mobilní fáze CC
Demineralizovaná voda		interní rozpuštědlo, složka mobilní fáze HPLC
Ethylacetát	p.a.	extrakční činidlo, složka mobilní fáze CC
Hexan	p.a.	Extrakční činidlo, složka mobilní fáze CC

KH_2PO_4	p.a.	složka pufru a kultivačních médií
Kyselina mravenčí	p.a.	složka mobilní fáze HPLC
Methanol	HPLC ^a	složka mobilní fáze HPLC, extrakční činidlo, rozpouštědlo
Na_2CO_3	p.a.	složka mobilní fáze IC
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$	p.a.	složka pufru

Tab. 2. Použité chemikálie a rozpouštědla. ^a – čistota odpovídá specifikacím uváděným fa Analytika, spol. s r.o. pro rozpouštědla řady MULTISOLVENT® a ANASOLVTM-HPLC

4. METODY

4.1. Původ a kultivace testovaných kmenů sinic

Kmeny testovaných sinic byly získány z následujících zdrojů:

- Sběrka půdních řas a sinic – Ústav půdní biologie AV ČR (České Budějovice),
- CCALA - Sběrka autotrofních mikroorganismů – Botanický ústav AV ČR (Třeboň).

K přípravě inokula sloužily předkultivace jednotlivých kmenů, které byly prováděny v médiu dle Zehndera (Staub, 1961) a médiu BG11 (Allen, 1968) při teplotě 25°C a konstantním osvětlení 16 W.m⁻² v Erlenmayerových baňkách umístěných na třepačkách. Ke kultivaci všech kmenů sinic pro pokusné účely sloužily skleněné válce o objemu 400 ml, v horní části opatřené gumovou zátkou. Vzájemné promíchávání kultivačního média a biomasy kultivovaných kmenů a také přívod oxidu uhličitého bylo zajištěno směsí vzduchu obohaceného CO₂ (98:2, V/V), která byla přiváděna na dno trubic skleněnou kapilárou. Přebytek vzduchu byl odváděn krátkou skleněnou kapilárou opatřenou na vnějším konci smotkem vaty kvůli minimalizaci kontaminace.

Kmen rodu *Nostoc*, který vykazoval v předtestování nadějně fungicidní působení, byl kultivován v Allen&Arnon médiu (Allen and Arnon, 1955) při konstantní teplotě (28°C) a intenzitě osvětlení (60 W.m⁻²). Po celou dobu byla zachovávána neměnná intenzita osvětlení. Kultivace byla ukončena po vyčerpání dusičnanů z kultivačního média, jejichž obsah byl průběžně kontrolován podle postupu uvedeného v kap. 4.2. Biomasa byla následně z kultivačního média separována centrifugací (15 min, 5.000 ot./min) a lyofilizována.

Lyofilizované biomasy byly použity pro přípravu extraktů testovaných na inhibiční aktivitu (kap. 4.3 a 4.4.).

4.2. Stanovování obsahu dusičnanů v kultivačním médiu

Pro stanovování přírůstků biomasy bylo použito nepřímé metody a to analýzy úbytků dusičnanových aniontů z kultivačního média pomocí iontového chromatografu (typ přístroje viz kap. 3.1.). V pravidelných časových intervalech během růstu bylo odebíráno médium pro analýzy obsahu dusičnanových aniontů. Kultura byla zastaveno probubláváním a ta si ihned začala sedat ke dnu kultivačního válce. Ve sterilní komoře bylo skleněnou pipetou odebráno 5 ml média. To bylo zfiltrováno od případných zbytků biomasy a analyzováno. Výsledky byly převáděny na množství biomasy na litr pomocí kalibrační přímky standardů pro konkrétní iontový chromatograf. Kultura byla následně opatřena zátkou vysterilizovanou nad plamenem, hrdlo kultivačního válce bylo také vysterilizováno a kultura byla opět umístěna do temperovaného akvária s konstantním osvětlením.

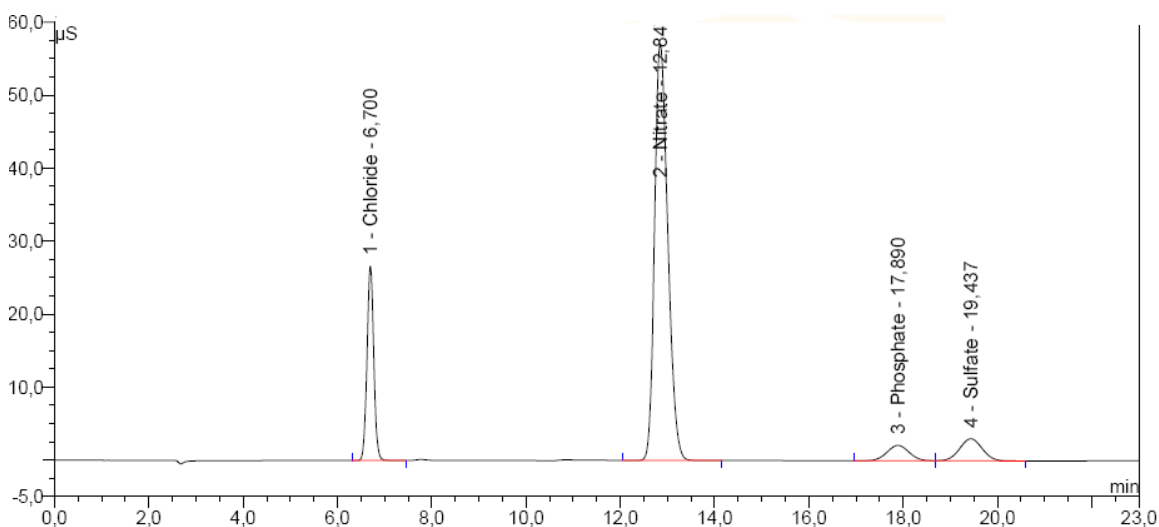
Chromatografické podmínky iontového chromatografu:

- dávkování vzorku: 10 µl
- předkolona: IONPAC® AG9-HC (4 x 50 mm)
- kolona: IONPAC® AS9-HC (4 x 250 mm)
- mobilní fáze: 9,0 mM Na₂CO₃
- průtok: 1 ml/min
- doba analýzy: 23 min
- MMS supresor: Anion MicroMembrane Suppressor, AMMS III (4 mm)

- MMS regenerační roztok: 50 mN H₂SO₄
- detekce: vodivostní detektor

4.2.1. Provedení analýzy

Po ustálení rovnováhy na koloně byl nastříknut vzorek média (3-5 ml). Obsah jednotlivých aniontů (Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ a SO₄²⁻) ve vzorku kultivačního média byl stanoven v mg/ml z ploch píků jednotlivých aniontů a jim příslušných kalibračních přímek standardů. Toto stanovení bylo provedeno automaticky s použitím programu pro ovládání iontového chromatografu ICS-90 Dionex. Zpracování a vyhodnocování dat bylo prováděno pomocí počítačového programu Chromeleon Client 6.50 SP3 Build 980. Typický chromatogram je zobrazen na Obr. 2.



Obr. 2. Typický chromatogram vzorku kultivačního média. Měření na obsah aniontů (Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ a SO₄²⁻) prováděna pomocí iontového chromatografu ICS-90 Dionex.

4.3. Příprava extraktů z lyofilizované biomasy

Pro účely screenu bylo v třecí misce homogenizováno 500 mg biomasy sinice s přídavkem malého množství přečištěného mořského písku a kvantitativně převedeno do dvou centrifugačních zkumavek celkovým objemem 10 ml 100% methanolu. Po zhomogenizování promícháním skleněnou tyčinkou bylo ponecháno 1 hod. při laboratorní teplotě. Poté byly zkumavky centrifugovány (10 min, 5.000 ot./min), extrakty byly slity, do každé zkumavky bylo přilito 5 ml 100% methanolu, promícháno skleněnou

tyčinkou a ponecháno opět 1 hod. při laboratorní teplotě. Tento postup byl zopakován celkem třikrát. Centrifugovaný supernatant byl odpařován na vakuové rotační odparce (typ viz kap. 3.1.), resuspendován do 1ml 100% methanolu a podroben testování na inhibiční aktivitu.

4.4. Příprava extraktů z kultivačních médií

50 ml kultivačního média zfiltrovaného přes demineralizovanou vodou zvlhčený filtrační papír bylo extrahováno pomocí dvou SPE kolonek (Oasis® HLB Extraction Cartridge, Waters) za sníženého tlaku 175 mBar. Kolonky byly následně vypláchnuty 2x3 ml 100% methanolu. Eluát z SPE kolon byl vysušen a resuspendován do 1 ml 70% methanolu, analyzován HPLC/MS a uskladněn při 5°C. Druhou metodou uskladnění bylo uchovávání ve vysušeném stavu v lednici přímo v srdcových baňkách se zábrusovým uzávěrem a před testováním resuspendace do 1ml 70% methanolu.

4.5. Optimalizace extrakce látek z aktivního kmene

Pro získání co největšího výtěžku fungicidních sekundárních metabolitů z aktivního kmene bylo hledáno nejvhodnější rozpouštědlo. 200 mg lyofilizované biomasy sinice kmene *Nostoc* Lukešová 5/96 bylo homogenizováno v třecí misce s přidavkem mořského písku. Směs byla extrahována pomocí 6 ml rozpouštědla. Jako rozpouštědel bylo použito: 100% methanol, 70 % (V/V) methanol v demineralizované vodě, 100% aceton, 100% hexan a 5% roztok kyseliny octové (V/V) v demineralizované vodě. Směs byla kvantitativně převedena do centrifugační zkumavky, zhomogenizována důkladným promícháním skleněnou tyčinkou a ponechána při laboratorní teplotě 1 hodinu. Následně byla směs centrifugována (15 min, 5.000 ot./min). Postup se stejným objemem rozpouštědla byl opakován ještě dvakrát. Extrakty oddělené od sedimentu byly slity dohromady do srdcové baňky, vysušeny pomocí sníženého tlaku 175 mBar na vakuové odparce při teplotě v rozmezí 30 – 35°C a uchovány v lednici při teplotě 5°C. Před analýzami a testováním aktivity byl odparek resuspendován 1 ml 70% methanolu.

4.6. Sledování vlivu kultivačních podmínek na růst a produkci aktivních u kmene *Nostoc* Lukešová 5/96

4.6.1. Sledování vlivu světla a teploty na růst a produkci aktivních u kmene *Nostoc* Lukešová 5/96

S kmenem *Nostoc* Lukešová 5/96 byla provedena série kultivačních experimentů vždy s trojím opakováním. Postupně byla sledována specifická růstová rychlost a produkce aktivních látek při různých kultivačních teplotách, intenzitách osvětlení a koncentracích vybraných živin. Způsob kultivace byl stejný, jako je popsán v Kap. 4.1, ale při zvolených kombinacích teplot (20, 25, 30 a 35 °C) a intenzit osvětlení (30, 60, 90 a 120 W.m⁻²). Stanovení specifické růstové rychlosti bylo provedeno nepřímo ze spotřeby dusičnanů z média pomocí iontového chromatografu (Kap. 4.2.).

Po zaočkování 360 ml Allen&Arnon média 40 ml inokula byl ihned odebrán přibližně 5 ml vzorek média, který byl analyzován na obsah aniontů. Další vzorky byly odebírány ve 24 hodinových intervalech. Specifická růstová rychlost μ byla stanovena z hodnot naměřených v exponenciální fázi růstu jako směrnice integrované rovnice rychlosti růstu $\ln Nt = \mu(t - t0) + \ln N0$, kde Nt je množství spotřebovaných dusičnanů v čase t a $N0$ je množství spotřebovaných dusičnanů v čase $t0$. Kultivace byla ukončena po vyčerpání dusičnanů z média. Biomasa byla z kultivačního média separována centrifugací (15 min, 5 000 ot./min) a lyofilizována. Dále byla extrahována postupem popsáným v kap. 4.3., resuspendována do 70% methanolu (V/V) v čištěné vodě a analyzována na obsah aktivních látek pomocí HPLC/MS. Extrakce aktivních látek z kultivačního média byla popsána v kap. 4.4.

4.6.2. Sledování vlivu základních živin na růst a produkci aktivních u kmene *Nostoc* Lukešová 5/96

Vliv množství základních živin (dusíku a fosforu) v kultivačním médiu na růst a produkci aktivních látek byl zjišťován sérií 3 x opakovaných pokusů, při nichž byl testovaný kmen pěstován při optimálních teplotních a světelných podmínkách zvolených z výsledků experimentů výše (30°C a 90 Wm⁻²), v médiích s odlišnými koncentracemi dusíku ve formě KNO₃ nebo fosforu ve formě K₂HPO₄. Koncentrační řada KNO₃ v médiu byla

zvolena následovně: 0,000; 0,125; 0,250; **0,500**; 0,750; 1,000; 1,500; 2,000 a 5,000 g/l, řada fosfátů (K_2HPO_4) vypadala takto: 0,000; 0,022; 0,044; **0,087**; 0,174; 0,348; 0,688 a 0,870 g/l. Koncentrace předepsané pro médium Allen&Arnon jsou vyznačeny tučně. Sinice byly pěstovány v kultivačních válečcích o objemu 400 ml – viz výše, po dobu 7 dnů. Poté byla centrifugací separována biomasa, byla lyofilizována a zvážena. Poté byly provedeny extrakce biomasy i média (kap. 4.3. a 4.4.) a stanovení zbytkového dusíku a fosforu (kap. 4.2.). Stanovení toxinů v extraktech probíhalo pomocí HPLC/MS.

4.7. Produkce aktivních látek v průběhu růstu kmene

Kultivace sinice *Nostoc* Luk. 5/96 v tomto pokusu probíhala ve dvouplášťovém válci o vnitřním objemu 8 L. Teplota kultivace a intenzita osvětlení byly nastaveny na základě výsledků z předešlých pokusů na 30°C a 90 Wm⁻². Promíchávání média a biomasy kultivovaného kmene a také jeho obohacování CO₂ bylo realizováno probubláváním vzduchem obohaceným na 2% CO₂ skleněnou tyčinkou s vývodem situovaným u dna kultivační nádoby. Tyčinka byla na konci osazena pipetovací špičkou z PVC, což umožnilo tok bublin zcela vespod tak, aby nedocházelo k usazování biomasy na dně kultivační nádoby. Do 7 L Allen&Arnon média byl přidán 1 L hustého inokula předkultivovaného ve skleněných válečcích (Kapitola 4.1.). Ve 24 hodinových intervalech bylo odebíráno 200 ml suspenze. Ta byla následně centrifugována (15 min, 5 000 ot./min). Biomasa byla vysušena lyofilizací, extrahována methanolem (Kapitola 4.3.) a extrakt byl analyzován pomocí HPLC/MS. Médium bylo analyzováno na obsah dusičnanů, po jejichž vyčerpání byla kultivace ukončena. Z odebraného média byly dále extrahovány aktivní látky pomocí SPE kolonky (Kapitola 4.4.), které byly také analyzovány na HPLC/MS na obsah aktivních látek. Kultivace byla za stejných podmínek provedena 3x.

4.8. TLC frakcionace

Protože nejprve nebylo jasné, o jaké látky se jedná a jednou z verzí bylo, že se jedná o peptidy, přistoupili jsme také k použití tenkovrstevné chromatografie. Použita byla metodika dle práce El-Thaler a Bailey, 1994. Mobilní fázi byla směs n-butanol - kyselina octová - voda (poměr 4:1:1). Na TLC desku s fluorescenční značkou (průměrná velikost

silikagelových částic 2-25 μm , výška 20 cm, SIGMA Aldrich) byly zhruba 1 cm pod okraj zakoncentrovací linie opakovaným kapáním mikropipetovou špičkou nanoseny vzorky v podobě co nejmenších bodů. Rozpouštědlo bylo dokonale vysušeno fénem a deska byla vložena na 3 hodiny do dobře nasycené TLC komory naplněné mobilní fází. Poté byla vysušena fénem a pod UV zářivkou ($\lambda=254$ nm) byly vizualizovány separované látky v podobě proužků. Tyto byly označeny tužkou. Pro vizualizaci cyklických peptidů bylo použito barvení v roztoku 20% (V/V) roztoku kyseliny trichloroctové (TCA) na 10 min, a následně na 5 min v 0,3% (V/V) barviva Serva Blue W. Tato barva se selektivně váže na cyklické peptidy, které se po obarvení jeví jako tmavě modré skvrny. Označená místa obsahující separované látky byla seškrábána i se silikagelem do zkumavek, extrahována 2ml 70% methanolu a zcentrifugována (4500 rpm, 10 min). Extrakce byla opakována dvakrát. Supernatant byl odpařen a zakoncentrován do objemu (0,5ml). Takto vzniklá frakce byla podrobena analýze HPLC/MS.

4.9. Izolace aktivních látek ze sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 pro strukturní analýzy

Lyofilizovaná biomasa sinice *Nostoc* sp. str. Lukešová 5/96 byla postupně extrahována postupem uvedeným v kapitole 4.3. Methanолоvé extrakty byly přidávány stále do stejné srdcové baňky a průběžně odpařovány při 40°C a 40 mBar. Stejně bylo pokračováno, až bylo celkem vyextrahováno 60 g biomasy sinice. Extrakty byly hromadně zahuštěny na odparek. Ten byl následně zalit 10 ml hexanu, do nějž přešly nepolární nečistoty – pro kontrolu byl hexan odpařen a k odparku byl přidán 70% methanol, který byl podroben HPLC/MS analýze. Obsahoval pouze stopy aktivních látek, proto již nebyl dále uchováván. Tento postup byl opakován 3 krát. Takto přečištěný extrakt byl rozpuštěn v 30 ml 70% methanolu, po 10 násobném zředění analyzován HPLC/MS. Zbytek byl separován pomocí preparativní HPLC s UV detekcí na přístroji LabAlliance (Watrex Praha) s UV detektorem: KNAUER variable wavelength monitor, $\lambda=220\text{nm}$. Frakcionace pokračovala, až bylo rozseparováno celé množství extraktu získaného izolací z 60g biomasy *Nostoc* Luk. 5/96. Jednotlivé získané frakce byly zahuštěny na odparek při 40°C a 25 mBar, rozpuštěny ve 5ml 70% methanolu a tyto roztoky byly uchovávány jako zásobní.

Chomatografie probíhala za následujících podmínek:

Kolona: Reprosil 100 C₁₈, 250x8 mm, 5 μm

Teplota: 30°C

Detekce: 280 nm

Objem nástřiku vzorku: 500 μl

Průtok: 3 ml/min

Software: LabAlliance Gradient Control 1.6.0.22, CSW32 1.4.10.66

Čas (min)	0	5	6	10	11	15	16	20	21	25	26	30	35
Methanol (%)	50	50	60	60	70	70	80	80	90	90	100	100	50
Voda (%)	50	50	40	40	30	30	20	20	10	10	0	0	50

Tab. 3. Program gradientu preparativní chromatografie

Frakce obsahující sledované toxiny byly jímány jako odpovídající píky v chromatogramu detekované v UV při 280 nm. Frakce získané z jednotlivých nástřiků roztoku jednotlivých spojených frakcí byly zahuštěny při 40°C a 40 mBar na odparek. Tyto odparky byl rozpuštěny v 70% (V/V) methanolu ve vodě a roztok byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie.

4.10. Stanovení inhibiční aktivity extraktů

Ke stanovení míry toxicity extraktů bylo nejprve použito surových extraktů biomasy připravených, jak bylo uvedeno výše (kap. 4.3.). Po identifikaci aktivního kmene byl aktivní extrakt podroben frakcionaci (kap 4.8.) v závislosti na iontech nalézaných při MS analýzách extraktu. Stejným postupem jako surové extrakty byly poté testovány jednotlivé frakce. Toxické působení bylo testováno vůči vybraným kmenům houbových patogenů, žábřonožkám (*Artemia salina*) a 3 savčím buněčným liniím.

4.10.1. Stanovení inhibiční aktivity extraktů biomas a médií sinic rodu *Nostoc* Lukešová 5/96 proti houbovým patogenům

Extrakty připravené postupem uvedeným výše (kap. 4.2 a 4.3.) byly testovány na jejich aktivitu proti 5 kmenům houbových patogenů (konkrétně: *Alternaria alternata*,

Dendryphion penicilliatum, *Phoma pinodella*, *Botrytis cinerea* a *Sclerotinia sclerotiorum*). U vybraných extraktů bylo testování rozšířeno na celkem 14 kmenů houbových patogenů: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Claviceps purpurea*, *Colleotrichum gleosporioides*, *Dendryphion penicilliatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mycosphaerella pinoides*, *Phoma pinodella*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma harzianum* a *Trichothecium roseum*. Doby kultivace jednotlivých kmenů hub, po níž byly vystaveny účinkům extraktů a jejich frakcí byly 7, 14 a v několika případech 21 dní (viz tab. 5.4.1.). Pro testování fungicidní aktivity bylo použito následující schéma pokusu. 0,5 ml extraktu bylo nanášeno na povrch agarové plotny (živná půda Czapek – Dox (Himedia, India)). Na okraj misky byly naočkovány testované houby (ve vzdálenosti 40 – 45 mm od aplikované kapky extraktu). V 24 hodinových intervalech byla měřena velikost inhibiční zóny, což byla vzdálenost mezi okrajem kolonie houby a okrajem kapky extraktu. Tato měření sloužila ke stanovení denních přírůstků kolonií hub v mm². Jako kontrola bylo použito stejného množství rozpouštědla. Každý pokus byl třikrát zopakován.

Dále byly zjišťovány případné praktické aplikace extraktu sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 a to:

1) moření osiva máku a lnu silně infikovaného sporami hub *Dendryphion* a *Alternaria*. Výsev 100 semen byl proveden na zvlhčený filtrační papír (na 1 Petriho misku 3 kruhové výseče filtr. papíru na sebe, 5 ml vody). Bylo provedeno trojnásobné opakování. Každý den bylo přiléváno 5 ml destilované vody, která byla sedmý den obohacena o hydroponické médium Hydroponex (výrobce Zahradní centrum, ČR) v ředění, jaké je doporučováno výrobcem. Hodnocení proběhlo po 7 denní expozici. Byla měřena klíčivost, tedy kolik procent semen vyklíčilo, dále délka jejich kořenového klíčku a hypokotylu v mm, míra zaplísnění v relativní škále 1-5 dle procent zaplísněné plochy zpočítané po přiložení čtverečkové matrice, stanovován byl také počet druhů hub a procento odumřelých klíčenců. Po ukončení 7 denního cyklu byli klíčenci ponecháni ještě týden na zvlhčeném papíru.

2) Do hydroponického média Hydroponex (výrobce Zahradní centrum, ČR) připraveného dle pokynů výrobce byl aplikován extrakt sinice *Nostoc* Luk. 5/96. V médiu

byly pěstovány stonkové řízky rostliny *Chlorophytum*. Bylo zvoleno takové dávkování, aby přidávaný methanol nikdy nepřesáhl 1% objemu hydroponického média. Jako kontrola bylo použito stejného objemu 70% methanolu. Do 100 ml média pěti rostlin byl přidáván 1 ml surového extraktu sinice *Nostoc* Luk. 5/96 (kap. 4.3.) každý den, do dalších pěti 1x obden a do kontrolních médií byl přidáván každý den 1 ml 70% metanolu jako kontrola. Po 14 denní expozici byly metanolové extrakty rozdrcených listů (2 g listů + 5 ml 70% MetOH, 2x po hodině, odpařeno, resuspendováno do 1 ml 70% metanolu) analyzovány pomocí HPLC/MS na přítomnost piků reprezentujících fungicidní látky. Tento pokus měl ověřit, zda se jedná o fungicid systemický, či kontaktní.

4.10.2. Stanovení inhibiční aktivity extraktů biomasy a média sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 proti žábřonožkám (*Artemia salina*)

Test se žábřonožkami byl prováděn dle postupu uvedeného v článku Lincoln R et al., 1996. Cysty žábřonožek byly inkubovány v umělé mořské vodě, osvětleny umělým světlem (30 W.m²) a jemně probublávány vzduchem po 24 h (Metcalf et al., 2002). Pro testy toxicity byly použity vylíhlé nauplie naředěné na koncentraci 15-20 jedinců/mL⁻¹. 100 µL extraktu bylo napipetováno do 12-ti jamkové mikrotitrační destičky a vysušeno v laminárním boxu od rozpouštědla. Poté bylo přidáno 50 µL destilované vody a sonifikováno pro lepší rozpuštění suchého extraktu. Do jamek bylo přidáno 0.95 mL nauplií (15-20 jedinců) a pod stereomikroskopem bylo spočítáno množství živých a mrtvých jedinců a nevylíhlých cyst. Po 24 a 48 hodinách bylo počítání provedeno opakovaně a v procentech byla vyjádřena míra mortality.

4.10.3. Stanovení inhibiční aktivity extraktů biomasy a média sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 proti buněčným liniím

Pro testování cytotoxicity byly použity lidské buněčné linie HeLa a buňky myšího lymphoblastomu YAC-1 a Sp/2 (laskavě poskytnuty Dr. Janem Kopeckým, Parasitologický Institut, AVČR). Buňky byly kultivovány při 37°C v médiu RPMI 1640 s přídavkem 5% telecího fetálního séra, 1% glutaminu a 1% antibioticko-antimycotického roztoku v plastových láhvích na kultivace tkáňových kultur. Před experimenty byly buňky nabarveny trypanovou modří pro zhodnocení viability a zpočítány v Bürkerově

komoře propojené se světelným mikroskopem. Pro experiment byly použity pouze kultury s větší viabilitou, než 90%. Suspenze buněk byla centrifugována (1000 rpm, 10 min, 4°C) a následně bylo přidáno adekvátní množství čerstvého RPMI media pro získání koncentrace 1.5×10^5 buněk na jamku (200 μ L RPMI). 10 μ L extraktu biomasy (médiu, nebo frakcí) sinice *Nostoc* Luk. 95/6 bylo přidáno vždy do 3 jamek a do 3 jamek bylo napipetováno stejné množství 70% methanolu jako kontroly. Destičky byly ponechány v inkubátoru při 37°C dokud se methanol nevypařil. Poté byla přidána suspenze buněk a destičky byly inkubovány při 37°C a 3,5% CO₂ po 12 h. Po expozici byla zpočítána viabilita buněk pomocí MTT testu (Mosmann, 1983). Do jamek bylo přidáno 10 μ L roztoku MTT (4 mg/mL) a buňky byly inkubovány po další 4 h. Po inkubaci byly destičky centrifugovány 10 min při 3000 rpm a supernatant byl odstraněn. Dále bylo přidáno 200 μ L DMSO pro rozpuštění formazanových krystalů. Destičky byly proměřeny při 590 and 640 nm. Přežití buněk bylo hodnoceno jako podíl absorbancí jamek vystavených působení extraktů, ku absorbancím kontrolních jamek a vyjádřeno v procentech.

4.10.4. Vizualizace mechanismu toxického působení extraktů sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 na buněčné linii

Porušení buněčných struktur cytotoxiny ze sledované sinice bylo zviditelněno použitím imunofluorescenčního barvení. Vizualizovány byly změny aktinových vláken, buněčného jádra, fosforylace tyrosinu a endocytosy zprostředkované transferinem u lidských fibroblastů. Buňky byly kultivovány v D-MEM médiu obohaceném o 10% FCS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) v 6 jamkových destičkách (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Buňky byly vystaveny působení frakcí extraktu biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 v 70% metanolu v koncentraci 200 mg/ml. Jamky s čistým rozpouštědlem byly brány jako kontrola. Všechny pokusy byly dělány v trojím opakování. Testované buňky (37°C, 5% CO₂) byly zafixovány (3.7% paraformaldehydu v PBS, 20', RT), permeabilizovány (0,1% Triton X-100 v PBS), blokovány (1% BSA v PBS) a obarveny barvami Phalloidin-Alexa567 nebo Phalloidin-Alexa488 a protilátkou anti-pTyr-01 (Exbio, Praha, ČR). V druhé fázi bylo použito sekundární protilátky GAM-Alexa488. Endocytosa zprostředkovaná transferinem byla vizualizována fluorescencečně

značeným holotransferinem-Dyomics-564 (Exbio, Praha, ČR) ředěným na 5 mg/ml. Barvení jader bylo realizováno pomocí Mowiol-DAPI. Buňky byly zobrazeny a vyfoceny Cell^R mikroskopem (Olympus, Tokyo, Japan). Všechny fluorescenční barvy (s výjimkou holotransferinu) byly získány od Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

4.11. Strukturální analýzy předčištěných extraktů sinice *Nostoc* sp. str. Lukešová 5/96 vysokoučinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC/ESI/MS)

Frakce připravené z extraktů biomasy sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 a předčištěné postupem uvedeným v kap. 4.8. byly rozdělovány a analyzovány pomocí vysokoučinného kapalinového chromatografu v kontinuálním spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 1100 Series LC/MSD Trap.

Chromatografické podmínky byly následující:

- dávkování vzorku: 20 µl
- kolona: ZORBAX Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm)
- teplota kolony: 30 °C
- mobilní fáze:
 - A - methanol s přidavkem 0,1 % (V/V) kyseliny mravenčí
 - B - voda s přidavkem 0,1 % (V/V) kyseliny mravenčí
- průtok: 0,6 ml/min
- detekce: UV – 220 nm, 233 nm, 280 nm a 440 nm

Program gradientu:

Čas (min)	0,0	15,0	20	30	35
A (%)	50	50	100	100	50

Tab. 4. Program gradientu HPLC použitého pro dělení extraktů *Nostoc* Luk 5/96

Analýza HPLC probíhala po dobu 35 min. za použití gradientu methanol a voda (viz tab. 4) s přidavky 0,1% HCOOH pro zajištění lepší ionizace látek v ESI/MS. Za účelem zjištění aktivní složky extraktu byla provedena frakcionace s následným testem

cytotoxicity (viz kapitoly 4.8. a 4.10.1.). Frakce byly odpařeny a zakoncentrovány ve výchozím množství nástřiku v 70% methanolu z důvodu zajištění stejného efektu jako při aplikaci surového extraktu.

MS – podmínky měření:

Typ iontového zdroje: ESI

Sušící teplota: 325 °C

Polarita iontů: pozitivní

Sušící plyn: 10,0 l/min

Rozsah měření: 50 – 2200 m/z

Nebulizér: 50,0 psi

Napětí na kapiláře: 59,8 nA

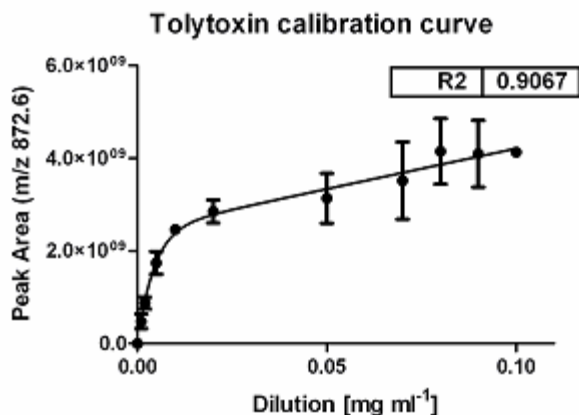
Dle potřeby byla analýza prováděna s alternujícími polaritami MS a se zaměřením iontové pasti na ionty o velikosti m/z 700, m/z 800 a m/z 900.

Nejsilnější toxin obsahovala frakce eluovaná v čase 27,1 min., proto frakcionace směřovala hlavně k purifikaci této látky. Kromě této látky s hmotou m/z 873 byly selektivně odchyťvány ještě frakce m/z 875 (eluovaná v čase 26,3) a frakce m/z 829 (eluovaná v čase 28,3). Obsah sledovaných látek ve vzorku byl stanovován z hodnot ploch příslušných píků v MS chromatogramech. Vzhledem k tomu, že vztah mezi plochou MS píku a koncentrací roztoku není lineární, bylo k přepočtům stanovovaných množství z MS analýz použito kalibrační funkce sestavené v programu *ChemStation for LC 3D* a *LC/MSD Trap Software 4.1.* na základě hodnot 3 krát opakovaných měření vzorků ředící řady. Stanovená funkce a její parametry viz obr. 3.

Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	17
R2	0.9067
Absolute Sum of Squares	4.703e+018
Sy.x	5.260e+008

$$\text{SpanFad}=(\text{Plateau}-Y0)*\text{PercentFad}*.01; \text{SpanSlow}=(\text{Plateau}-Y0)*(100-\text{PercentFad})*.01$$

$$Y=Y0+ \text{SpanFad}*(1-\exp(-K\text{Fad}*X)) + \text{SpanSlow}*(1-\exp(-K\text{Slow}*X))$$



Obr. 3. Přepočet plochy píku (m/z 873) na koncentraci toxinu v mg ml^{-1} .

Frakcionace probíhala jímáním eluentu během standardní analýzy do baněk dle UV a MS záznamu, přičemž pro dobrou separaci látek byl použit online UV záznam a retenční čas. S těmito frakcemi byly prováděny cílené fragmentace za účelem odhalení chemické struktury látek v nich přítomných. Ze zásobního roztoku bylo pipetováno 1 ml, naředěno 10 krát a umístěno přímo do automatického přímého dávkovače na přímou infuzi do hmotnostního spektrometru a podrobováno cíleným fragmentacím.

Určité množství purifikovaných látek bylo také odesláno na NMR pracoviště Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze, kde byly provedeny další analýzy.

5. VÝSLEDKY

5.1. Fungicidní aktivita extraktů sinic rodu *Nostoc*

Kultivací jednotlivých kmenů sinic (kap. 4.1.) byly získány biomasy, z nichž byly připraveny extrakty (kap. 4.3). Z 31 testovaných kmenů sinice *Nostoc* (Tab. 5) jen jediný vykazoval fungicidní působení a to *Nostoc* Luk. 5/96, proto bylo otestováno ještě dalších 32 kmenů sinic z dalších 6 rodů, kde ale nebyl objeven žádný s výraznějším fungicidním účinkem. Pouze u jednoho kmene *Cylindrospermum* C24 byl zaznamenán mírný

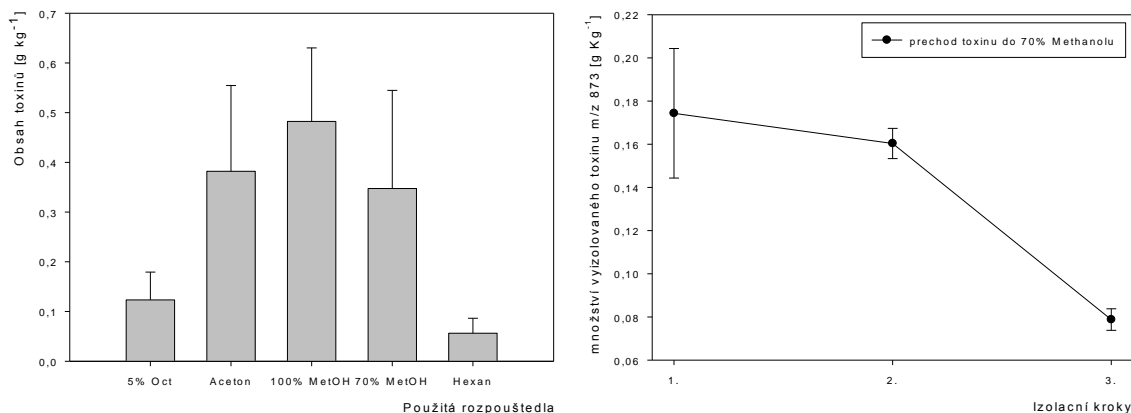
fungicidní účinek oproti kontrole (do 10%). V rámci testovaných kmenů sinic se tedy jedná o 1,5% kmenů s výraznými fungicidními účinky. Ukázalo se, že za aktivitu kmene *Cylindrospermum* C24 jsou zodpovědné puwainaphyciny F a G, jimiž se ve své disertační práci zabýval Mgr. Pavel Hrouzek PhD. U všech kmenů byly na fungicidní aktivitu testovány také extrakty kultivačních médií (kap. 4.6.2). Testování probíhalo metodikou popsanou v kapitole 4.10.1.

Vědecké jméno	Kmen	Místo izolace	Habitat	Fungicidní účinky
<i>Nostoc</i> sp.	BR IIIa	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-
<i>Nostoc</i> sp. a	RQII	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-
<i>Nostoc</i> sp. a	BRIB	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-
<i>Nostoc</i> sp.	BROMEL	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-
<i>Nostoc</i> sp.	LC17S01	Alberta/Canada	P	-
<i>Nostoc</i> sp.	OSNI 32S01	Sítinový pond/Czech Republic	P	-
<i>Cylindrospermum</i> sp.	Hrouzek 1/2004	Zliv/Czech Republic	P	-
<i>Calothrix</i> sp.	Hrouzek 2/2005	San Monoron-BUSRA/Cambodia	P	-
<i>Nostoc calcicola</i>	Lukešová 2/89d	Havana/Cuba	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 5/96d	Sokolov/Czech republic	S	+++
<i>Nostoc muscorum</i>	Lukešová 2/91d	Nezamyslice/Czech republic	S	-
<i>Cylindrospermum</i> sp.	C 24d	Ellesmere island/Canada	S	+
<i>Trichormus variabilis</i>	ISB 13	Dlouhá Ves/Czech Republic	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 7/99d	Germany	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 24/97d	Germany	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 116/96d	Sokolov/Czech republic	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 6/99d	Germany	S	-
<i>Nostoc</i> sp. c	Cam2S01	Camerun	S	-
<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Lukešová 51/91d	Nezamyslice/Czech republic	S	-
<i>Nostoc commune</i>	NC1	Třeboň/Czech republic	S	-
<i>Nostoc commune</i>	NC2	Třeboň/Czech republic	S	-
<i>Nostoc commune</i>	NC3	Nové Hrady/Czech republic	S	-
<i>Nostoc commune</i>	NC4	Nové Hrady/Czech republic	S	-
<i>Nostoc commune</i>	NC 7	České Budějovice/Czech republic	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	NC 9	Rožnov p. R.Czech republic	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	OBU36S07c	The Burren Clare/Ireland	S	-
<i>Nostoc</i> sp.	CC2c	greenhouse Pisa/Italy	Sy	-
<i>Nostoc</i> sp.	CR4c	greenhouse Florence/Italy	Sy	-
<i>Nostoc</i> sp.	De1c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-
<i>Nostoc</i> sp.	OGU 36S01c	Achill Island/Ireland	Sy	-
<i>Nostoc</i> sp.	Gm1c	greenhouse Siena/Italy	Sy	-
<i>Nostoc</i> sp.	Ds1c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-
<i>Nostoc</i> sp.	Mm1c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-
<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	04 06b	Březová/Czech republic	PI	-
<i>Anabaena mendotae x sigmoidea</i>	04 12b	Černíš/Czech republic	PI	-
<i>A. compacta</i>	04 17b	Dubnenský/Czech republic	PI	-
<i>A. cf. curva</i>	04 19b	Hejtman /Czech republic	PI	-
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 22b	Husinec/Czech republic	PI	-
<i>A. lemmermannii</i>	04 24b	Husinec/Czech republic	PI	-
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 26b	Jesenice/Czech republic	PI	-
<i>A. cf. circinalis</i>	04 28b	Hodějovický/Czech republic	PI	-
<i>A. lemmermannii</i>	04 33b	Orlík/Czech republic	PI	-
<i>A. lemmermannii</i>	04 38b	Senecký/Czech republic	PI	-
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 40ab	Skalka/Czech republic	PI	-
<i>A. lemmermannii</i>	04 42b	Svět/Czech republic	PI	-
<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>	04 43b	Svět/Czech republic	PI	-
<i>Anabaena affinis</i>	04 44b	Svět/Czech republic	PI	-
<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	04 45b	Svět/Czech republic	PI	-

<i>A. cf. spiroides</i>	04 51b	Svět/Czech republic	PI	-
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 52ab	Svět/Czech republic	PI	-
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 53b	Švarcenberk/Czech republic	PI	-
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 56b	Vajgar/Czech republic	PI	-
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 57b	Vajgar/Czech republic	PI	-
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 59b	Valcha/Czech republic	PI	-
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i> Anaps	Plást 05b	Plástovice/Czech republic	PI	-
<i>A. compacta</i> Acom	Pěšák 06b	Pěšák/Czech republic	PI	-
<i>A. compacta</i> Acom	Svět 06b	Svět/Czech republic	PI	-
<i>A. lemmermannii</i> - morfotypS	Alem Lipno 05 silnáb	Lipno/Czech republic	PI	-
<i>A. lemmermannii</i> - morfotypT	Alem Lipno 05 tenkáb	Lipno/Czech republic	PI	-
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i> Anaps-	Ole 03b	Oleksovice/Czech republic	PI	-
<i>A. eucompacta x reniformis</i>	Anarenif Pěšák 2b	Pěšák/Czech republic	PI	-
<i>A. eucompacta x reniformis</i>	Anarenif Pěšák 4b	Pěšák/Czech republic	PI	-
<i>Anabaena affinis</i>	Staňk 05-11b	Staňkovský/Czech republic	PI	-
<i>Nostoc</i> sp.	BR IIIa	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-
<i>Nostoc</i> sp.	RQIIa	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-

Tab. 5. Testované kmeny sinic s uvedením konkrétního kmene, místa jeho izolace, habitatu (E (epiphytický), P (periphytický), S (půdní), Sy (symbiotický) and PI (planktoni) a fungicidní aktivita jednotlivých extraktů biomas (- žádná aktivita, + aktivita do 10% oproti kontrole, ++ aktivita 10-50% oproti kontrole, +++ aktivita nad 50% oproti kontrole).

5.2. Optimalizace extrakční metody



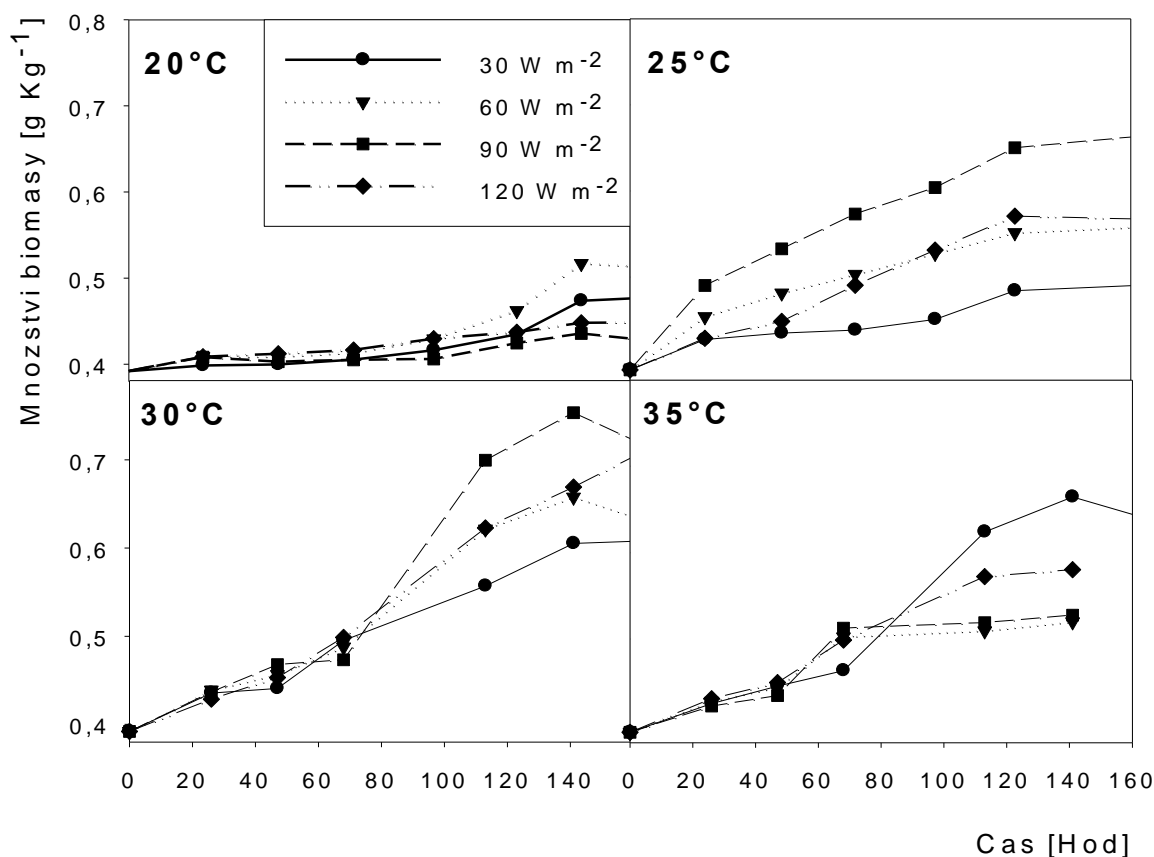
Obr. 4. Extrakce toxinu *m/z* 873 do jednotlivých rozpouštědel – vlevo. Výsledek je součtem extrahovaného množství toxinu po trojstupňové extrakci – vpravo

Dle postupu uvedeného v kap. 4.3. byly připraveny extrakty 200 mg biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 5ti různými rozpouštědly (kap. 4.5.). Graf (obr. 4) ukazuje vhodnost jednotlivých rozpouštědel pro izolaci aktivních látek z biomasy této sinice. Čtvrtý extrakční krok obsahoval maximálně 3% zkoumaných látek. Jinak se procentuelní přechod látek v jednotlivých izolačních krocích do jednotlivých rozpouštědel značně lišil.

Výtěžky jsou vyneseny v grafu 4. V prvním izolačním kroku bylo 70% methanolem (V/V) získáno průměrně 43,7%, ve druhém 37,5% a ve třetím kroku bylo získáno 15,4% aktivních látek – reprezentováno toxinem s hmotou m/z 873. U dalších sledovaných toxinů byl pozorován obdobný průběh. Pro další analýzy byl zvolen 70% methanol (V/V) a kvůli omezení časové náročnosti byly prováděny pouze dvoukrokové extrakce. Do 100% methanolu přecházelo v prvním izolačním kroku o 20% více této aktivní látky, než v prvním kroku izolace 70% methanolem (V/V), ale v součtu po dvou izolačních krocích do 70% methanolu (V/V) ve vodě přešlo o 19,5% více látky m/z 873 než do 100% methanolu. Dalším vhodným rozpouštědlem pro izolaci aktivních látek se ukazoval být aceton, do nějž ale přecházelo velké množství pigmentů a dalších balastních látek a bylo by tedy nutné používat více purifikačních kroků, než při použití methanolu. Vzhledem k těmto výsledkům je patrné, že toxiny produkované sinicí *Nostoc* Luk. 5/96 jsou mírně nepolární, za což je zodpovědná jejich chemická struktura (viz kap. 1.3.1. a 5.6.) zejména velmi velký makrolidický kruh. Rozpustnost v methanolu je umocněna také značným množstvím hydroxyskupin v molekule scytophycinů.

5.3. Závislost specifické růstové rychlosti a produkce aktivních látek na kultivačních podmínkách

Kultivace a stanovení specifických růstových rychlostí sinice *Nostoc* sp. Luk. 5/96 byly provedeny při teplotách 20, 25, 30 a 35 °C a intenzitách osvětlení 30, 60, 90 a 120 W.m⁻². Optimální teplotní a světelné podmínky pro růst biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 byly 30°C a 90 W.m⁻² (Obr. 5). Růstové rychlosti při kombinaci těchto podmínek dosahovaly maxima ze všech testovaných variant (Tab. 6) a také produkce biomasy na jednotku objemu byla maximální (Obr. 5). Maximální specifické růstové rychlosti μ_{Max} bylo dosaženo při 90 W.m⁻², vyšší intenzita osvětlení (120 W.m⁻²) vedla k poklesu specifické růstové rychlosti. Pro danou intenzitu osvětlení bylo nejvyšší specifické růstové rychlosti dosaženo při 30°C, nejnižší pak při 20°C. Specifické růstové rychlosti sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 pro jednotlivé kombinace kultivačních teplot a intenzit osvětlení jsou uvedeny v Tabulce 6.

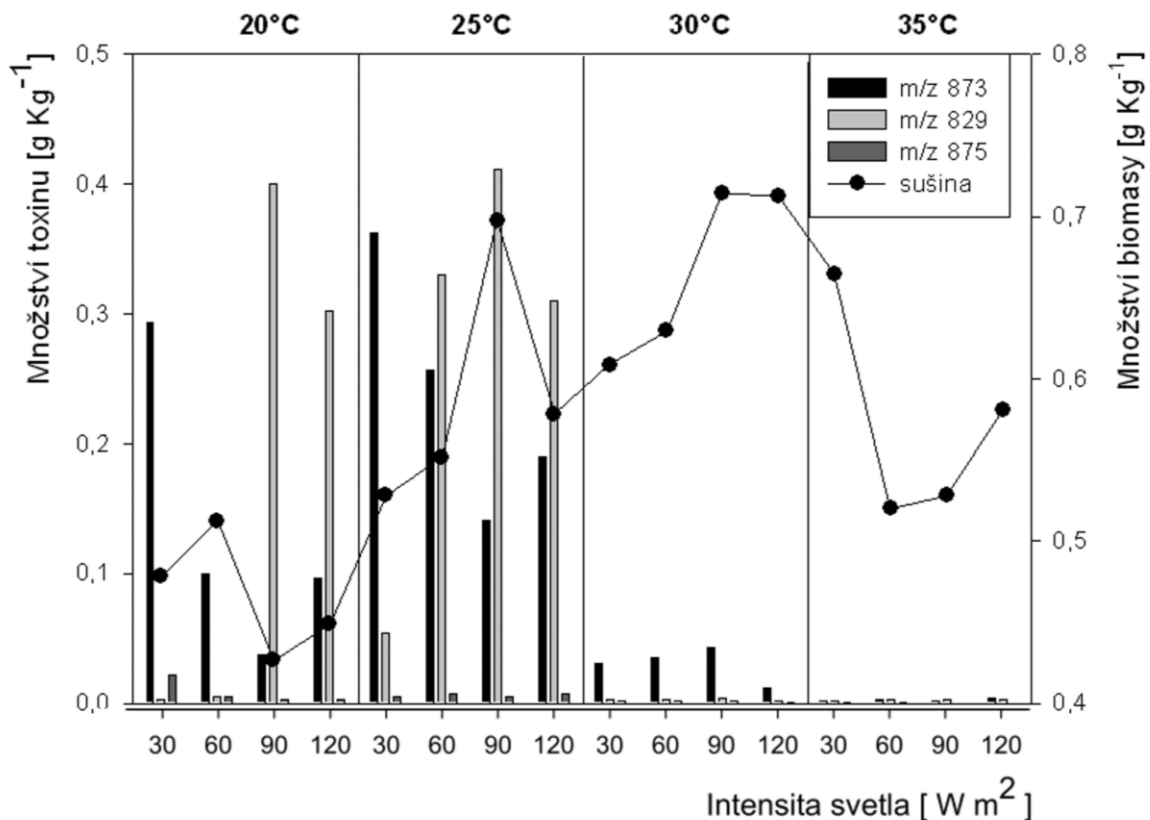


Obr. 5. Produkce biomasy (růstové křivky) sinice *Nostoc* Luk. 5/96 při čtyřech teplotách a čtyřech hodnotách ozáření.

Intensita světla					
°C \ W m ⁻²		30	60	90	120
Teplota	20	0,41944	0,545746	0,125706	0,120145
	25	0,279604	0,17646	0,289355	0,279492
	30	0,559706	1,156152	1,859982	1,057965
	35	0,18853	0,591045	0,788189	0,494899

Tab. 6. Vliv teploty a intenzity světla na specifickou růstovou rychlost kultury sinice *Nostoc* Luk. 5/96. Odstínem šedé je značena nejvyšší a nejnižší růstová rychlost. Odchylka mezi jednotlivými opakováními byla do 10%.

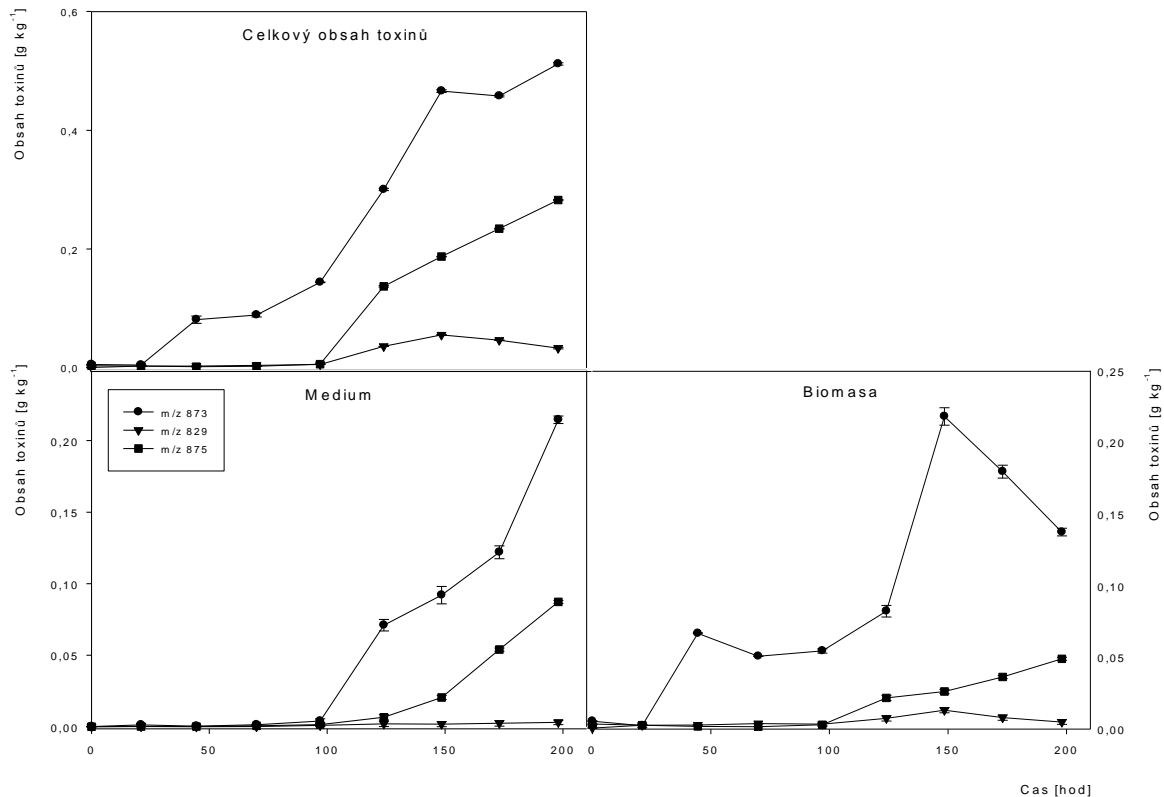
Růstové křivky jsou uvedeny na Obr. 5 a je nich je patrné, že délka lag fáze závisela na kultivačních podmínkách. Maximálního množství biomasy na litr bylo dosaženo průměrně po 5,8 dne. Maximální přírůstky biomasy byly pozorovány během čtvrtého dne. Produkce aktivních metabolitů kopírovala průběh vegetativního růstu. Největší produkce majoritního metabolitu (m/z 873) byla dosažena 6 kultivační den na konci exponenciální fáze růstu (Obr. 6). Kromě tohoto toxinu jsou v tomto grafu vyneseny ještě hodnoty pro další dva toxické metabolity (m/z 829 a m/z 875). Jejich výskyt byl posunut průměrně o tři dny oproti látce m/z 873. Vylučování látky m/z 873 do média začalo s tří nebo čtyř denním zpožděním po začátku jejich detekovatelnosti v biomase (obr. 7). Nástup detekce dalších sledovaných látek (m/z 829 a m/z 875) v médiu začal také se zpožděním, což naznačuje, že by tyto toxiny mohly být součástí jedné metabolické dráhy. Zisk lyofilizované biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 byl průměrně 0,6 g/l. Největší míra produkce biomasy byla při 30°C a 90 W.m⁻², ale pro produkci toxinů tato teplota nebyla optimální (Obr. 6). Z obr. 6 je patrné, že nejlepšími podmínkami pro produkci toxinů je 25°C. Při těchto podmínkách byla při všech testovaných hodnotách ozáření produkce toxinů maximální.



Obr. 6. Produkce toxinů v závislosti na kultivační teplotě a ozáření. Čárový graf (osa y vlevo) znázorňuje maximální nárůst biomasy při daných podmínkách.

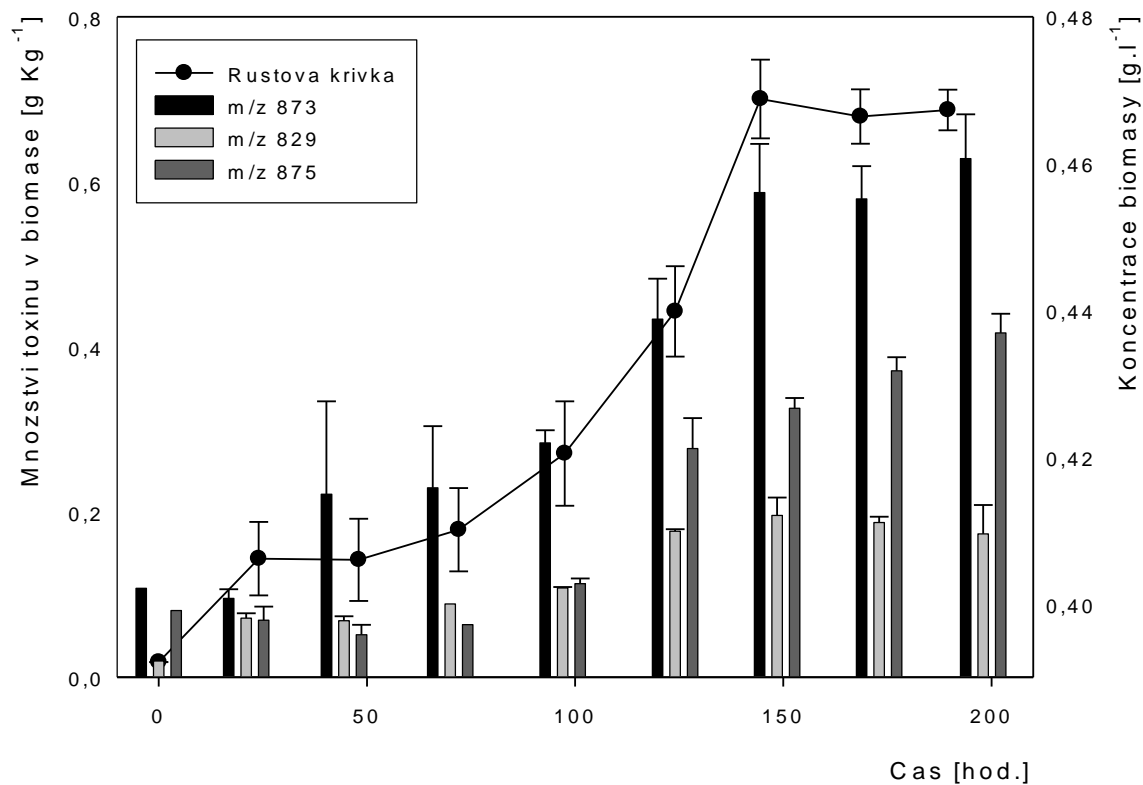
Při vysoké teplotě ($35^{\circ}C$) biomasa neobsahovala téměř žádné toxiny, ale jejich výskyt v médiu stoupl, což souvisí se zvýšeným rozpadem buněk. Toxiny m/z 829 a m/z 875 byly, stejně jako toxin m/z 873, produkovány spíše při nižších teplotách, ale při vyšších ozářenítech, než toxin m/z 873. Toxin s nejvyšší fungicidní účinností (m/z 873) byl syntetizován nejvíce při nízkém světle ($30 W m^{-2}$) a toxiny m/z 829 a m/z 875 byly detekovány nejvíce při $90 W m^{-2}$. Změna kultivační teploty výrazně ovlivňovala produkci toxinů m/z 873, stejně tak i dalších sledovaných toxinů. Pro toxin m/z 873 byla při $20^{\circ}C$ a $25^{\circ}C$ až 35 krát vyšší než při $35^{\circ}C$. Co se týče dalších dvou toxinů, zde byl poměr ještě vyšší – až 40 krát při $25^{\circ}C$ oproti $35^{\circ}C$. Stanovené obsahy toxinů v kultivačním médiu vykazovaly opačný trend. Čím více bylo toxinů v biomase, tím méně jich bylo přítomno v kultivačních médiích. Nejvíce extrabuněčných toxinů bylo pozorováno při teplotě $30^{\circ}C$ a nízké ozáření ($30 W.m^{-2}$). Porovnání obsahu sledovaných toxinů v biomase v závislosti na kultivačních podmínkách je zpracováno v Grafu 6. Porovnáním stejných

vstupních množství biomasy a kultivačních médií použitých pro stanovení obsahu toxinů bylo zjištěno, že při 30°C je obsah látky s hmotou m/z 873 v biomase přibližně 700 krát vyšší než v kultivačním médiu, obsah toxinu m/z 875 je v biomase více než 1500 krát



Obr. 7: Množství toxinů produkovaných sinicí *Nostoc* sp. Lukešová 5/96 během růstu. Pěstováno při 30°C a 90 W.m⁻².

více než v médiu a obsah m/z 829 byl v biomase dokonce až více než 3500 krát větší než v kultivačním médiu, sledované toxiny jsou tedy vnitrobuněčné. Na základě výsledků vlivu kultivační teploty a intenzity osvětlení na specifickou růstovou rychlost a produkci bioaktivní látky byly pro sledování produkce toxinů o m/z 873, 829 a 875 v průběhu růstu sinice *Nostoc* Luk. 5/96 zvoleny parametry 30°C a 90 W.m⁻², kdy porovnání produkce toxinů a růstu biomasy vycházelo nejlépe. Obsah toxinů m/z 873, 829 a 875 ve vzorcích biomasy odebíraných ve 24 hodinových intervalech byl stanoven pomocí HPLC/MS podle postupu uvedeného v kap. 4.11 a vyneseno graficky společně s růstovou křivkou *Nostoc* Luk. 5/96 (Graf 8).



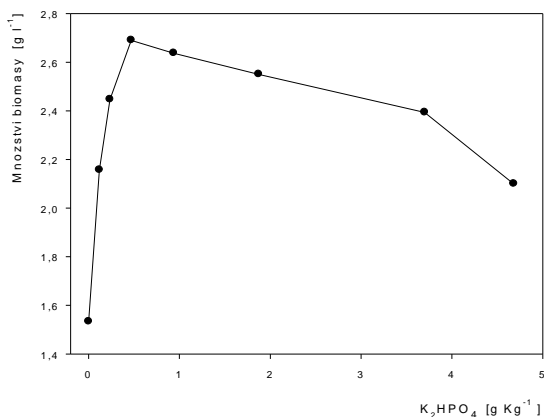
Obr. 8. Růstová křivka sinice *Nostoc Luk. 5/96* a produkce tří aktivních metabolitů během růstu. Průměr ze 3 kultivací. Pěstováno při 30°C a 90 W.m⁻². Kultivace byla ukončena po vyčerpání dusíku z kultivačního média.

V průběhu růstu docházelo ke zvyšování koncentrace toxinů v biomase a maximálního množství všech sledovaného toxinu *m/z* 873 bylo dosaženo na konci lineární fáze růstu resp. ve fázi stacionární. Nástup produkce toxinů *m/z* 829 a 875 byl pomalejší, než toxinu *m/z* 873.

5.3.1. Vliv dusíku a fosforu na produkci biomasy a vybraných toxinů sinicí *Nostoc Lukešová 5/96*

Vliv množství základních živin (dusíku a fosforu) v kultivačním médiu byl zjišťován sérií pokusů, při nichž byl testovaný kmen pěstován při optimálních teplotních a světelných podmínkách (30°C a 90 W.m⁻²). Koncentrační řada KNO₃ v médiu byla nastavena na: 0,000; 0,125; 0,250; **0,500**; 0,750; 1,000; 1,500; 2,000 a 5,000 g/l. Koncentrace fosfátů ve

formě K_2HPO_4 byla: 0,000; 0,022; 0,044; **0,087**; 0,174; 0,348; 0,688 a 0,870 g/l. Tučně jsou vyznačeny koncentrace předepsané pro Allen&Arnon médium. Sinice byly pěstovány v kultivačních válečcích o objemu 400 ml (kapitola 4.1.) po dobu 7 dnů. Po



Obr. 9: Vliv koncentrace fosforu (K_2HPO_4) v kultivačním médiu na produkci biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96.

zejména dvě s nejvyšší koncentrací (2,000 a 5,000 g KNO_3 /l) byly husté, temně zelené, ale sledovaných toxinů bylo na jednotku biomasy málo. Mezi jednotlivými opakováními pokusu byla velká variabilita ve výsledcích v koncentraci toxinů jak v kultivačním médiu, tak v biomase. Maxima pro toxin m/z 873 byla minima pro ostatní dva sledované toxiny, což opět naznačuje syntézu jednoho toxinu z druhého. Výskyt toxinů m/z 875 a m/z 829 spolu koreloval až na to, že toxin m/z 875 byl produkován výrazně při velmi nízkých koncentracích dusíku, stejně jako toxin m/z 873, zatímco toxin m/z 829 nebyl při těchto koncentracích syntetizován téměř vůbec. V pokusech se změnou koncentrací fosforu, nejvyšší výnosy biomasy byly pozorovány při koncentraci předepsané pro standardní Allen&Arnon médium. U dusíku bylo optimum pro produkci biomasy vyšší, než je v Allen&Arnon médiu. Stejně jako u dusíku, také u změněných koncentrací fosforu byla pozorována při produkci toxinů (m/z 873, 875 a 829) velká variabilita ve výsledcích a žádný výrazný trend, proto se dá říct, že ani dusík, ani fosfor nemá u sledovaného sinice signifikantní vliv na produkci sledovaných toxinů.

ukončení kultivace byla centrifugací separována biomasa, která byla následně lyofilizována a zvážena. Poté byly provedeny extrakce biomasy i média. Stanovení toxinů v extraktech probíhalo standardní metodou popsanou v kap. 4.11.

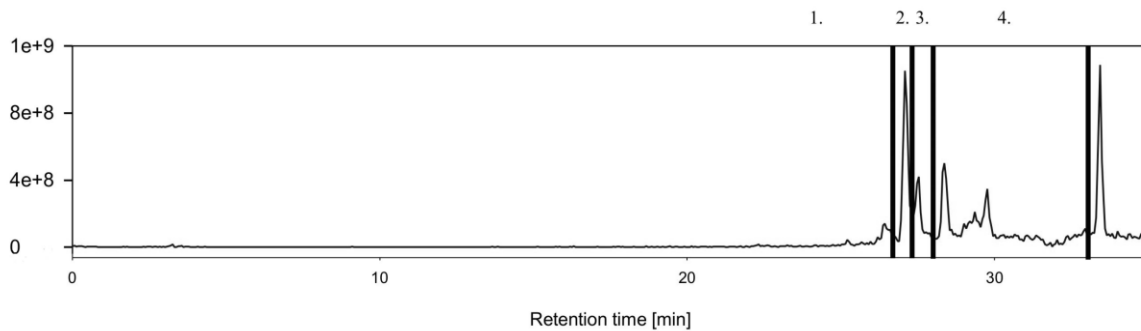
Kultury v médiu s obsahem dusíku nižším, než je v Allen&Arnon médiu (0,000; 0,125; 0,250 g KNO_3 /l)

neprosperovaly dobře, biomasa byla řídká a nažloutlá. Naopak kultury rostlé v médiu s vyšší koncentrací dusíku,

5.4. Biologická aktivita

5.4.1. Inhibiční aktivita surového extraktu sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 a jeho frakcí proti houbovým patogenům

Extrakt lyofilizované biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 připravený postupem uvedeným v kapitole 4.3. byly analyzovány HPLC/MS. Podle záznamů analýz, jejichž příklad je uveden na obrázku 10



Obr. 10. Typický chromatogram z HPLC/MS analýzy extraktu připraveného z biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 se zvýrazněním frakcionace.

byly zvoleny frakce, které byly jímány při opakované preparativní chromatografii extraktů pomocí HPLC (viz kap. 4.10.).

Frakcionací extraktu byly získány 4 frakce (frakce 1: čas 20,0 – 26,8 min.; frakce 2: čas 26,9 – 27,5 min.; frakce 3: čas 27,6 – 28,5 min.; frakce 4: čas 28,6 – 30,0 min. Viz obr. 10 a tab. 7). Inhibiční aktivitu vůči houbovým patogenům vykazovaly frakce 2 a 3 a to především 2. frakce, která podle HPLC chromatogramu (Obrázek 10) obsahovala pík s $R_t = 27,1$ min sodného aduktu $[M+Na]^+$ o m/z 873. Podstatně nižší inhibice růstu houbových patogenů byla zjištěna u 3. frakce obsahující dominantní pík m/z 829. 1. frakce obsahující dominantní pík m/z 875 nevykazovala žádné fungicidní působení. Inhibiční aktivity frakcí vůči houbovým patogenům a časové úseky analýzy, ve kterých byly jednotlivé frakce jímány, jsou uvedeny v Tabulce 7.

Číslo frakce, scytophyciny <i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Časový úsek analýzy (min)	Inhibice růstu všech testovaných hub (% kontroly)
Směsný vzorek	0,0 – 35,0	4,4 – 16,1
1. 861, 859, 875 , 845	20,0 – 26,8	75,8 – 127,1
2. 873	26,9 – 27,5	11,2 – 20,4
3. 843, 829	27,6 – 28,5	13,0 – 44,0
4. 857	28,6 – 30,0	100,0 – 126,9

Tab.7. Inhibice růstu všech testovaných houbových patogenů jednotlivými frakcemi a směsným (surovým) extraktem sinice *Nostoc* Luk. 5/96

Frakce obsahující jednotlivé toxiny připravené dle postupu popsáno výše byly aplikovány na Petriho misky s nasadou houbových patogenů. Koncentrace byla vždy ředěna podle originálního extraktu na 200 mg/ml. V první fázi byl testován vliv na 5 kmenů hub – viz tab. 7, 8 a 9. Testován byl také směsný surový extrakt. Frakce 1 obsahující dominantní pík *m/z* 875 nevykazovala žádnou fungicidní ani fungistatickou aktivitu, stejně jako frakce obsahující toxin s *m/z* 857. Pozornost byla tedy upřena na frakce obsahující dominantní píky *m/z* 873 a 829. Pro ukázkou trendů byl na základě údajů z literatury (Smith et al., 1993; Ishibashi et al., 1986) sledován ještě toxin *m/z* 875.

Výsledky testování jednotlivých frakcí oproti 5 kmenům houbových patogenů jsou sumarizovány v tabulce 8. Pokus byl založen 1.6. a měření probíhalo čtvrtý, sedmý a čtrnáctý den od založení pokusu. Největší fungicidní účinky vykazoval toxin *m/z* 873 s dobrou fungicidní aktivitou oproti všem testovaným houbám. Toxin *m/z* 829 vykazoval dobrou fungicidní aktivitu, ale jeho účinek byl krátkodobější. Toxin *m/z* 875 nevykazoval signifikantní fungicidní aktivitu. Nejlépe fungoval směsný vzorek, i když většinou byl za jeho aktivitu zodpovědný toxin *m/z* 873. Z tabulky 9 je zřejmé procentuální potlačení růstu, případně i slabý nárůst, houbových patogenů pod vlivem jednotlivých testovaných toxinů. V tabulce jsou zobrazeny i výsledky kontrolního měření.

	<i>Alternaria</i>			<i>Dendryphion</i>			<i>Phoma</i>			<i>Botrytis</i>			<i>Sclerotinia</i>		
	5.6.	8.6.	15.6.	5.6.	8.6.	15.6.	5.6.	8.6.	15.6.	5.6.	8.6.	15.6.	5.6.	8.6.	15.6.
Kontrola	8	0	-25	16	12	-15	28	10	-18	4	-20	X	-5	-45	X
Směs	26	21	18	30	28	22	29	21	14	28	25	20	29	20	8
Fr-ce 1.	14	8	-15	16	8	-18	27	13	-15	3	-35	X	-8	-45	X
Fr-ce 2.	23	18	13	30	23	16	29	21	14	30	24	12	28	16	4
Fr-ce 3.	19	15	7	30	21	13	28	12	0	25	15	X	25	6	-5
Fr-ce 4.	14	6	-15	16	5	-15	26	6	-18	0	-45	5	-7	-45	X

Tab.8. Naměřené hodnoty inhibičních zón (mm) ve dnech 5., 8. a 15.6. X = dosažení mezní hodnoty, dále neměřitelné, celá Petriho miska zarostlá kulturou. - - záporné hodnoty = přerostení středové aplikace preparátu (mm).

	<i>Alternaria</i>		<i>Dendryphion</i>		<i>Phoma</i>		<i>Botrytis</i>		<i>Sclerotinia</i>	
	mm ²	%KO	mm ²	%KO	mm ²	%KO	mm ²	%KO	mm ²	%KO
Kontrola	475	100,0	460	100,0	465	100,0	2400	100,0	1300	100,0
S	53	11,1	45	9,8	75	16,1	180	7,5	57	4,4
Fr-ce 1.	260	75,8	585	127,1	545	117,2	2850	118,7	1500	115,4
Fr-ce 2.	90	18,9	65	14,1	95	20,4	270	11,2	225	17,3
Fr-ce 3.	160	33,7	67	14,5	205	44,0	312	13,0	242	18,6
Fr-ce 4.	502	105,6	520	113	580	124,7	2400	100	1650	126,9

Tab.9. Průměrné denní přírůstky kolonií hub (mm²) a procentuální srovnání s kontrolou (%KO).

Následně bylo provedeno testování účinku extraktu proti širšímu spektru hub. Při konečném hodnocení, po 14 denní kultivaci, byly naměřeny hodnoty inhibičních zón, viz tab. 10. U vybraných kmenů hub byla kultivace prodloužena o dalších 7 dní a výsledky jsou uvedeny v tabulce Tab. 11.

	Kontrola		Směsný extrakt <i>Nostoc</i> Luk 5/96	
	Inh. zóna	Velikost kolonie (mm ²)	Inh. zóna	Velikost kolonie (mm ²)
<i>Alternaria alternata</i>	-17	5500	12	2100
<i>Aspergillus niger</i>	-45	8100	-45	8100
<i>Botrytis cinerea</i>	-14	5300	9	3000
<i>Claviceps purpurea</i>	-12	2500	7	1400
<i>Colleotrichum gleosporioides</i>	-16	5100	5	3200
<i>Dendryphion penicilliatum</i>	-2	2300	13	1200
<i>Fusarium oxysporum</i>	-20	5900	-5	4200
<i>Fusarium solani</i>	-11	3600	-2	3400
<i>Mycosphaerella pinoides</i>	2	2400	8	2200
<i>Phoma pinodella</i>	-10	4300	6	2500
<i>Rhizoctonia solani</i>	-45	8100	-45	8100
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-45	8100	-45	8100
<i>Trichoderma harzianum</i>	-45	8100	-45	8100
<i>Trichothecium roseum</i>	-45	8100	-45	8100

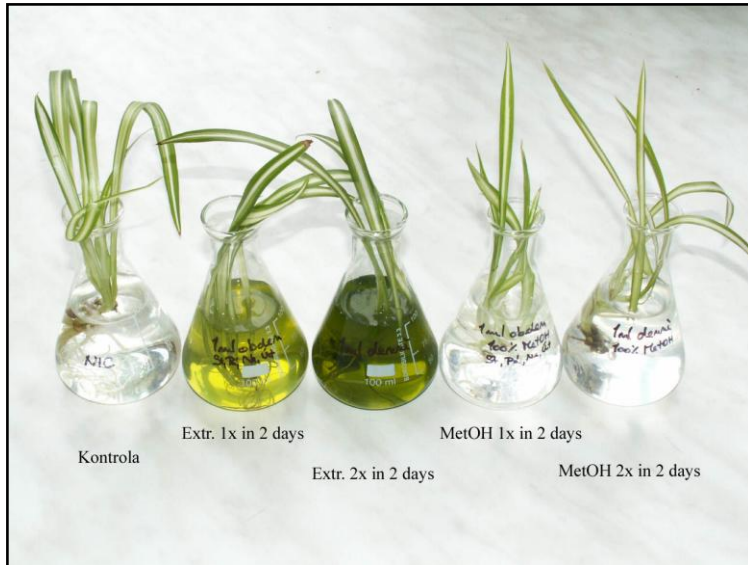
Tab.10. Testování směsného extraktu sinice *Nostoc* Luk. 5/96 na širší spektrum houbových patogenů.

Druh houby	26.4.		28.4.		2.5.	
	KO	Směs	KO	Směs	KO	Směs
<i>Alternaria alternata</i>	100	38,2	100	34,3	100	32,0
<i>Dendryphion penicilliatum</i>	100	52,1	100	29,7	100	33,3
<i>Colleotrichum gleosporioides</i>	100	62,7	100	67,9	100	55,5
<i>Phoma pinodella</i>	100	58,1	100	51,8	100	50,7
Průměr	100,0	52,8	100,0	46,0	100,0	42,9
Procentuální snížení velikosti kolonií ve srovnání s kontrolou		47,23		54,00		57,13

Tab.11. Časový průběh inhibičního účinku směsného extraktu *Nostoc* Luk. 5/96 oproti houbovým patogenům.

5.4.2. Aktivita surového extraktu sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 v rostlinném modelu

2 ml surového extraktu sinice *Nostoc* Luk. 5/96 bylo také aplikováno do 100 ml hydroponického média (Hydroponex), v němž byly pěstovány stonkové řízky rostliny *Chlorophytum* (obr. 11). Z rostlin byly postupně odebírány listy, jejichž biomasa byla extrahována 70% methanolem stejným způsobem jako biomasa sinice *Nostoc* Luk 5/96



Obr. 11. Růst stonkových řízků rostliny *Chlorophytum* v médiích s přidávkou extraktů sinice *Nostoc* Luk. 5/96

kontrole. Fungicidně působící toxiny sinice *Nostoc* Luk. 5/96 jsou systemické, nikoli pouze kontaktní.

Další pokus byl proveden s osivem máku (Tab. 12a) a lnu (Tab. 12b), které bylo silně infikováno sporami hub *Dendryphon* a *Alternaria*. Toto osivo bylo mořeno surovým extraktem získaným z biomasy *Nostoc* Luk. 5/96. Hodnocení proběhlo po 7 denní expozici. Výskyt hub sice klesl, ale ukázalo se, že extrakt výrazně inhibuje růst kořenového klíčku máku (*Papaver somniferum*), netvoří se sekundární kořeny, klíčenci následně přestávají růst, zhnědnou a zajdou. Je však omezeno zaplísnění oproti kontrole. Ukazuje se, že rostlinky lnu jsou odolnější proti negativnímu vlivu toxinů – nebylo pozorováno odumírání klíčenců, vzhledem ale ke špatné tvorbě kořenů ani tyto rostlinky neprosperují a hynou.

(kap. 4.3.) a tyto extrakty byly analyzovány pomocí HPLC/MS na obsah toxinů. Bylo zjištěno, že sledované toxiny prostupují z média do kořenů a jsou dále transportovány po rostlině. Přítomnost toxinů m/z 873, 829 a byla pomocí analýz HPLC/MS prokázána ve stonku i v listech testovaných rostlin. Růst nebyl inhibován a rostliny nevykazovaly známky poškození oproti

a) <i>Pap. somn.</i>	Klíčivost	Délka (mm)		Zaplísnění (1-5)	Počet druhů hub	% odumření klíčenců
		Koř. klíček	Hypokotyl			
Kontrola	89	25	33	3,9	12	95
Směs	100	9	10	1,5	3	5

b) <i>Lin. sat.</i>	Klíčivost	Délka (mm)		Zaplísnění (1-5)	Počet druhů hub	% odumření klíčenců
		Koř. klíček	Hypokotyl			
Kontrola	98	43	31	3,5	5	2
Směs	98	33	22	2,1	2	0

Tab. 12. Vliv surového extraktu *Nostoc* Luk 5/96 na růstové parametry a míru zaplísnění u rostlinného modelu a) Máku setého, b) Lnu setého.

5.4.3. Toxický efekt na buněčné linie a žábřonožky

Surový extrakt biomasy sinice *Nostoc* Luk. 5/96 vykazoval signifikantní cytotoxický efekt (hodnota inhibice $58 \pm 2,9$) na buněčné linie HeLa, YAC-1 (hodnota inhibice $59 \pm 4,7$) a murine lymphoblastoma SP/2 (hodnota inhibice $48 \pm 3,8$) viz tab. 13 (testováno MTT testem) v koncentraci 200 mg extraktu lyofilizované biomasy na ml. Extrakt kultivačního média nevykazoval žádné toxické působení na žádné z testovaných buněčných linií. Cytotoxický efekt tohoto extraktu na buněčné linie Sp2 a YAC-1 murine byl popsán v článku (Hrouzek et al. 2011), z něhož je i tabulka 13.

Vědecké jméno	Kmen	Místo izolace	Habitat	<i>A. salina</i>		SP/2 % mean
				B	M	
<i>Nostoc</i> sp.	BR IIIa	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	+	-	12*
<i>Nostoc</i> sp. a	RQII	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	-	7*
<i>Nostoc</i> sp. a	BRIIB	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	n.a.	0*
<i>Nostoc</i> sp.	BROMEL	a Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	-	0*
<i>Nostoc</i> sp.	LC17S01	Alberta/Canada	P	-	-	27
<i>Nostoc</i> sp.	OSNI 32S01	Sítinový pond/Czech Republic	P	-	n.a.	0*
<i>Cylindrospermum</i> sp.	Hrouzek 1/2004	Zliv/Czech Republic	P	+	n.a.	100
<i>Calothrix</i> sp.	Hrouzek 2/2005	San Monoron-BUSRA/Cambodia	P	-	-	30
<i>Nostoc calcicola</i>	Lukešová 2/89d	Havana/Cuba	S	-	-	6*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 5/96d	Sokolov/Czech republic	S	+	-	52*
<i>Nostoc muscorum</i>	Lukešová 2/91d	Nezamyslice/Czech republic	S	+	-	48*
<i>Cylindrospermum</i> sp.	C 24d	Ellesmere island/Canada	S	-	-	60

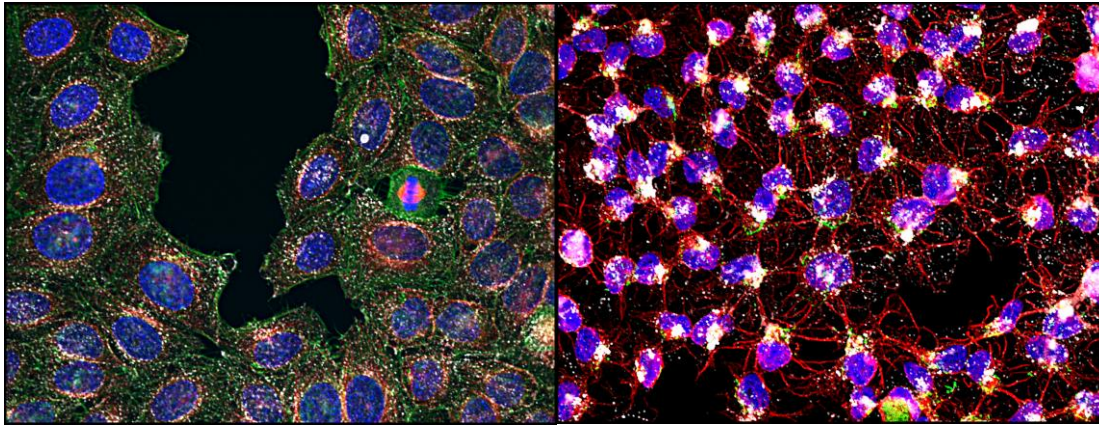
<i>Trichormus variabilis</i>	ISB 13	Dlouhá Ves/Czech Republic	S	-	-	62,3
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 7/99d	Germany	S	-	-	66*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 24/97d	Germany	S	-	-	0*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 116/96d	Sokolov/Czech republic	S	-	-	1*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 6/99d	Germany	S	-	+	54*
<i>Nostoc</i> sp. c	Cam2S01	Camerun	S	-	-	48*
<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Lukešová 51/91d	Nezamyslice/Czech republic	S	+	-	39*
<i>Nostoc commune</i>	NC1	Třeboň/Czech republic	S	-	-	70
<i>Nostoc commune</i>	NC2	Třeboň/Czech republic	S	-	-	12
<i>Nostoc commune</i>	NC3	Nové Hradky/Czech republic	S	-	+	0
<i>Nostoc commune</i>	NC4	Nové Hradky/Czech republic	S	-	-	40
<i>Nostoc commune</i>	NC 7	České Budějovice/Czech republic	S	+	n.a.	34
<i>Nostoc</i> sp.	NC 9	Rožnov p. R. Czech republic	S	-	n.a.	27
<i>Nostoc</i> sp.	OBU36S07c	The Burren Clare/Ireland	S	-	-	42*
<i>Nostoc</i> sp.	CC2c	greenhouse Pisa/Italy	Sy	-	-	30
<i>Nostoc</i> sp.	CR4c	greenhouse Florence/Italy	Sy	-	-	5*
<i>Nostoc</i> sp.	De1c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-	-	64*
<i>Nostoc</i> sp.	OGU 36S01c	Achill Island/Ireland	Sy	-	-	31*
<i>Nostoc</i> sp.	Gm1c	greenhouse Siena/Italy	Sy	-	+	14*
<i>Nostoc</i> sp.	Ds1c	greenhouse Rome/Italy	Sy	+	-	54
<i>Nostoc</i> sp.	Mm1c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-	-	0
<i>A. mendotae x sigmaidea</i>	04 06b	Březová/Czech republic	Pl	-	-	n.a.
<i>Anabaena mendotae x sigmaidea</i>	04 12b	Černiš/Czech republic	Pl	-	-	70
<i>A. compacta</i>	04 17b	Dubnenský/Czech republic	Pl	-	-	67
<i>A. cf. curva</i>	04 19b	Hejtman /Czech republic	Pl	-	-	n.a.
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 22b	Husinec/Czech republic	Pl	-	+	50
<i>A. lemmermannii</i>	04 24b	Husinec/Czech republic	Pl	-	-	13
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 26b	Jesenice/Czech republic	Pl	-	+	46
<i>A. cf. circinalis</i>	04 28b	Hodějovický/Czech republic	Pl	-	-	29
<i>A. lemmermannii</i>	04 33b	Orlík/Czech republic	Pl	-	-	n.a.
<i>A. lemmermannii</i>	04 38b	Senec/Czech republic	Pl	-	-	17
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 40ab	Skalka/Czech republic	Pl	-	+	n.a.
<i>A. lemmermannii</i>	04 42b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	57
<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>	04 43b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	92
<i>Anabaena affinis</i>	04 44b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	66
<i>A. mendotae x sigmaidea</i>	04 45b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	87
<i>A. cf. spiroides</i>	04 51b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	62
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 52ab	Svět/Czech republic	Pl	-	+	25
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 53b	Švarcenberk/Czech republic	Pl	-	+	53
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 56b	Vajgar/Czech republic	Pl	-	-	47
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 57b	Vajgar/Czech republic	Pl	-	+	76
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 59b	Valcha/Czech republic	Pl	-	+	82
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i> Anaps	Plást 05b	Plástovice/Czech republic	Pl	-	+	n.a.
<i>A. compacta</i> Acom	Pěšák 06b	Pěšák/Czech republic	Pl	-	+	43
<i>A. compacta</i> Acom	Svět 06b	Svět/Czech republic	Pl	-	-	2
<i>A. lemmermannii - morfotypS</i>	Alem Lipno 05 silnáb	Lipno/Czech republic	Pl	-	-	33
<i>A. lemmermannii - morfotypT</i>	Alem Lipno 05 tenkáb	Lipno/Czech republic	Pl	-	+	40
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i> Anaps-	Ole 03b	Oleksovice/Czech republic	Pl	+	+	92
<i>A. eucompacta x reniformis</i>	Anarenif Pěšák 2b	Pěšák/Czech republic	Pl	-	+	77
<i>A. eucompacta x reniformis</i>	Anarenif Pěšák 4b	Pěšák/Czech republic	Pl	-	+	90
<i>Anabaena affinis</i>	Staňk 05-11b	Staňkovský/Czech republic	Pl	-	+	37
<i>Nostoc</i> sp.	BR IIIa	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	+	-	12*
<i>Nostoc</i> sp.	RQIIa	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	-	7*

Tab. 13 Testované kmeny sinic s uvedením konkrétního kmene, místa jeho izolace, habitatu (E (epiphytický), P (periphytický), S (půdní), Sy (symbiotický) and Pl (planktoní), *A. salina* mortalita (B – biomasa, M – medium, + reprezentuje mortalitu $\geq 50\%$) a inhibice buněčné linie Sp/2

V kmeni *Nostoc* sp. 5/96 byla aktivita jak v testech mortality žábřonožek (*A. salina*), tak v testech na buněčných liniích způsobena frakcí 3 obsahující majoritní pík s molekulovou hmotností m/z 873. U testů se žábřonožkami se projevila 100% mortalita již do 12 hodin.

5.5. Vizualizace cytoskeletu

Ve snaze potvrdit, že mechanismus účinku studovaných látek je identický s těmi popisovanými u scytophycinů, bylo zkoumáno vnitřní uspořádání buněk po jejich vystavení působení toxinů produkovaných sinicí *Nostoc* Luk. 5/96. Použito bylo epifluorescenční mikroskopie (Zhang et al., 1997) pro zobrazení morfologie buněk lidských fibroblastů. Buňky byly barveny (kap. 4.10.4.) barvami zviditelňující F-aktinová vlákna, jádra a endocytosu zprostředkovanou transferinem (viz obr 12.) a inkubovány spolu se surovým extraktem sinice *Nostoc* Luk. 5/96 a jeho frakcemi v koncentraci 200 mg/ml. První změny na cytoskeletu byly pozorovány po 5 minutách u surového extraktu a u frakce 3 obsahující majoritní iont s m/z 873. Aktinová kostra začala mizet a objevovaly se světlejší skvrny, které se roztahovaly a tvořila se celá bílá místa. Po delší inkubaci (30 min a déle) polymerizovaná aktinová vlákna téměř vymizela (viz obr 12 vpravo). Na další obarvené buněčné struktury (jádro a transferin) neměly toxiny z extraktu sinice *Nostoc* Luk. 5/96 žádný pozorovatelný vliv. Látky produkované sinicí *Nostoc* Luk. 5/96 mají výrazný degradační vliv na aktinový skelet zkoumaných buněk, který již po 30 minutách vede téměř k úplnému vymizení F-Aktinových komponent z buňky – viz obr. 12 vpravo. Zbytky F-aktinu se hromadí v malých ostrůvcích zejména kolem buněčného jádra. Po hodinové inkubaci vymizí i tyto.



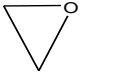
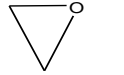

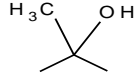
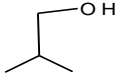





Obr. 12.: Vlevo - kontrola (ve střední části napravo je vidět probíhající mitóza). Vpravo - buňky vystavené působení neaktivnější frakci č. 3 biomasy (200 mg/ml) sinice *Nostoc* Luk. 5/96 obsahující dominantní látku m/z 873 (po 0,5 hod). Modře – DAPI – jádra, červeně – anti P-Tyr-01 – tubulin, zeleně – Phalloidin – Alexa488 – aktin.

5.6. Identifikace toxinů sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 pomocí HPLC/MS/MS

Pomocí ESI-MS bylo z extraktu biomasy *Nostoc* Luk. 5/96 zbaveného pigmentů v pozitivním modu v rozmezí retenčních časů 25 – 30 min detekováno osm píků s m/z 861, 859, 875, 845, 873, 843, 829 and 857. Záznamy hmotnostních spekter jednotlivých látek a jejich kolizně indukovaných spekter jsou uvedeny na Obr. 14 a retenční vlastnosti jednotlivých látek shrnuje Tabulka 15. Dle biologických účinků a porovnání hodnot m/z s daty z literatury (Moore et al., 1986; Patterson et al., 1994) jsme usoudili, že získané ionty by mohly být sodné adukty cyanobakteriálních toxinů, makrolidické struktury, konkrétně scytophyciny. Scytophyciny jako skupina neposkytují v mobilní fázi sestávající z metanolu a vody a pozitivním modu elektrospreje protonované molekulární ionty $[M+H]^+$ v dostatečném množství. Získali jsme tedy všechny scytophycinové varianty v odpovídajících sodných aduktech $[M+Na]^+$. The total ion current (TIC) chromatogram – celkový chromatogram (Obr. 14.) získaný pomocí ESI v pozitivním modu ilustruje, jak může být skupina scytophycinů kompletně separována od dalších nepříbuzných látek neznámé identity přítomných v surovém extraktu. TIC chromatogram (Obr. 10) jasně ukazuje formaci mnohonásobného píku vymytého z kolony mezi 25 a 30 min. Následné SIM dělané pro hmoty korespondující se sodíkovými adukty $[M+Na]^+$ jednotlivých scytophycinových variant ukázaly přítomnost 8 metabolitů příslušejících k jednotlivým

scytophycinům. Retenční chování a obzvláště spektra z kolizně indukované disociace (CID) poskytují data o podobnostech ve spektrech u všech scytophycinových variant (Obr. 14.).

Retenční časy jednotlivých scytophycinů v reverzním systému odrážely jejich strukturální rozdíly. Za retenci konkrétního scytophycinu jsou zodpovědné hlavně zbytky R1 a R2. Efekt substituentů na pozicích R3 a R4 je již méně zřetelný (Tab. 14.).

	SC-A	SC-B	SC-C	SC-D	SC-E
R₁ (C-6)	H	H	H	H	H
R₂ (C-7)	OH	OH	OH	OH	OH
R₃ (C-16)					
R₄ (C-19)	OMet	OMet	OMet	OMet	OMet
R₅ (C-27)					

Tab. 14. Obecná struktura scytophycinů – nahoře, s jednotlivými substitucemi příslušejícími k variantám scytophycinů.

Retenční chování jednotlivých příslušníků scytophycinové rodiny demonstruje tento obecný princip (Tab. 15.). Jejich eluce (v klesajícím pořadí) skrze všechny třídy scytophycinů může být zjednodušena následovně: 6-OH-SCs, 6-OH-7-O-Met-SCs, SCs

and 7-O-Met-SCs. Obecně se dá říci, že methylace hydroxylových skupin zvyšuje retenční čas a naopak větší počet volných hydroxylových skupin způsobuje více hydrofilní charakter sloučeniny a smižuje retenční čas. Retenční časy scytophycinů také dobře korespondovaly s klesající polaritou jednotlivých scytophycinů vyjádřenou hodnotami LogP. Pro členy skupiny scytophycinu B je toto chování následující: -1.28, -0.42, 0.26, 1.04 a skupiny scytophycinů D/E: -0,66/-0,80; 0,20/0,06; 0,88/0,74. Hodnoty LogP byly vypočítány v ACD Labs Software. Toto naznačuje, že polarita separovaných látek hraje zásadní roli v retenčním chování makrolidů scytophycinové rodiny. Toto zjištění může být užitečné pro identifikaci strukturně známých látek a potvrzení predikovaných výsledků.

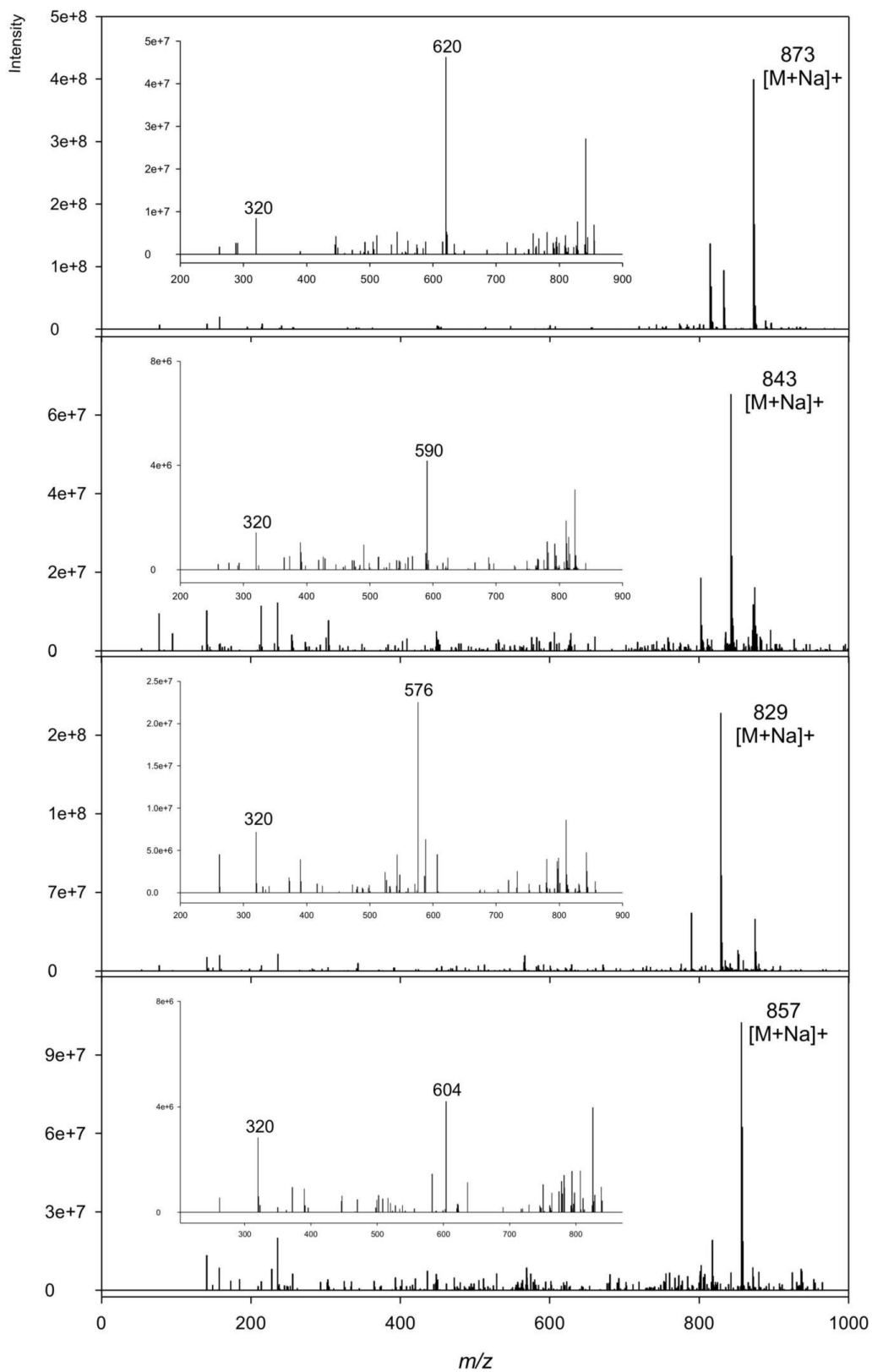
Sloučenina	Vzorec	MW	t _R [min]	[M+Na] ⁺	Diagnostické fragmenty (m/z)
6-OH-SC-D/E	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₃	838	25,2	861	843 (10), 608 (50), 320 (25), 262 (15)
6-OH-SC-B	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₃	836	26,0	859	841 (10), 606 (55), 320 (25), 262 (10)
6-OH-7-OMet-SC-D/E	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₃	852	26,3	875	622 (45), 320 (20), 290 (10), 262 (15)
7-OMet-19-deMet-SC-D/E	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₂	822	26,6	845	606 (50), 320 (25), 262 (15)
6-OH-7-OMet-SC-B	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₃	850	27,1	873	840,5 (40), 620 (55), 320 (25), 262 (15)
SC-B	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₂	820	27,6	843	825 (40), 620 (55), 320 (25), 262 (15)
SC-C	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₁	806	28,3	829	606 (55), 320 (25), 290 (10), 262 (15)
7-OMet-SC-B	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₂	834	29,9	857	620 (55), 320 (25), 262 (15)

Tab. 15. Varianty scytophycinů, jejich sumární vzorce, molekulové hmotnosti, retenční časy a typické fragmenty. Diagnostické fragmenty jsou vyznačeny tučně.

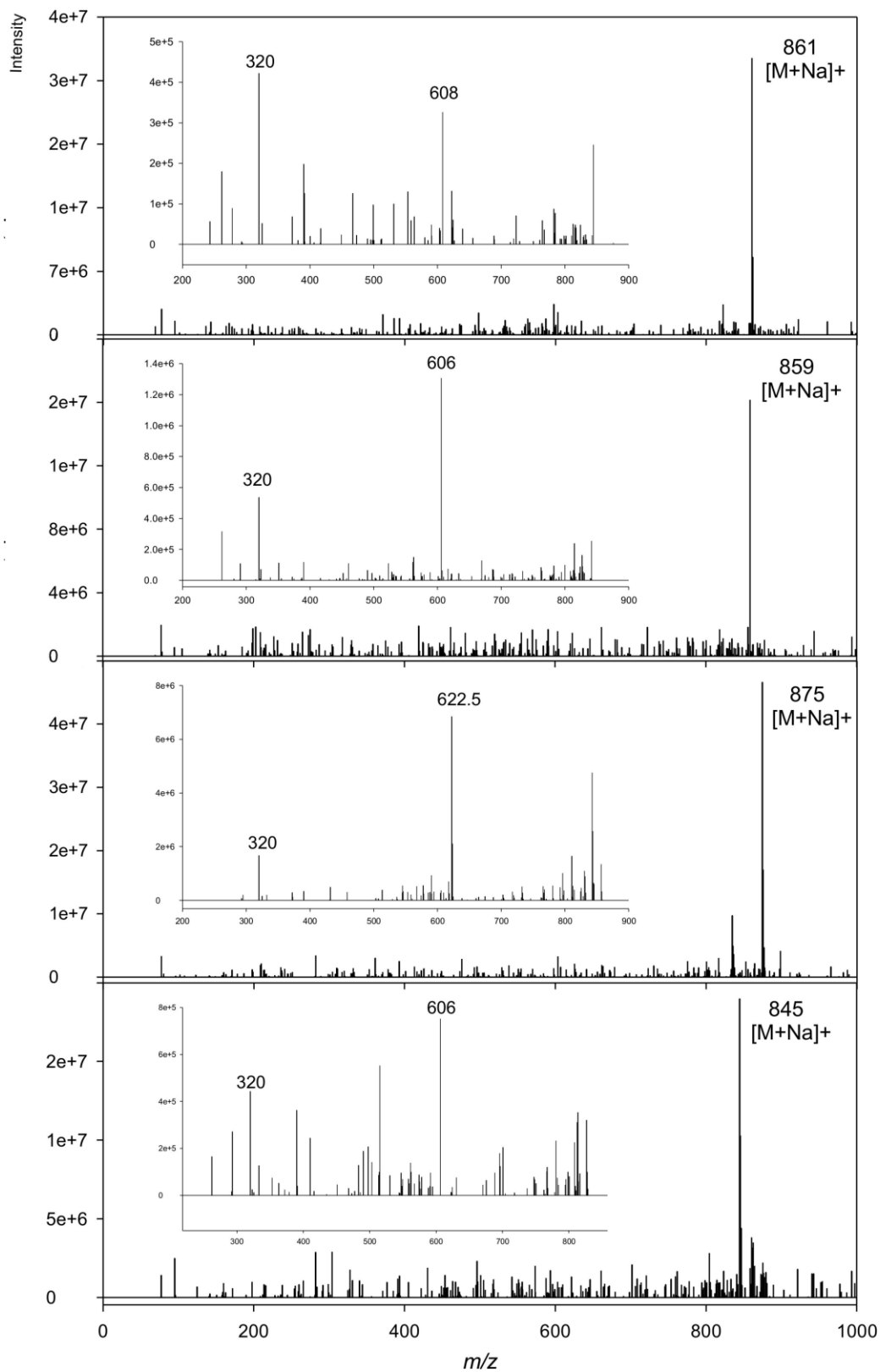
Kromě základních scytophycinů zobrazených v tabulce 15 existuje ještě mnoho potenciálních kombinací vedoucích k množství nových derivátů scytophycinů. Nejobvyklejší jsou hydroxyderiváty na pozici C-6, metylace hydroxyly na pozici C-7 a méně často demethylace methoxyskupiny na pozici C-19.

Pro určení chemické struktury jednotlivých scytophycinů bylo vzato v potaz několik důležitých pozorování: eluční schéma, sodíkové prekurzové ionty $[M+Na]^+$, experimenty z kolizně indukované dekompozice (CID) a relativní intenzity formovaných fragmentů. Některé scytophyciny, které se objevily v našem vzorku měly stejnou molekulovou hmotnost (např. m/z 845, 843, 859, 875), takže bylo nezbytné použít experimenty s MS/MS, aby bylo možno mezi nimi rozlišit jednotlivé scytophycinové varianty.

Při rozlišování strukturně podobných scytophycinů bylo také nutno použít tzv. shifting techniku (McLafferty, 1980). Tento přístup je založen na předpokladu, že příbuzné metabolity mají společné některé části svých struktur – části mateřské sloučeniny – a tedy poskytují specifické CID produktové ionty reprezentující tyto nebo části těchto substruktur. Tedy výběr prekurzového iontu a vícenásobná fragmentace pomocí hmotnostní fragmentace s iontovou pastí (ITMS – ion trap mass spectrometry) je zvláště užitečná ve skupinově specifické detekci rodiny scytophycinů. Podpora v objasňování struktur fragmentů a mechanismu jejich formace byla získána použitím ACD/MS Fragmentoru.



Obr. 14. Total ion chromatogramy (TIC) jednotlivých scytophycinů. CID spektra jsou zobrazena uvnitř obrazových polí.



Obr. 14 pokračování. Total ion chromatogramy (TIC) jednotlivých scytophycinů. CID spektra jsou zobrazena uvnitř obrazových polí.

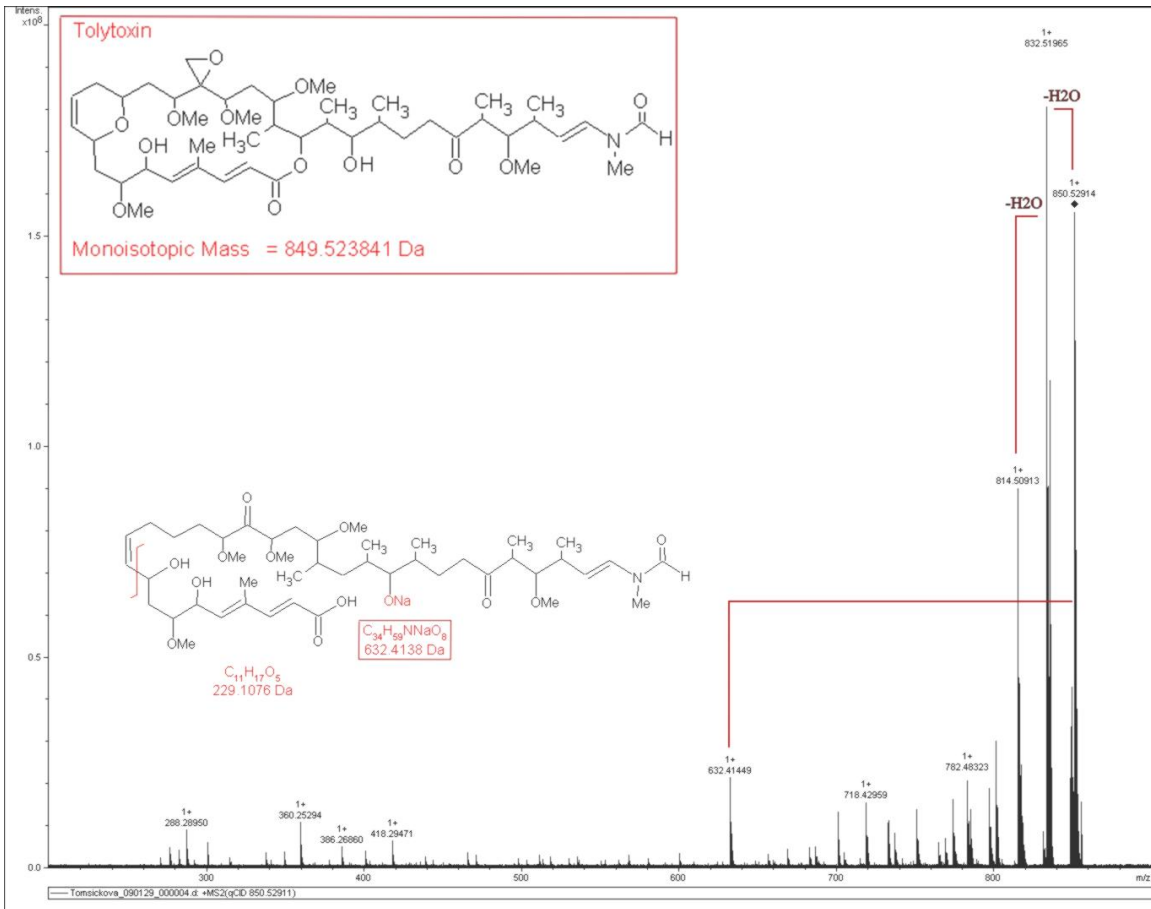
Scytophyciny sice neposkytují protonované molekulové ionty, tyto ionty ale nejsou pro CID experimenty nezbytné. Podrobeny CID, sodíkové prekurzorové adukty $[M+Na]^+$ poskytují strukturně informativní fragmentové píky, které vykazují podobnost s temi získanými štěpením $[M+H]^+$ iontů. Posun pozice scytophycinového kruhu se odráží jak na stupni, tak na cílech fragmentace, což dělá CID skvělým nástrojem pro rozlišení příslušníků scytophycinové rodiny. Stupeň nabití konkrétní molekuly souvisí s počtem dusíků v molekule. Vzhledem k tomu, že všechny scytophyciny obsahují pouze jeden dusík, scytophyciny poskytují jen jednu nabitou ionty. Prvním stupněm při fragmentaci těchto scytophycinových sodných aduktů v plynné fázi je ztráta vody ($[M+H-H_2O]Na^+$) nebo demethoxylace ($[M+H-CH_3O]Na^+$) na různých pozicích u různých scytophycinových variant. Další fáze v CID vede k strukturně signifikantním produktům charakteristickým pro jednotlivé páteřní scytophycinové struktury, které se liší substitucemi na C-6, C-7 a C-16 pozicích (Tab. 14) (i) m/z 590, 604, 606 a 620 pro SC-A/B, kde tučně jsou vyznačeny dva diagnostické ionty, (ii) m/z 592, 606, 608 a 622 pro SC-D/E kde tučně jsou vyznačeny opět dva diagnostické ionty a (iii) m/z 576, 590, 592 a 606 pro SC-C kde je jediný diagnostický iont zvýrazněn tučně. Rozdíl dvou jednotek u 6-OH-7-OMet-SC-D/E vzhledem k 6-OH-7-OMet-SC-A/B ukazuje modifikaci na pozici C-16. Méně signifikantní produktový iont je m/z 606 protože se objevuje u všech třech scytophycinových tříd (6-OH-SC-A/B, 7-OMet-SC-D/E a 6-OH-7-OMet-SC-C). Přítomnost dříve zmiňovaných fragmentů páteřní struktury je považováno za velmi užitečnou informaci poskytující přesvědčivé vodítko pro identifikaci konkrétní varianty scytophycinu.

Nicméně jen dva páry produktových iontů: m/z 320 ($C_{16}H_{27}NNaO_4$, $[M+H-C_{30}H_{48}O_9]Na^+$), m/z 262 ($C_{14}H_{23}NaO_3$, $[M+H-C_{32}H_{51}O_{10}]Na^+$) a m/z 322 ($C_{16}H_{29}NNaO_4$, $[M+H-C_{30}H_{50}O_9]Na^+$), m/z 264 ($C_{14}H_{25}NaO_3$, $[M+H-C_{32}H_{53}O_{10}]Na^+$) pocházející ze štěpení postraního řetězce na pozici C-24 může být považováno za diagnostický fragment pro scytophyciny B, C, D, E a také scytophycin A. Další diagnostické ionty m/z 262 a m/z 264 pocházejí ze štěpení bočního řetězce na pozici C-32 a ztráty 58 u z terminální keto skupiny po Mc. Laffetyho přesmyku. Chemická struktura hlavních fragmentů pro

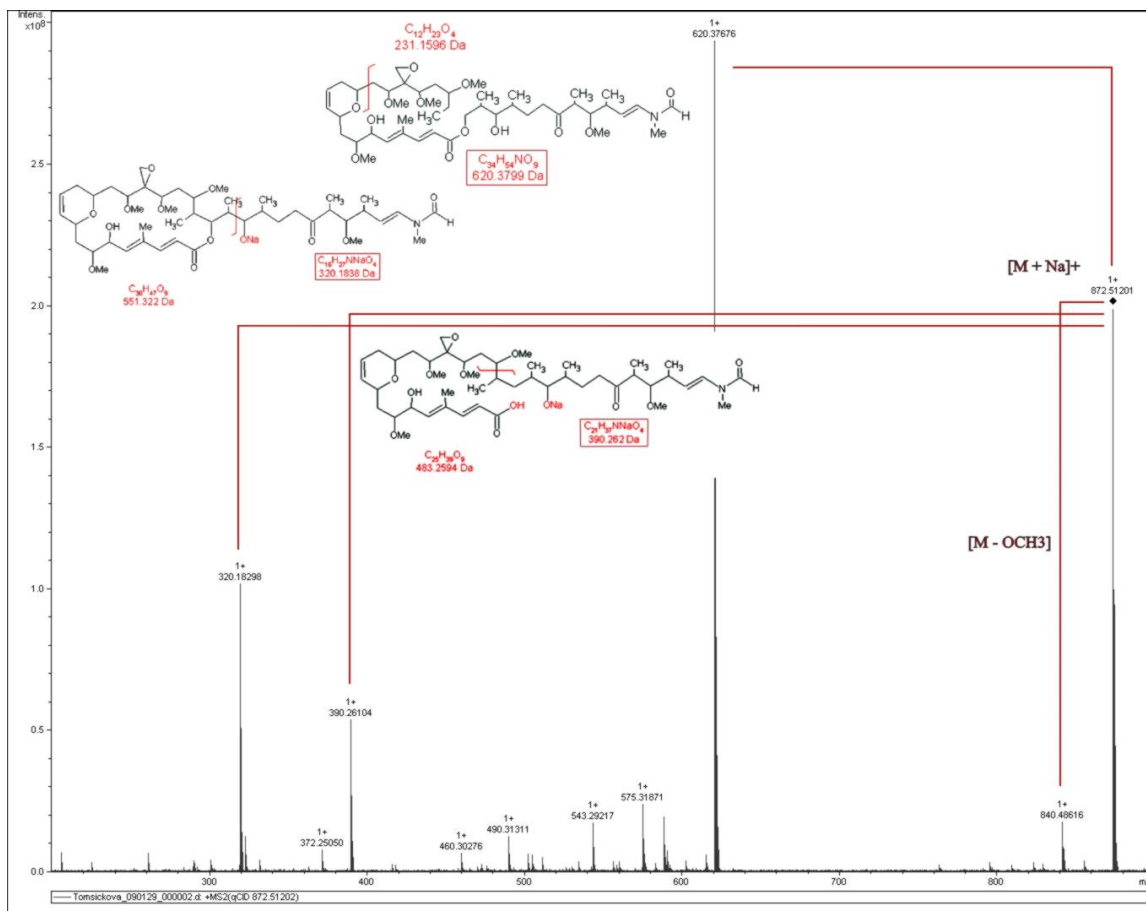
nejznámější scytophycinový derivát 6-OH-7-OMet-SC-B (Tolytoxin) je ukázán v tabulce 16 a detailněji je ukázána na Obr 16.

<i>Charakteristika fragmentu</i>	<i>Chemická struktura fragmentu</i>
Fragment: <i>m/z</i> 620, $C_{32}H_{51}NaO_{10}$, $[M+H-C_{13}H_{20}O_3] Na^+$	
Fragment: <i>m/z</i> 320, $C_{16}H_{27}NaO_4$, $[M+H - 30H_{48}O_9] Na^+$	
Fragment: <i>m/z</i> 262, $C_{14}H_{23}NaO_3$, $[M+H - C_{32}H_{51}O_{10}] Na^+$	

Tab. 15. Identifikace hlavních fragmentů nejsilnějšího ze Scytophycinů 6-OH-7-OMet-SC-B (Tolytoxinu).



Obr. 14. Rekonstrukce fragmentace toxinu m/z 873 Tolytoxinu.



Obr. 14 – pokračování. Rekonstrukce fragmentace toxinu m/z 873 Tolytoxinu.

6. DISKUZE

6.1. Fungicidní látky produkované sinicemi rodu *Nostoc*

Z výsledků uvedených v této práci jasně vyplývá, že fungicidní působení je v této skupině organismů velmi zřídka. Ani při rozšíření testované skupiny o zástupce dalších rodů sinic se další významně fungicidně působící látky nepodařilo objevit. Silné fungicidní působení vykazoval pouze jediný kmen z celkem 63 testovaných a to *Nostoc punctiforme* Lukešová 5/96. Tento kmen půdní sinice byl objeven v jámě po těžbě hnědého uhlí v Sokolově. Ostatní sinice izolované z této lokality žádné fungicidní účinky neměly (tab. 5 a Hrouzek et al., 2005). Půdní sinice často produkují toxiny (Codd et al., 1997; Hrouzek et al., 2005), což se obecně považuje za odpověď na velmi silný predační tlak, kterému jsou vystaveny. Často bývají totiž na svých stanovištích jedním z primárních producentů biomasy a predace je tedy enormní. (Dryden and Wright, 1987; Jürgens and Matz, 2002). V článku (Hrouzek et al., 2010) je zřejmý zajímavý fakt, že

nejpříbuznější k sinici *Nostoc* (Lukešová 5/96) zkoumané v této práci se ze všech sledovaných kmenů ukázala být sinice *Nostoc* Sp. CALU 996 původem z Afriky, což potvrzuje tvrzení zmíněné v úvodu a to, že taxonomie sinic je velmi komplikovaná a produkce určité skupiny sekundárních metabolitů neznamena nutně blízkou fylogenetickou příbuznost mezi zkoumanými kmeny. Genom sinic je jako u ostatních prokaryot velmi plastický a proměnlivý a je tedy možné, že se podobné metabolické dráhy vedoucí ke stejným sekundárním metabolitům vyvíjejí nezávisle u poměrně nepříbuzných organismů jako jsou *Tolypothrix*, *Scytonema* a *Nostoc*. Další kmen, který v této práci v rámci screeningu vykazoval mírné fungicidní působení byl *Cylindrospermum* C24, u nějž se podařilo izolovat toxiny, jimž byl dán název Puwaiaphyciny F a G (Hrouzek, 2010).

6.2. Izolace a přečištění aktivních látek z extraktu sinice *Nostoc* Lukešová 5/96

Ať už vytřepávání mezi dvě nemísitelné fáze, tak i jen předčištění pomocí hexanu (odparek surového extraktu byl opakovaně promýván 100% hexanem) se ukázalo být velmi užitečným pro optimalizaci následných chromatografických separací. Tyto postupy sloužily pro odstranění nepolárních nečistot, zejména pigmentů. Kdyby tyto kroky nebyly provedeny, výrazně by se znesnadnila recyklace kolony a při silném výskytu pigmentů by mohla být náplň znehodnocena. Vzhledem k tomu, že scytophyciny izolované ze sinice *Nostoc* Luk. 5/96 mají relativně velmi podobnou chemickou strukturu, jejich retenční vlastnosti jsou také podobné a separace sloupcovou chromatografií, ani TLC nepřinesla náležité rozdělení. Přesné odchyťávání píků dle UV detekce na preparativní chromatografii bylo užitečnější. Nicméně ke zcela kompletnímu odseparování všech píků od sebe stejně nedošlo, protože retence některých scytophycinů se do značné míry překrývají. Nicméně ale k identifikaci jednotlivých jejich variant se ukázaly být plně dostačující výsledky cílených kolizně indukovaných disociací na hmotnostním spektrometru. Analýzy NMR nebyly potřeba. MS data se přesně shodovala s těmi publikovanými objeviteli scytophycinů (Ishibashi et al., 1986; Moore et al., 1986; Patterson and Bolis, 1993) a potvrzení tedy je jisté.

6.3. Kultivace sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 a experimenty s kultivačními podmínkami

Změnou kultivačních podmínek lze ovlivnit nejen růst řas a sinic, ale i produkci jejich metabolitů. Dalším cílem práce proto bylo nalezení optimálních kultivačních podmínek pro růst vybraných kmenů sinic, které by zároveň stimulovaly produkci aktivních látek. Jako proměnné parametry byly zvoleny kultivační teplota, intenzita osvětlení a koncentrace základních živin. Ke stanovování přírůstků biomasy nebylo možno v našem případě použít klasických metod, jako je například spektrofotometrické měření optické hustoty, protože sinice *Nostoc* Luk. 5/96 je vláknitá a tvoří shluky (punctiformae). Již v dřívějších analýzách prováděných na pracovišti MBÚ Třeboň se ukázala jako velmi užitečná a vypovídající metoda měření úbytku dusičnanů z kultivačního média. Při kultivacích jednobuněčných sinic, které tvoří rovnoměrný zákal bylo zkoušeno porovnávání obou metod a analýza iontů poskytuje analogické výsledky (Kopecký, nepublikovaná data).

Při posuzování nárůstu produkce toxinů během celé doby kultivace ve větším osmilitrovém zařízení bylo dosaženo nižších výnosů jak biomasy, tak toxinů, než při pěstování v 400 ml válečcích, což se dá vysvětlit tak, že v mnohem rozměrnějším válci, je mocnost suspenze větší a nedochází v ní k rovnoměrnému prosvícení jakkoli míchané kultury. Pokud bylo použito vyšší míry ozáření, kultura byla přesvícená a shlukovitě hynula. I pro tyto masové kultivace bylo použito stejných podmínek jako pro kultivace laboratorní, tedy 30°C a 90 W.m⁻². Při této kombinaci kultivačních podmínek kultura dosahovala nejvyšších výnosů biomasy a tedy i potenciálně získatelné množství aktivních látek bylo největší. Pravděpodobně by bylo lepší použít plochých kultivačních nádob, namísto válce.

Z porovnání růstových rychlostí je patrné, že čím víc světla je kultuře poskytnuto, tím při nižších teplotách je dosaženo maxima růstové rychlosti. Dále je ale zřejmé, že tato sinice je spíše teplomilnější a s vyššími nároky na světlo. Článek zabývající se vlivem kultivačních podmínek na produkci scytophycinů u *Scytonema ocellatum* (Patterson and Bolis, 1993) popisuje, že maximální produkce sledovaných scytophycinů bylo dosaženo při vyšší teplotě (25°C) než bylo optimum pro produkci biomasy (20°C). U *Nostoc* Luk. 5/96 tomu bylo naopak. Pro produkci toxinů byla vhodná nižší teplota než pro růst. U

intensity ozáření bylo v článku (Patterson and Bolis, 1993b) pozorováno stejné maximum jak pro růst, tak pro produkci toxinů. Totéž se potvrdilo u *Nostoc* Luk. 5/96.

Analýzy vlivu dusíku a fosforu na produkci biomasy a na syntézu toxinů nepřinesla průkazné korelace. V literatuře (Patterson and Bolis, 1995) se uvádí, že syntéza scytophycinů u *Scytonema ocellatum* také není specificky ovlivněna koncentracemi testovaných živin. Ukázalo se však, že biomasa sinice *Nostoc* Luk. 5/96 roste lépe při mnohem vyšších koncentracích dusíku, než je předepsáno pro Allen&Arnon médium, což by bylo vhodné zohlednit při vylepšování jejího média pro případnou masovou kultivaci. Naopak koncentrace fosforu je v Allen&Arnon médiu pro růst této sinice jednoznačně optimální. Velmi výrazně se kultuře dařilo v BG médiu (data nezveřejněna), je tedy na snadě doporučit pro příští kultivace použití tohoto média.

Některé toxiny syntetizované sinicemi jsou syntetizovány jako odpověď na enviromentální stres (Pomati et al., 2003), jiné jsou naopak produkovány v podmínkách pro sinici optimálních (Lehtimäki et al., 1997; Rapala et al., 1997; Sivonen, 1990). Více toxinů se objevuje v kultivačním médiu *Nostoc* Luk. 5/96 také v podmínkách nevhodných pro růst, kde se také dá předpokládat výraznější rozklad buněk. V literatuře (Rapala et al., 1997) je psáno, že ve zdravé kultuře bývá v log fázi průměrně jen 10-20% toxinů extracelulárních a to kvůli tomu, že i tam dochází k lýzi buněk. V kultuře *Nostoc* Luk. 5/96 se v médiu objevovalo dokonce ještě řádově méně (0,1%). Ve stacionární fázi růstu, kdy dochází k zesílenému odumírání buněk, se objevuje v médiu výrazně více toxinů, než v log fázi. Jako většina toxických sekundárních metabolitů, bývají cyanotoxiny zřídka rozpuštěny ve vodě (Jones and Orr, 1994; Tsuji et al., 1994; Ueno et al., 1996). Většinou zůstávají v buňkách (mikrocystiny) a zabezpečují tak ochranu před predací. Z výsledků zkoumání kmene *Nostoc* Luk. 5/96 vyplývá, že scytophyciny jsou u tohoto kmene syntetizovány spíše v optimálních podmínkách, než jako odpověď na stres a jsou vnitrobuněčné. Dalším potvrzené tvrzení z literatury je, že pokud je slabý růst kultury, bývá slabá také produkce toxinů (Rapala et al., 1993; Lehtimäki et al., 1997), což se ukazuje také při kultivaci sinice *Nostoc* Luk. 5/96. Jistou „výhodu“ mají sinice obsahující nitrogenasu, díky níž jsou nezávislé (jak co se týče růstu, tak produkce toxinů) na přísunu dusíku z vnějšího prostředí.

Autoři publikací popisujících objevení scytophycinů a jejich produkci u *Scytonema ocellatum* (Patterson and Bolis, 1993b) pozorovali koncentrace toxinů v biomase zhruba 2,5 g/Kg u Tolytoxinu, 0,17 g/Kg u HMSE a zhruba 0,02 g/Kg DMSC, u něž byl, stejně jako u HMSE s časem kultivace pozorován pokles. U DMSC byl tento pokles výraznější a byl pozorován kolem 25 dne. U HMSC bylo maximální produkce dosaženo zhruba 32. den. Tolytoxin dosahoval svého maxima až po 40 denní kultivaci. Z toho faktu autoři vyvozují možnou biosyntetickou dráhu DMSC → HMSE → Tolytoxin. Kultura *Nostoc* Luk. 5/96 je schopna produkce sice menšího množství Tolytoxinu (0,4 g/Kg), ale zato za mnohem kratší čas (7 dní). Časový průběh syntézy toxinů v biomase *Nostoc* Luk. 5/96 (Obr. 7) ukázal, že tolytoxinu začalo ubývat zhruba po 150 hodině kulivace, toxinu s m/z 829 (scytophycin C) také a toxin m/z 875 (HMSC) rostl až do ukončení kultivace (200 hod.), což by spíše naznačovalo biosyntetickou dráhu tolytoxin (scytophycin C) → HMSC. Zajímavý je zpožděný nástup produkce toxinů s m/z 829 a m/z 875 oproti tolytoxinu. Tento jev by mohl naznačovat, že tyto toxiny jsou možná produkty degradace tolytoxinu. Je z evolučního hlediska spíše nepravděpodobné, že by se z toxičtějšího metabolitu syntetizoval metabolit méně toxický. Ledaže bychom neznali ještě všechny benefity, které ostatní scytophyciny, vyjma tolytoxinu, mohou poskytovat organismu, který je produkuje. Spíše je ale pravděpodobné, že syntéza těchto toxinů je na sobě nezávislá, případně se biosyntetické dráhy u různých organismů liší.

6.4. Biologická aktivita látek z extraktu sinice *Nostoc* Lukešová 5/96

Fungicidní účinnost extraktu sinice *Nostoc* Luk. 5/96 je velmi dobrá a dlouhodobá a její spektrum je zajímavé svou specifíčností. Vzhledem k faktu, že aktinová vlákna, tedy i F-aktin, jehož polymerizace je tolytoxinem inhibována, se vyskytují všeobecně v eukaryotických buňkách (Walker and Garrill, 2006), je zvláštní spíše než zjištění, že na některé houbové patogeny tolytoxin působí destruktivně spíše pozorování, že na některé houbové organismy extrakt obsahující směs scytophycinů neúčinkuje (Tab 10). V literatuře je popisován inhibiční vliv izolovaných scytophycinů na *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Sacharomyces cervisiae* a *Trichophyton mentagrophytes*, přičemž poslední zmiňovaný kmen vykazoval pouze minimální odezvu (Carmeli et al., 1990). Dále bylo testováno dalších 9 kmenů hub (Patterson and Carmeli,

1992a) a to konkrétně: *Alternaria alternata*, *Bipolaris incurvata*, *Calonectria critalarae*, *Colleotichum coccodes*, *Phyllosticta capitalensis*, *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solanii*, *Sclerotium rofsii* a *Thielaviopsis paradoxa*. Na všechny tyto organismy měl tolytoxin výrazný inhibiční efekt a to v rozmezí MIC 0,25 do 8 nM. V případě jednoho kmene (*Rhizoctonia solanii*) musíme s daty z literatury polemizovat. Extrakt *Nostoc* Luk. 5/96 nevykazoval na tento kmen hub žádný inhibiční efekt, zatímco autoři citovaného článku prezentují MIC dokonce 0,25 nM. Pro ověření by bylo třeba porovnat oba kmeny *Rhizoctonia solanii*, které byly k experimentu použity a pokud by se výsledky potvrdily, zkoumání těchto dvou velmi blízké příbuzných kmenů by mohlo přinést odpověď na otázku, jakým mechanismem jsou schopny se některé houby s toxickým působením scytophycinů vyrovnat. Extrakt *Nostoc* Luk. 5/96 nepůsobí proti houbám: *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma harzianum* a *Trichothecium roseum*. Působí proti imperfektním houbám (Deuteromycotina) třídy Dematiaceae (*Alternaria*, *Dendriphion*) a velmi zajímavá je jeho inhibiční aktivita proti druhu *Botrytis cinerea* a částečná (krátkodobá) také proti *Sclerotinia sclerotiorum* (Ondřej M., osobní sdělení). Fungicidní a cytotoxická aktivita byla potvrzena ve frakcích extraktu obsahujících zejména tolytoxin a scytophycin B, což souhlasí s pozorováními popsány skupinou vědců z Havaje (Patterson et al., 1994). U tolytoxinu se uvádí, že cytotoxické účinky jsou pozorovány již při 2 nM koncentraci (Patterson et al., 1993) a fungicidní při koncentraci srovnatelné. V experimentech prováděných v rámci této práce se nepodařilo odseparovat jednotlivé látky od sebe natolik, aby bylo možno přesně kvantifikovat MIC koncentrace, ukázalo se ale, že jak fungicidní, tak cytotoxická aktivita byla dosahována při stejné koncentraci, což data z literatury potvrzuje.

Růst rostlin *Chlorophytum* v hydroponickém médiu nebyl inhibován a rostliny nevykazovaly známky poškození oproti kontrole, takže buďto nedochází k prostupu scytophycinu z vodivých meristémů do buněk, což je vzhledem k jejich poměrně malé molekulové hmotnosti nepravděpodobné, nebo je rostlina schopna se s touto zátěží vyrovnat. Oproti tomu klíční rostliny, jejichž osivo bylo silně infikováno sporama hub *Dendryphion* a *Alternaria* se s toxicitou scytophycinů vyrovnávají jen velmi těžko. Výskyt hub sice klesl, ale ukázalo se, že extrakt *Nostoc* (Lukešová 5/96) – konkrétně tedy toxin *m/z* 873 – výrazně inhibuje růst kořenového klíčku, netvoří se sekundární kořeny,

klíčenci následně přestávají růst, zhnědnou a zajdou. Tyto malformace souvisejí s vlivem Tolytoxinu a pravděpodobně i dalších scytophycinů na buněčný cytoskelet vyvíjejících se rostlin. Bylo však prokázáno, že tento jev je druhově specifický, jelikož rostlinky lnu se se zátěží vyrovnávaly mnohem lépe, než rostlinky máku. To může souviset s jejich habitem, jelikož klíčící rostliny máku jsou drobnější, než rostlinky lnu.

Efekt scytophycinu na desintegraci aktinových vláken je v souladu s předešlými pozorováními (Patterson et al., 1993), kde je uváděno, že 6-hydroxy-7-O-methyl-SC-B (Tolytoxin) a příbuzné scytophyciny depolymerizují aktinová vlákna. Tolytoxin působí na aktinová vlákna, konkrétně na F-Aktin. Zároveň také zabraňuje polymerizaci jednotlivých aktiniových jednotek. F-Aktin je depolymerizací přeměňován na globulární G-Aktin. Tento efekt je reverzibilní. Po vymytí toxinu z buněk je polymerizace aktinu plně obnovena a buňky se dále dělí. Ostatní scytophyciny vykazují podstatně mírnější cytotoxický a také fungicidní efekt než tolytoxin.

Do nedávna bylo testování cytotoxicity na buněčných liniích často předcházeno (nebo nahrazováno) testováním na žábronožkách. Článek, na němž je postavena tato práce (Hisem et al. 2011) však jasně dokládá, že tyto dva testy nesmějí být zaměňovány (většina z testovaných kmenů sinic vykazovala nějakou aktivitu oproti zkoumaným buněčným liniím, ale pouze malá část z nich účinkovala současně na žábronožky. Naopak pouze 4 z 63 kmenů produkovaly toxiny účinkující na žábronožky a nikoli na buněčné linie – viz Kap. 9. Ovšem při testování tak silných cytotoxinů, jakými je tolytoxin jsou velmi výrazně ovlivněny jak žábronožky, tak testované buněčné linie. Také je faktem, že také vhodně zvolené buněčné linie mohou výrazně ovlivnit výsledky testů. Mnoho toxinů funguje specificky na konkrétní savčí buňky (Glen et al., 2000). Prozatím byly na působení scytophycinů s pozitivním výsledkem otestovány buněčné linie LoVo, KB, Hep-2, HL-60, HBL-100, T47-D, COLO-201, KATO-III (Patterson et al., 1993), k nimž jsme přidali další 3 (HeLa, YAC-1 a SP/2).

6.5. Strukturní analýza látek m/z 873, 829 a 875

Z extraktů biomasy sinice *Nostoc* Lukešová 5/96 bylo celkem vyizolováno a následně identifikováno 8 variant scytophycinů a to konkrétně osm píků s m/z 861, 859, 875, 845, 873, 843, 829 and 857, což jsou sodné adukty 6-OH-Scytophycinu D/E, 6-OH-

Scytophycinu B, 6-OH-7-OMet-Scytophycinu D/E, 7-OMet-19-deMet-Scytophycinu D/E, 6-OH-7-OMet-Scytophycinu B, Scytophycinu B, Scytophycinu C a 7-OMet-Scytophycinu B. Z grafu extrakce aktivních látek do jednotlivých rozpouštědel (Obr. 4.) jasně vyplývá, že scytophyciny jsou mírně nepolární látky, což způsobuje makrolidický kruh, na nějž připadá většina hmoty. Jako zásadní pro aktivitu se jeví být substituent na C16 v makrolidickém kruhu. Na tento uhlík je u biologicky neúčinnějšího ze scytophycinů, Tolytoxinu (m/z 873), navázán laktonový kruh, který se nevyskytuje u žádné jiné z doposud známých variant scytophycinů, což potvrzuje hypotézu, že tento substituent zodpovídá za silnou cytotoxickou a fungicidní aktivitu tolytoxinu. Výrazná biologická aktivita látek obsahujících ve své molekule laktonový kruh byla opakovaně popsána v literatuře (Gorrini et al., 2001; Strapasson et al., 2012; Wanga et al., 2009). Dále je v literatuře uváděno, že silnou biologickou aktivitu vykazuje také scytophycin B a A (Moore et al., 1986), což opět koresponduje s daty z této práce, kdy frakce 3 obsahovala jak scytophycin B, tak scytophycin C a její aktivita proti houbovým patogenům byla velmi výrazná, i když slabší než u tolytoxinu. Scytophycin A nebyl v extraktech sinice *Nostoc* Luk. 5/96 pozorován. Scytophycin C je pouze slabým fungicidem (Carmeli et al., 1990), takže za aktivitu frakce 3 je zodpovědný Scytophycin B. Scytophyciny jsou strukturně podobné izolátům z mořských hub *Theonella swinhoei* z Rudého moře, která má jako symbionta jednobuněčnou sinici. Zde se jedná o Swinholid A. Další velmi podobné látky jsou Ulapualidy A a B, Kabiramid C a Halichondramid produkované nudibranchiáty, kteří však žádné sinicové symbionty nemají. Všechny tyto látky působí fungicidně a cytotoxicky. Na makrolidické struktuře mají oxazolový kruh (Ishibashi et al., 1986). Podobně jako sinice (např. *Scytonema* sp., některé kmeny *Lyngbia majuscula*) i aktinomycety a řasy z oddělení *Dinoflagellata* produkují makrolidy – např. Amphidinolidy (Kobayashi and Tsuda, 2004), které také vykazují silné bioaktivní působení. Celá řada dnes využívaných antibiotik má makrolidickou strukturu (Clarithromycin, Dirithromycin, Erythromycin, Roxithromycin, Telithromycin a další), také některá imunosupresiva jako Tacrolimus, či Sirolimus, nebo fungicidy jako je Nystatin a Amphotericin B. Existují však také netoxické makrolidy (Namikoshi et al., 1994), takže zobecnění není na místě.

Při rozlišování strukturně podobných scytophycinů bylo nutno použít tzv. shifting techniku (McLafferty, 1980). Tento přístup je založen na předpokladu, že příbuzné metabolity mají společné některé části svých struktur – části mateřské sloučeniny – a tedy poskytují specifické CID produktové ionty reprezentující tyto substrukтуры, nebo jejich části. Tato strategie umožňuje rychlou identifikaci analogických struktur, bez zdoluhavých kroků tradiční strukturní analýzy zahrnující scale-up, extrakce, frakcionace a spektroskopické analýzy (NMR, X-Ray) jednotlivých izolovaných látek. Na příklad deriváty základních scytophycinů, jako hydroxylované nebo methylované formy, mohou být selektivně detekovány v pozitivním modu elektrospreje rozdílem hmot 16 u a 14 jednotek. Zjistili jsme, že i velmi malé koncentrace sodných iontů v mobilní fázi způsobují relativně silné intenzity pseudomolekulárních sodných aduktů každého ze scytophycinů. Malé množství sodných iontů v rozpouštědle bylo zjevně dostačující pro ionzaci. To může být vysvětleno silnou afinitou těchto iontů k makrolidické struktuře. Molekulární ionty a adukty v literatuře prezentované (Ishibashi et al., 1986) odpovídají těm, které byly nalezeny při našich analýzách. Jedině rozlišení ve skupině scytophycinů D a E je problematické, protože mají stejné hmoty molekulárních iontů a fragmentů a je velmi těžko rozlišitelné bez MNR dat. V našich podmínkách se nepodařilo tyto scytophyciny od sebe odseparovat, protože mají prakticky stejný retenční čas, hmotnost a afinitu k rozpouštědlům, proto úspěšné NMR analýzy provedeny nebyly, přesto se ale pomocí CID i tyto látky podařilo identifikovat.

7. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- 1) Z 63 testovaných kmenů sinic rodu *Nostoc* byly odhaleny 2 s fungicidními účinky. Z toho jen jeden a to *Nostoc* Luk. 5/96 vykazoval silné (nad 50% oproti kontrole) fungicidní působení.
- 2) Bylo nalezeno optimum kultivačních podmínek pro sledovaný kmen a to 30°C a 90 Wm⁻². Toto maximum se shoduje s podmínkami nejvhodnějšími pro růst, při nichž je nejvyšší výtěžnost fungicidních metabolitů. Byly testovány vlivy živin na růst a produkci aktivní látky a i zde se zjistilo, že optimum pro růst odpovídá optimu pro produkci toxinů. Kultura *Nostoc* Luk 5/96 produkuje nejvíce aktivní látky na konci exponenciální fáze růstu.
- 3) Ukázalo se, že toxiny produkované sinicí *Nostoc* Luk. 5/96 reverzibilně inhibují polymerizaci aktinových vláken. Jedná se o systemické fungicidy, působící také cytotoxicky, což bylo potvrzeno testy na žábřonozkách (100% mortalita za 12 hodin) a buněčných liniích (HeLa – hodnota inhibice 58±2,9, YAC-1 – hodnota inhibice 59±4,7 a SP/2 – hodnota inhibice 48±3,8).
- 4) Byl nalezen optimální postup izolace aktivních látek z biomasy sinice a to 70% methanolem, poté přečištění a separace na chromatografické koloně. Izolace látek z kultivačních médií byla prováděna extrakcí na SPE kolonce vymyté 100% methanolem, zakoncentrované na vakuové odparce.
- 5) LC/MSD Trap s UV detekcí nalezeno 4 potenciálně aktivních frakcí, které byly dále testovány. Byl vytvořen vhodný gradient methanol/voda, který zaručil slušnou separaci jednotlivých látek od sebe. Jednotlivé látky byly purifikovány pomocí preparativní HPLC a modifikovaných gradientů methanol/voda.
- 6) Jednotlivé látky byly analyzovány pomocí UV/MS-ESI, podrobovány vícenásobným fragmentacím, při kterých bylo zjištěno, že všechny aktivní látky produkované sinicí *Nostoc* Luk 5/96 jsou makrolidy ze skupiny scytophycinů, konkrétně 6-OH-Scytophycin D/E, 6-OH-Scytophycin B, 6-OH-7-OMet-Scytophycin D/E, 7-OMet-19-deMet-Scytophycin D/E, 6-OH-7-OMet-Scytophycin B, Scytophycin B, Scytophycin C a 7-OMet-Scytophycin B.

8. LITERATURA

- Aakermann, T., Skulberg, O.M., Liaaen-Jensen, S., 1992. A comparison of the carotenoids of strains of *Oscillatoria* and *Spirulina* (cyanobacteria). *Biochem. System. Ecol.* 20, 761-769.
- Adler, J., Spurná, V., Hrazdira, I. The effect of low intensity ultrasound on mammalian cell cultures. *Studia Biophys.*, 128. 1988. 5-20.
- Alberts, B., 1998. *Essential Cell Biology*. Garland Pub. 630 pp.
- Allen, M.B., Arnon, D.I., 1955. Studies on nitrogen-fixing blue green algae: I. Growth and nitrogen fixation by *Anabena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology* 30, 366-372.
- Allen, M.M., 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4, 1-4.
- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., Wright, D.T., 2006. Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology* 4, 147-166.
- Anagnostidis, K., Komárek, J., 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes *Arch. Hydrobiol./Algol. Stud.* 38-39, 327-472.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L., Suffness, M., 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Analysis.* 2, 107-111.
- Andrew, M., Peever, T.L., 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia* 101, 95-109.
- Antar, M., Zorica, S., 2008. Microalgae and Cyanobacteria: Food For Thought. *Journal of Phycology* 44, 260-268.
- Apeldoorn, M.A., Egmond, H.P., Speiers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 7-60.
- Bailey, B.A., Apel-Birkhold, P.C., O'Neill, N.R., Plaskowitz, J., Alavi, S., Jennings, J.C., Anderson, J.D., 2000. Evaluation of Infection Processes and Resulting Disease Caused by *Dendryphon penicillatum* and *Pleospora papaveracea* on *Papaver somniferum*. *Phytopathology* 90, 699-709.
- Baldrianová, L., Barath, P., 2011. Iontová chromatografie na profesionální úrovni *Chemagazín* 6.
- Banker, R., Carmeli, S., 1998. Tenuocyclamides A–D, cyclic hexapeptides from the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* var. *tenuum*. *J Nat Prod* 61, 1248–1251.
- Becher, P., Beuchat, J., Gademann, K., F, J., 2005. Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from *Nostoc* 78-12A. *J Nat Prod* 68, 1793–1795.
- Berry, J.P., Gantar, M., Gawley, R.E., Wang, M., Rein, K.S., 2004. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 139, 231-238.

- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith, G.D., Tredici, M.R., 2004. Evaluation of *Nostoc* Strain ATCC 53789 as a Potential Source of Natural Pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3313-3320.
- Borowitzka, M., A., , Borowitzka L., J., 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, 1-121.
- Boyd, M., Gustafson, K., McMohan, J., Shoemaker, R., O'Keefe, B., Mori, T., Gulakowski, R., Wu, L., Rivera, M., Laurencot, C., Currens, M., Cardellina, I., Buckheit, J., Nara, P., Pannell, L., Sowder, I., Henderson, L., 1997. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential application to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1521–1530.
- Brett, A.N., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R.A., Schaub, V., Sivonen, K., Börner, T., 1999. Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxicity of Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 181, 4089-4097.
- Broniatowska , B., Allmendinger, A., Kaiser, M., Montamat-Sicotte, D., Hingley-Wilson, S., Lalvani, A., Guiry, M., Blunden, G., D, T., 2011. Antiprotozoal, antitubercular and cytotoxic potential of cyanobacterial (blue-green algal) extracts from Ireland. *Nat Prod Commun.* 6, 689-694.
- Burja, A., M., , Banaigs, B., Mansour, E., A., , Burgess, J., G., , Wright, P., C., 2001. Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57, 9347-9377.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin–LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *Journal of Fish Biology* 46, 1042-1054.
- Carmeli, S., Moore, R.E., Patterson, G.M.L., 1990. Tolytoxin and new scytonemins from three species of *Scytonema*. *Journal of Natural Products* 53, 1533-1542
- Carrel, A., Burrow, M.T., 1911. Cultivation of tissues in vitro and its technique. *J. Exp. Med.* 13, 387-396.
- Codd, G.A., Ward, C.J., Bell, S.G., 1997. Cyanobacterial Toxins: Occurrence, Modes of Action, Health Effects and Exposure Routes. *Applied Toxicology: Approaches Through Basic Science* 19, 399-410.
- Cvet, M., 1903. *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sec. Ber. Deut. Botan. Ges* 14.
- Dolman, A., Rücker, J., Pick, F., Fastner, J., Rohrlack, T., al., e., 2012. Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *PLoS ONE* 7.
- Downard, K., 2009. J.J. Thomson Goes to America. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 1964-1973.
- Dryden, R.C., Wright, S.J.L., 1987. Predation of cyanobacteria by protozoa. *Canadian Journal of Microbiology* 33, 471-482.
- Duy, T.N., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Connell, D.W., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of environmental contamination and Toxicology* 163, 113-185.
- El-Thaher, T.S., Bailey, G.S., 1994a. A new staining method for cyclic peptides after Thinlayer chromatography. *Analytical biochemistry* 217, 335-337.
- Friedmann, E.I., Ocampo, R., 1994. A primitive cyanobacterium as pioneer microorganism for terraforming of Mars. *Advances in Space Research* 15, 243-246.

Garcia-Pichel, F., Nubel, U., Muyzer, G., 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch Microbiol* 169, 469-482.

Gey, G.O., Goffman, W.D., Kubicek, M.T. *Cancer research* 12. 1952. 264.

Giovannoni S.J., Turner S., Olsen G.J., Barns S., 1988. Evolutionary relationships among Cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* 170, 3584-3592.

Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., Pace, N.R., 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol*, 720-726.

Glen, S.R., Seawright, A.A., Moore, M.R., Lam, P.K.S., 2000. Cyindrospermopsin, A Cyanobacterial Alkaloid: Evaluation of Its Toxicologic Activity. *Therapeutic Drug Monitoring* 22, 89-92

Gorrini, M., Lupi, A., Viglio, S., Pamparana, F., Cetta, G., Iadarola, P., Powers, J.C., Luisetti, M., 2001. Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Erythromycin and Flurythromycin, Two Macrolide Antibiotics. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25, 492-499.

Govrin, E.M., Levine, A., 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.

Gustafson, K.R., Sowder, R.C., Henderson, L.E., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Rajamani, U., Pannell, L.K., Boyd, M.R., 1997. Isolation, Primary Sequence Determination, and Disulfide Bond Structure of Cyanovirin-N, an Anti-HIV (Human Immunodeficiency Virus) Protein from the Cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238, 223-228.

Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P.N., Kakkar, P., 2003. Retracted: Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere* 52, 1-21.

Hemscheidt, T., Puglisi, M., Larsen, L., Petterson, G., Moore, R., Rios, J., Clardy, J., 1994. Structure and biosynthesis of borophycin, a new boeseken complex of boric acid from marine strain of the blue green alga *Nostoc linckia*. *J Org Chem* 59, 3467-3471.

Hillenkamp, F., Karas, M., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 60, 2299-2301.

Hirata, K., Takashina, J., Nakagami, H., Ueyama, S., Murakami, K., Kanamori, T., K, M., 1996. Growth inhibition of various organisms by a violet pigment, nostocine A, produced by *Nostoc spongiaeforme*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1905-1906.

Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomšíčková, J., Zapomělová, E., Skácelová, K., Lukešová, A., Kopecký, J., 2011. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon* 57, 76-83.

Hoffmann, E.d., Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. book John Wiley & Sons, pp. 489.

Hrouzek, P., Kopecký, J., Salát, J., Maršálek, B., Lukešová, A., 2005a. Cytotoxic effect of soil cyanobacterial extracts to mammal cell lines YAC-1 and WEHI *Czech Phycology* 5, 79-90.

Hrouzek, P., Tomek, P., Lukešová, A., Urban, J., Voloshko, L., Pushparaj, B., Ventura, S., Lukavský, J., Štys, D., Kopecký, J., 2011. Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial *Nostoc* strains, originating from different climatic/geographic regions and habitats: Is their cytotoxicity environmentally dependent? *Environmental Toxicology* 26, 345-358.

Hrouzek, P., Ventura, S., Lukesova, A., Mugnai, M.A., Turicchia, S., Komarek, J., 2005b. Diversity of soil Nostoc strains: phylogenetic and phenotypic variability. Arch. Hydrobiol. Suppl. 117, 251-264.

Chao, J.I., Liu, H.F., 2006. The Blockage of Survivin and Securin Expression Increases the Cytochalasin B-Induced Cell Death and Growth Inhibition in Human Cancer Cells. Molecular Pharmacology 69, 154-164.

Ishibashi, M., Moore, R.E., Patterson, G.M.L., 1986a. Scytophycins, Cytotoxic and Antimycotic Agents from the Cyanophyte *Scytonema pseudohofmanni*. J. Org. Chem. 51, 5300-5306.

Jaki, B., Heilmann, J., Sticher, O., 2000. New antibacterial metabolites from the cyanobacterium Nostoc commune (EAWAG 122b). J Nat Prod 63, 1283-1285.

Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.R., Sticher, O., 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. Pharm. Biol. 37, 138-143.

Jaki, B., Orjala, J., Sticher, O., 1999. A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium Nostoc commune. J Nat Prod 62, 502-503.

Jones, G.J., Orr, P.T., 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a Microcystis aeruginosa bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. Water Res. 28, 871-876.

Jürgens, K., Matz, C., 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 81, 413-434.

Jüttner, F., Todorova, A.K., Walch, N., Philipsborn, W., 2001. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from Nostoc 31. Phytochemistry 57, 613-619.

Kajiyama, S., Kanzakt, H., Kawazu, K., Kobayashi, A., 1998. Nostofungicide, an Antifungal Lipopeptide from the Field-grown Terrestrial Blue-green Alga Nostoc commune. Tetrahedron Letters 39, 3737-3740.

Karsten, U., Garcia-Pichel, F., 1996. Carotenoids and Mycosporine-like Amino Acid Compounds in Members of the Genus Microcoleus (Cyanobacteria): A Chemosystematic Study. Systematic and Applied Microbiology 19, 285-294.

Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., 1975. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur. J. Immunol. 5, 112-117.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A., 2001. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 9th edition. . CABI Publishing, Wallingford.

Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., Huovinen, K., 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. Environ. Toxicol. Water Qual. 6, 423-436.

Kobayashi, J.i., Tsuda, M., 2004. Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. Nat. Prod. Rep. 21, 77-93.

Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapala, J., Sivonen, K., Niemela, S.I., 1995. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. Lett. Appl. Microbiol. 21, 109-114.

Leão, P.N., Costa, M., Ramos, V., Pereira, A.R., Fernandes, V.C., Domingues, V.F., Gerwick, W.H., Vasconcelos, V.M., Martins, R., 2013. Antitumor Activity of Hierridin B, a Cyanobacterial Secondary Metabolite Found in both Filamentous and Unicellular Marine Strains. PLoS One 8.

- Leflaive, J., Ten-Hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52, 199-214.
- Lehtimäki, J., Moisander, P., Sivonen, K., Kononen, K., 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1647-1656.
- Li, R., Watanabe, M.M., 2001. Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. *Phytochemistry* 57, 727-731.
- Lincoln R, A., Strupinsky, K., Walker, J.M., 1996. The use of *Artemia nauplii* (Brine shrimp larvae) to detect toxic compounds from microalgal cultures. *Pharmaceutical Biology* 34, 384-389.
- Lokmer, A., 2004. Polyfázický přístup k taxonomii sinic řádu Oscillatoriales. Jihočeská Universita v Českých Budějovicích Bakalářská práce.
- Madigan, M.T., Mairs, B.L., 1997. Extremophiles. *Scientific American* 82-87.
- Margheri, M.C., Bosco, M., Giovannetti, I., Ventura, S., 1999. Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis. *FEMS. Microbiol. Lett.* 173, 9-16.
- Materassi, R., Rodolfi, L., Zittelli, C., Bassi, G., Padovani, N., Biondi, G., Bonini, N., Tredici, G., R., M., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 100-112.
- Mbedi S, Welker M, Fastner J, C, W., 2005. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 299-306.
- McCloskey, J.A., 1990. Mass spectrometry San Diego : Academic Press, 960 p.
- McLafferty, F., 1980. Interpretation of Mass Spectra. University Science Books, 100–101
- Metcalf, J.S., Lindsay, J., Beattie, K.A., Birmingham, S., Saker, M.L., Törökné, A.K., Codd, G.A., 2002. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* 40, 1115-1120.
- Moore, R.E., Patterson, G.M.L., Mynderse, J.S., Barchi, J., 1986. Toxins from cyanophytes belonging to the Scytonemataceae. *Pure & Appl. Chem* 58, 263—271.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Murakami, M., Sun, Q., Ishida, K., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K., 1997. Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26). *Phytochemistry* 45, 1197-1202.
- Nagatsu, A., Kajitani, H., Sakakibara, J., 1995. Muscoride A: a new oxazole peptide alkaloid from freshwater cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Tet Lett* 36, 4097–4100.
- Namikoshi, M., Choi, B.W., Sakai, R., Sun, F., Rinehart, K.L., Carmichael, W.W., Evans, W.R., Cruz, P., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., 1994. New nodularins, A general method for structure assignment. *J. Org. Chem* 59, 2349-2357.
- Namikoshi, M., Choi, B.W., Sun, F., Rinehart, K.L., 1993. Chemical Characterization and Toxicity of Dihydro Derivatives of Nodularin and Microcystin-LR, Potent Cyanobacterial Cyclic Peptide Hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 151-158.

- Nováková, L., Douša, M., kolektiv, 2013. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. I Europrint a.s., 299 pp.
- Oren, A., 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1895-1902.
- Paerl, H.W., Millie, D.F., 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* 35, 160-167.
- Patterson, G., Carmeli, S., 1992a. Biological effects of Tolytoxin (6-hydroxy-7-O-methyl-scytophycin b), a potent bioactive metabolite from cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 157, 406-410-410.
- Patterson, G., Smith, C., Kimura, L., Britton, B., Carmeli, S., 1993. Action of Tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motil Cytoskeleton* 24, 39-48.
- Patterson, G.M.L., Bolis, C.M., 1993a. Determination of Scytophycins in Cyanophyte Cultures by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid chromatography* 16, 475-486.
- Patterson, G.M.L., Bolis, C.M., 1993b. Regulation of scytophycin accumulation in cultures of *Scytonema ocellatum*. 1. Physical factors. *Appl. Microbiol. Biotech.* 40, 375-381.
- Patterson, G.M.L., Bolis, C.M., 1995. Regulation of scytophycin accumulation in cultures of *Scytonema ocellatum*. 2. Nutrient requirements. *Appl. Microbiol. Biotech* 43, 692-700.
- Patterson, G.M.L., Larsen, L.K., Moore, R.E., 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* 6, 151-157.
- Paul, V.J., 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs Advances in Experimental Medicine and Biology* 619, 239-257.
- Perron MC, Qiu B, Boucher N, Bellemare F, P., J., 2012. Use of chlorophyll a fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. *Toxicon.* 59(567-577).
- Ploutno, A., Carmeli, S., 2002. Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc* sp. . *Tetrahedron* 58, 9949-9957.
- Pluotno, A., Carmeli, S., 2005. Banyasin A and banyasides A and B, three novel modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron* 61, 575-583.
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P, Neilan, B.A., 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150, 455-461.
- Purdy, L.H., 1979 *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. *Phytopatology* 69, 875-880.
- Ranný, M., 1984. TLC-FID, nová technika kvantitativní chromatografie na tenké vrstvě *Academia* 123 pp.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S., 1997a. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *App. Environ. Microbiol.* 64, 2206 -2212.
- Rudi, K., Skulberg, O., Larsen, F., Jakobsen, K., 1997. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2593-2599.

- Santi, C., Bogusz, D., Franche, C., 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot* 111, 743-767.
- Setlík, I., Veladimir, S., Malek, I., 1970. Dual purpose open circulation units for large scale culture of algae in temperate zones. I. Basic design considerations and scheme of pilot plant. *Algolog. Studies* 1, 111-164.
- Shimizu, Y., 1996. Microalgal Metabolites: A new perspective. *Annual Review of Microbiology* 50, 431-465.
- Shulman, M, Wilde, C.D., Kohler G.G., 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276, 269-270.
- Shurin, J.B., Dodson, S.I., 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1269-1276.
- Schopf, J., Kudryavtsev, A., Agresti, D., Wdowiak, T., Czaja, A., 2002. Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* 416, 73–76.
- Schopf, J.W., Klein, C., 1992. *The Proterozoic Biosphere A Multidisciplinary Study*. Cambridge University Press
- Sivonen, K., 1990a. Effects of Light, Temperature, Nitrate, Orthophosphate, and Bacteria on Growth of and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains Applied And *Environmental Microbiology* 56, 2658-2666
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to Public health Significance. Monitoring and Management*. In: J. Bartram. London, 4-111.
- Skoog, D.A., kolektiv, 2007. *Principles of instrumental analysis Belmont: Thomson*, 1039 pp.
- Small, J.V., Rottner, K., Hahne, P., Anderson, K.I., 1999. Visualising the Actin Cytoskeleton. *Microscopy Research And Technique* 47, 3-17.
- Smith, C.D., Carmeli, S., Moore, R.E., Patterson G.M.L., 1993. Scytophycins, Novel Microfilament-depolymerizing Agents Which Circumvent P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance. *Cancer Res* March 15, 1343-1347
- Spector, I., Shochet, N., Kashman, Y., Groweiss, A., 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219, 493-495.
- Staub, R., 1961. Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie (Aquatic Sciences)* 23, 82-198.
- Strapasson, R.L.B., Cervi, A.C., Carvalho, J.E., Ruiz, A.L.T.G., Salvador, M.J., Stefanello, M.É.A., 2012. Bioactivity-guided Isolation of Cytotoxic Sesquiterpene Lactones of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. *Phytotherapy Research* 26, 1053-1056.
- Surakka, A., Sihvonen, L.M., Lehtimäki, J.M., Wahlsten, M., Vuorela, P., Sivonen, K., 2005. Benthic cyanobacteria from the Baltic Sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environmental Toxicology* 20, 285-292.
- Takeda, Y., Shi, J., Oikawa, M., Sasaki, M., 2008. Assignment of the Absolute Configuration of Goniiodomin A by NMR Spectroscopy and Synthesis of Model Compounds. *Organic Letters* 10, 1013-1016.

- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., Sakamoto, T., 2005. Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7327-7333.
- Tornabene, G., Bourne, T.F., Raziuddin, S., Ben-Amotz, A., 1985 Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales) *Mar. Ecol. hog. Ser.* 21, 121 -125.
- Tredici, M.R., Carlozzi, P., Zittelli, G.C., Materassi, R., 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* 38, 153-159.
- Tredici, M.R., R., M., 1992. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *Journal of Applied Phycology* 4, 221-231.
- Trimurtulu, G., Ohtani, I., Patterson, G.M.L., Moore, R.E., Corbett, T.H., Valeriote, F.A., Demchik, L., 1994. Total Structures of Cryptophycins, Potent Antitumor Depsipeptides from the Blue-Green-Alga *Nostoc Sp Strain Gsv-224*. *Journal of the American Chemical Society* 116, 4729-4737.
- Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Watanabe, M.F., Suzuki, S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Shimada, T., Harada, K., . 1994. A clean-up method for analysts of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicon.* 32, 1251-1259.
- Tsuji, K., Setsuda, S., Watanuki, T., Kondo, F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Harada, K.I., 1996. Microcystin levels during 1992-95 for Lakes Sagami and Tsukui-Japan. *Natural Toxins* 4, 189-194.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Yoshida, F., Suttajit, M., Mebs, D., Putsch, M., Vasconcelos, V., 1996. Survey of microcystins in environmental water by a highly sensitive immunoassay based on monoclonal antibody. *Natural Toxins* 4, 271-276.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 7-60.
- Vezie C, B.L., Sivonen K, Bertru G, Lefeuvre J-C, et al., 1998. Variation of Microcystin Content of Cyanobacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecology* 35, 126-135.
- Walker, S.K., Garrill, A., 2006. Actin microfilaments in fungi. *Mycologist* 20, 26-31.
- Wanga, G.-C., Wanga, Y., Williams, I.D., Sung, H.H.-Y., Zhanga, X.-Q., Zhanga, D.-M., Jianga, R.-W., Yao, X.-S., Ye, W.-C., 2009. Andrographolactone, a unique diterpene from *Andrographis paniculata*. *Tetrahedron Letters* 50, 4824-4826.
- Weise, G., Drews, G., Jann, B., Jann, K., 1970. Identification and Analysis of a Lipopolysaccharide in Cell Walls of the Blue-Green Alga *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology* 71, 80-98.
- Whitton, B.A., Potts, M., 2000. *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publ.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., Bhattacharya, D., 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 21, 809-818.
- Yuan, X., Xiao, S., Taylor, T.N., 2005. Lichen-Like Symbiosis 600 Million Years Ago. *Science* 308, 1017-1020.

Zelík, P., 2008. Kinetické studium inhibitorů acetylcholinesterasy produkovaných autotrofními mikroorganismy. Vysoké učení technické v Brně Disertační práce.

Zhang, L.H., Longley, R.E., Koehn, F.E., 1997. Antiproliferative and immunosuppressive properties of microcolin A, a marine-derived lipopeptide. *Life Sci* 60, 751-762.

Zhenga, G., Xua, R., Changa, X., Hiltb, S., Wua, C., 2013. Cyanobacteria can allelopathically inhibit submerged macrophytes: Effects of *Microcystis aeruginosa* extracts and exudates on *Potamogeton malaianus*. *Aquatic Botany* 109, 1-7.

Zwart, G., Crump, B.C., Kamst-van Agterveld, M.P., Hagen, F., Han, S.-K., 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 141-155.

9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Analysis and detection of the scytophycin variants by HPLC-ESI-MSⁿ.

J. Tomšíčková^{1,2}, M. Ondřej³, J. Černý⁴, P. Hrouzek², J. Kopecký²

¹ Institute of Plant and Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 370 05 České Budějovice, Czech Republic, jana.tomsickova@gmail.com

² Institute of Microbiology v. v. i., Academy of Sciences of the Czech Republic, 739 01 Třeboň, Czech Republic, last name@alga.cz

³ Agritech s.r.o., 787 01 Šumperk, Czech Republic

⁴ Faculty of Science, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic.

Introduction

A significant number of cyanobacteria possess interesting biological activities, including cytotoxic [1] and rarely fungicidal [2;3]. One of the most potent group of this are scytophycins, found in cyanobacteria of the family *Scytonemataceae* 30 years ago [4]. The best known representative of the scytophycin family, Tolytoxin (6-hydroxy-7-O-methylscytophycin B), was first isolated from a terrestrial blue-green alga *Tolypothrix*

conglutinata [5]. The genus *Nostoc* is a rich source of various bioactive metabolites, but scytophycins were never observed to be produced by this cyanobacterium.

In this study we apply LCMSⁿ instrumentation in order to extend its applicability for structural analysis of the scytophycin family members.

Results and Discussion

The crude 70% MetOH extract of the soil cyanobacterium *Nostoc sp.* 5/96 exhibited strong antifungal and cytotoxic activity. Activity guided fractionation led to a discovery of several active fractions ranging from 20 – 30 min. of the MetOH/H₂O gradient (Zorbax XBD C8, 46 x 150 mm, 5 μm). Eight peaks were detected in this region by ESI-MS in the positive mode (Fig. 1.). We deduced these ions can be sodium adducts of the scytophycin macrolides, which general structure is shown in a Table 1. Molecular ions were not intensive enough even after buffer adding but the interpretation of fragmentation of Na⁺ adducts was convincing equally.

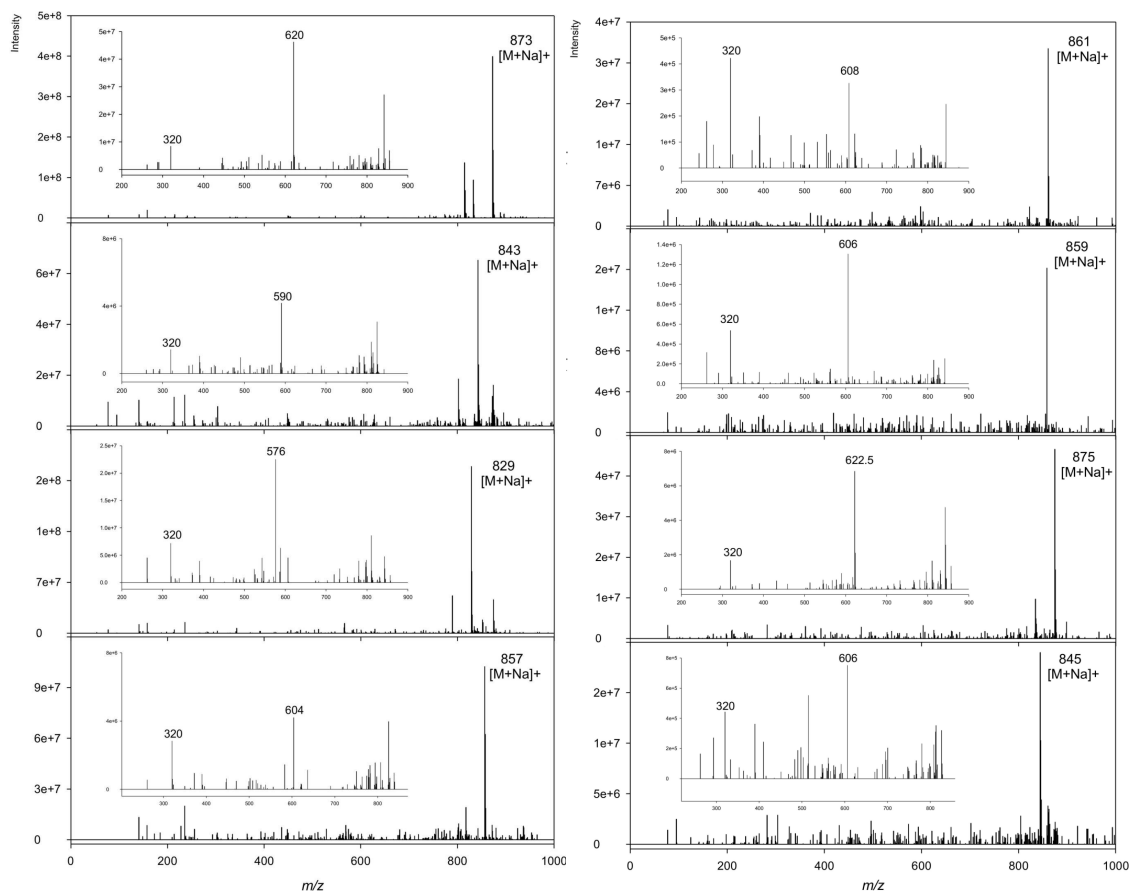
The C-6 and C-7 substituents were mainly responsible for the retention of particular scytophycins (Tab. 2.). Generally, methylation of hydroxyl groups increases retention time and more free hydroxyl groups lower the retention time. Retention also corresponds well with LogP values: for the scytophycin B family: -1.28, -0.42, 0.26, 1.04 and for the scytophycin D/E families: -0.66/-0.80, 0.20/0.06, 0.88/0.74 respectively. The values of LogP were calculated in the ACD Labs Software.

For distinguishing of several scytophycins of the same mass appeared in our sample (e.g. *m/z* 845, 843, 859, 875) MS/MS was necessary. Additionally, the shifting technique [6] was applied. Support in elucidating structure of the fragments was obtained by using of ACD/MS Fragmentor.

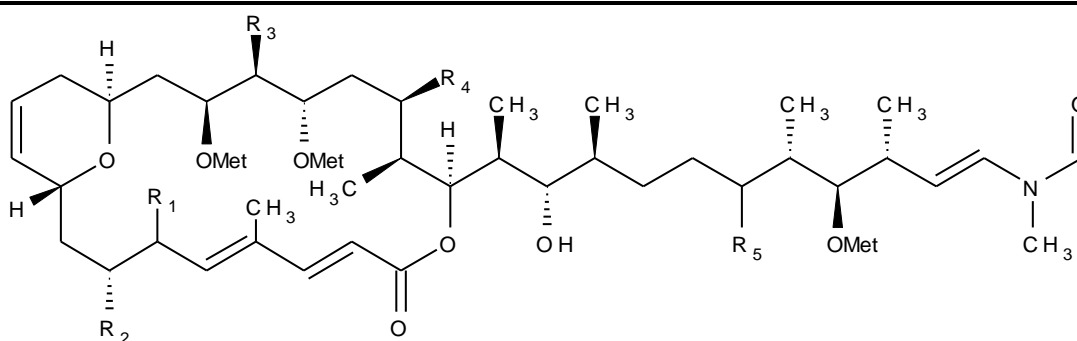
After the loss of water and demethoxylation CID leads to structurally significant product ions characteristic for the individual scytophycins core structure which differs in the substituent at C-6, C-7 and C-16 positions. Characteristic fragment pair *m/z* 320 and 262 (Tab 2.) was found as diagnostic ions for the identification of scytophycins in natural samples without the need of isolation or fractionation. The difference of 2 u of 6-OH-7-OMet-SC-D/E relative to 6-OH-7-OMet-SC-B reflects the modification on C-16 position. The latter diagnostic ions *m/z* 262 and *m/z* 264 are

produced by cleavage of the side chain in the C-32 position and loss of the 58 u from the terminal keton group according to Mc. Laffety rearrangement. The typical main fragments formation for the most abundant representative of 6-OH-7-OMet-SC-B (Tolytoxin) is demonstrated in a Table 3.

Fig. 1. The chromatograms of 8 scytophycins found in extract of *Nostoc sp. 5/96*. The collision induced spectra of major peaks are presented inside every chromatogram.



Tab. 1. General macrolide structure of studied compounds and basic scytophycin variants.



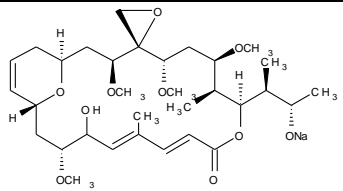
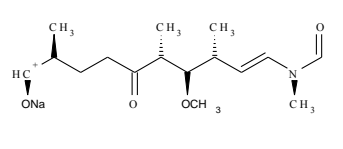
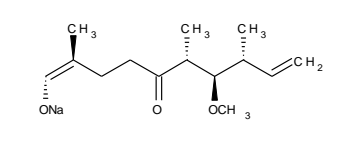
	SC-B	SC-C	SC-D	SC-E
R₁ (C-6)	H	H	H	H
R₂ (C-7)	OH	OH	OH	OH
R₃ (C-16)				
R₄ (C-19)	OMet	OMet	OMet	OMet
R₅ (C-27)				

Tab. 2. The main product ions of substances related to scytophycins obtained by CID experiments. The relative abundance of each product ion is shown in parentheses.

Compound	Formula	MW	t _R [min]	M+Na] ⁺	Diagnostic fragments (<i>m/z</i>)
6-OH-SC-D/E	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₃	838	25,2	861	843 (10), 608 (50), 320 (25), 262 (15)

6-OH-SC-B	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₃	836	26,0	859	841 (10), 606 (55), 320 (25), 262 (10)
6-OH-7-OMet-SC- -D/E	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₃	852	26,3	875	622 (45), 320 (20), 290 (10), 262 (15)
7-OMet-19-deMet- -SC-D/E	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₂	822	26,6	845	606 (50), 320 (25), 262 (15)
6-OH-7-OMet-SC-B	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₃	850	27,1	873	840,5 (40), 620 (55), 320 (25), 262 (15)
SC-B	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₂	820	27,6	843	825 (40), 620 (55), 320 (25), 262 (15)
SC-C	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₁	806	28,3	829	606 (55), 320 (25), 290 (10), 262 (15)
7-OMet-SC-B	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₂	834	29,9	857	620 (55), 320 (25), 262 (15)

Tab. 3. Identification of the main fragments for the most abundant 6-OH-7-OMet-SC-B (Tolytoxin).

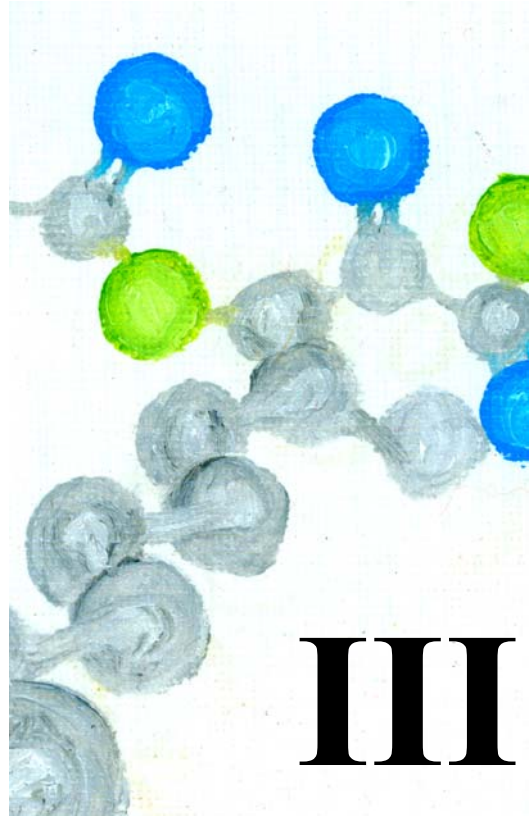
<i>Description of the fragment</i>	<i>Chemical structure of the fragment</i>
Fragment: <i>m/z</i> 620 , C ₃₂ H ₅₁ NaO ₁₀ , [M+H-C ₁₃ H ₂₀ O ₃] Na+	
Fragment: <i>m/z</i> 320 , C ₁₆ H ₂₇ NaO ₄ , [M+H - 30H ₄₈ O ₉] Na+	
Fragment: <i>m/z</i> 262 , C ₁₄ H ₂₃ NaO ₃ , [M+H - C ₃₂ H ₅₁ O ₁₀] Na+	

Acknowledgement

This study was carried out under the support Long-Term Research Plans of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic No. MSM0021620858, the Center for Algal Biotechnology - Algatech CZ.1.05/2.1.00/03.0110 and partially by the grant LH11129, MSMT.

References

- [1] P. Hrouzek, P. Tomek, A. Lukešová, J. Urban, L. Voloshko, B. Pushparaj, S. Ventura, J. Lukavský, D. Štys, J. Kopecký, *Environ. Tox.*, **26**, 345-358 (2011).
A. Surakka, L. M. Sihvonen, J. M. Lehtimäki, M. Wahlsten, P. Vuorela, K. Sivonen, *Environm. Toxicol.*, **20**, 285-292 (2005).
- [2] M. E. van Apeldoorn, H. P. van Egmond, G. J. A. Speijers, G. J. I. Bakker, *Mol. Nutr. & Food Res.*, **51**, 7-60 (2007).
- [3] R. Prasanna, L. Nain, R. Tripathi, V. Gupta, V. Chaudhary, S. Middha, M. Joshi, R. Ancha, B. D. Kaushik, *J. Basic Microbiol.*, **48**, 186-194 (2008).
- [4] R. E. Moore, G. M. L. Patterson, J. S. Mynderse, J. Barchi, *Pure & Appl. Chem*, **58**, 263-271 (1986).
- [5] M. Ishibashi, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, C. Xu, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **51**, 5300-5306 (1986).
- [6] F. McLafferty, *Interpretation of Mass Spectra*, University Science Books, USA (1980), 371 pp.



Hisem D., **Hrouzek P.**, Tomek P., Tomšíčková J., Zapomělová E., Skácelová K., Lukešová A. & Kopecký J.:

Cyanobacterial cytotoxicity to mammal cell lines versus toxicity to brine shrimp.

Toxicon (submitted)

Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*

Daniel Hisem^{1,2}, Pavel Hrouzek^{1,3,5*}, Petr Tomek^{1,4}, Jana Tomšičková^{1,2}, Eliška Zapomělová⁶, Kateřina Skácelová^{1,2}, Alena Lukešová⁷, Jiří Kopecký^{1,5}

¹*Institute of Microbiology, CAS, Department of Autotrophic Microorganisms, Opatovický mlýn, CZ-379 81 Třeboň, Czech Republic*

²*Department of Plant Physiology, University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic*

³*Department of Botany, University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic*

⁴*Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic*

⁵*Institute of Physical Biology, Zámek 136, CZ-37333, Nové Hrady, Czech Republic*

⁶*Biology Centre of AS CR, Institute of Hydrobiology, Na Sádkách 7, CZ-37005, České Budějovice, Czech Republic*

⁷*Biology Centre of AS CR, Institute of Soil Biology, Na Sádkách 7, CZ-37005, České Budějovice, Czech Republic*

Heterocytous cyanobacteria originating from different habitats have been screened for toxicity to brine shrimp *Artemia salina* and the murine lymphoblastic cell line Sp/2. Methanolic extracts of biomass and cultivation media were tested for toxicity and selected extracts were fractionated to determine the active fraction. We found a significant toxic effect to *Artemia salina* and Sp/2 cells in 5.2% and 31% of studied extracts, respectively. Only 8.6% of all tested strains were highly toxic to both *A. salina* and the Sp/2 cell line. Based on these data, we conclude that it is impossible to monitor cytotoxicity using only the brine shrimp bioassay, since cytotoxicity is a more frequent feature in comparison with toxicity to *A. salina*. It seems that in most cases the toxic effect of cyanobacterial secondary metabolites is targeted at some basal metabolic pathways present in eucaryotic cells rather than being a specific mechanism against a complex organism. Only in two of all tested strains was toxicity to *Artemia salina* recorded not accompanied to murine cell line toxicity. Moreover, in most of the selected strains exhibiting activity to *A. salina* and Sp/2 cells, the toxic effect to *Artemia salina* and Sp/2 cell line was caused by an identical fraction. These findings lead us to the conclusion that cyanobacterial metabolites can secondarily act as a defensive mechanism against grazing, although they are almost certainly not synthesized specifically against herbivores.

Keywords: secondary metabolites, brine shrimp bioassay, cytotoxicity, grazing, defense

1. Introduction

The toxicity of cyanobacterial secondary metabolites and their ecological implications has been widely studied over the last few years (e.g. Blom et al., 2006; Ferrao-Filho et al., 2000; Gademann and Portman, 2008; Lüring and Beekman, 2006; Sarnelle and Wilson, 2005; Wilson et al., 2006). Bioactive secondary metabolites were regarded as an evolutionary response to the pressure of competing organisms, such as fungi or grazers, when the genus *Nostoc* was studied (Dodds et al., 1995; Piccardi et al., 2000). This suggestion was then displaced, at least for cyanobacterial peptides, since their synthetic machinery was found to be much older than the evolutionary history of eukaryotic lineage (Rantala et al., 2004). However, the inhibitory or even lethal effects of cyanobacterial metabolites on invertebrates have been shown in numerous studies. For instance, the cyanobacterial peptides microviridin J and microcystin were found to be toxic to eukaryotic organisms such as *Daphnia pulicaria* and *D. galeata* (Rohrlack et al., 1999, 2004). Further, for some non-peptide compounds like cryptophycin, tolytoxin, calothrixins and pahayakolide, strong effects on invertebrates can be found (Berry et al., 2004; Biondi et al., 2004; Rohrlack et al., 1999, 2004, 2005; Agrawal et al., 2005). A direct link between production of di-(hydroxymethyl)dihydroxypiperidine (DMDP) and grazer pressure has been recorded in a periphytic *Cylindrospermum* sp. strain (Jüttner and Wessel, 2003). Thus a secondary function of cyanobacterial secondary metabolites as a defense mechanism against parasites and grazers is possible. However, there still remains the question as to whether the specific activity of cyanobacterial metabolites against invertebrate grazers has evolved by a long co-evolution of cyanobacteria and grazers, or whether these metabolites interact with the basal metabolism common to most organisms and thus their toxic effect is general.

While there has been much attention paid to the toxicity or digestive enzymes inhibition caused by planktonic cyanobacterial species (Agrawal et al., 2005; Blom et al., 2006; Jüttner and Wessel, 2003; Murakami et al., 1994, 1995; Rohrlack et al., 2004, 2005), few studies have dealt with cyanobacteria from soil and other habitats. Rohrlack et al. (2005) revealed that about 70 % out of 89 planktonic strains of the genus *Planktothrix* produce inhibitors of daphnid trypsin. A comparison of the toxicity of cyanobacteria from different habitats to the brine shrimp *Artemia salina* was made by Piccardi et al. (2000), who studied fifty cyanobacterial strains of the genus *Nostoc* originating from symbioses, the soil environment, and fresh and marine waters. There was a high number of symbiotic and soil strains toxic to *A. salina* compared to fresh or sea-water isolates. According to Falch et al.

(1995), 15 out of the 20 investigated cyanobacterial strains were toxic to *A. salina*. Most toxic were soil, subaerophytic and planktonic strains. A high number within the subaerophytic strains having toxicity is also supported by Jaki et al. (1999). Nevertheless, the toxicity of cyanobacterial strains from other different habitats can generally only be imagined since only a few strains have been studied so far.

For the screening of cyanobacterial toxicity to crustaceans, model organisms such as *Artemia salina* or *Daphnia* spp. are usually used. An *A. salina* assay has also been suggested as a valid method to evaluate the cytotoxic activity of plant extracts (Solis et al., 1993) and as a rapid preliminary screening for toxic cyanobacteria (Lahti et al., 1995). Some published data have suggested a good correlation between the activity in the brine shrimp assay and the cytotoxicity against some tumor cell lines (Anderson et al., 1991), as well as hepatotoxic activity (Kiviranta et al., 1991). The assay is therefore usually used as a low-cost and easily-achievable cytotoxicity test replacing cell lines assays (Piccardi et al., 2000). However, there are several studies from the last few years that present contrary results (Berry et al., 2004; Jaki et al., 1999; Mian et al., 2003).

In the present study, we compare the toxicity of 63 crude extracts of cyanobacteria originating from different habitats to *Artemia salina* and the murine cell line Sp/2 in order to answer the question whether a specific toxicity exists against crustacean grazers or whether the toxic effect is more general. Secondly, we wanted to compare *A. salina* mortality with cell line inhibition values to test the *Artemia salina* test as a substitution for the cytotoxicity assay.

2. Materials and methods

2.1 Cyanobacterial strains, cultivation and extract preparation

A total number of 63 different cyanobacteria were involved in this study: 57 cultured strains of various morphospecies and 6 field samples of *Nostoc commune*. The strains originated from various different habitats: soil (18 strains), plankton (30 strains), symbiotic associations (7 strains), periphytic (4 strains) and epiphytic strains (4 strains). Soil, symbiotic, periphytic and epiphytic strains were cultivated in Allen and Arnold medium (Arnon et al., 1974) in 300 mL cylindrical flasks, bubbled with CO₂ enriched air (2%) and illuminated with artificial light of PFD (photon flux density) of 280 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 2 to 4 weeks and harvested by centrifugation (4500 rpm, 15 min). Planktonic species of the genus *Anabaena* were cultivated in WC medium (Guillard and Lorenzen, 1972) in 250 mL

Erlenmeyer's flasks, illuminated with artificial light of intensity of PFD of $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 3 to 4 weeks. Biomass was harvested by centrifugation in 50 ml glass cuvettes (4500 rpm, 15 min), stored at -80°C and lyophilized. Cultivation medium was separated from biomass after centrifugation, 50 mL of it were filtrated using bacteriological filters (porosity $0.2 \mu\text{m}$) and a water-pump to obtain a cell-free medium. 200 mg of lyophilized biomass was transferred into 10 mL glass test tubes and extracted for 2 h using 70% methanol. The test tubes were centrifuged (4500 rpm, 15 min); the supernatant then transferred into an evaporating vessel and dried via a rotation vacuum evaporator. The solid extract was re-suspended in 1 mL of 70% MeOH to get the extract of concentration 200 mg of dry weight per millilitre. To obtain an extract from the medium, 50 mL of filtrated medium was concentrated into 2 mL 100% methanol using solid phase extraction (MCX Cartridge OASIS, Waters) and a vacuum-pump.

2.2 Artemia salina bioassay and cytotoxicity assay

The brine shrimp assay was done according to Lincoln et al. (1996). Cysts were incubated in artificial seawater illuminated by artificial light and gently aerated for 24 h (Metcalf et al., 2002). For toxicity tests, hatched nauplii were diluted to a concentration of 15-20 individuals mL^{-1} . 100 μL of extracts were transferred into a 12-well microtitre plate and were kept in a laminar box for methanol evaporation. 50 μL of distilled water was added and ultrasonified to improve dissolving of dry extract. 0.95 mL of nauplii (15-20 individuals) were added and numbers of living and dead individuals and unhatched cysts were counted using a stereomicroscope. Individuals were re-counted after 24 and 48 hrs and the percentage mortality calculated. Strains causing a mortality higher than 50% were considered as highly toxic.

Murine lymphoblastic cell line Sp/2 (kindly provided by Dr. Jan Kopecký, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Parasitology) was used for cytotoxicity testing. The cells were cultivated in RPMI 1640 medium with the addition of 5% fetal calf serum, 1% glutamine, and 1% antibiotic-antimycotic solution; all in plastic tissue culture flasks at 37°C . Prior to the experiments, cells were dyed with Trypan blue, in order to estimate viability, and counted in a Bürkers plate chamber in a light microscope. Only cell cultures with a higher viability than 90% were used for the experiment. The cell suspension was centrifuged (1000 rpm, 10 min, 4°C), and an adequate

amount of fresh RPMI medium was added in order to obtain a concentration of 1.5×10^5 cells per well (200 μ L RPMI).

Cyanobacterial extract of 10 μ L was added to the wells in triplicates, and triplicates treated only by 70% methanol were left as controls. The plate was kept in an incubator (37 °C) until the 70% methanol was evaporated; then the cell suspension was added and incubated (37 °C and 3.5% CO₂) for 12 h. Cell viability after exposure was estimated by MTT assay (Mosmann, 1983); 10 μ L of MTT solution (4 mg.mL⁻¹) was added and the plates were incubated for 4 h. The plates were centrifuged after the incubation (3000 rpm, 10 min) and the supernatant was removed. DMSO of 200 μ L was added to dissolve formazan crystals. Test and background absorbances were measured at 590 and 640 nm, respectively. The survival of cell lines was evaluated as the ratio of treated wells' absorbance to that of the control wells, and expressed as a percentage.

2.3 Extract analysis

Extract composition was analyzed using an HP 1100 Agilent mass spectrometer with an HP 100 MSD SL-Ion trap. The extract was subjected to separation on a reversed phase column (Zorbax XBD C8, 4.6 x 150 mm, 5 μ m) at 30 °C, and eluted by a gradient MeOH/H₂O + 1% HCOOH (30-100% MeOH for 30 min, 100% for 5 min) with a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. The obtained total ion chromatograms were evaluated and molecular ions were detected based on signal intensity, the presence of sodium and potassium adducts, and the distribution of isotopomeres.

2.4 Activity guided fractionation

Six strains were selected for activity-guided fractionation in order to find out which fraction was responsible for the toxic effect. The strains *Cylindrospermum* sp. C24/1989, *Nostoc* sp. 6/99, *Nostoc muscorum* 14/86 and *Nostoc* sp. 5/96 were fractionated using an analytical column, gradient and conditions as discussed above (see also supplementary information). In strains *Nostoc ellipsosporum* 51/91 and *Nostoc* sp. Ds1 the fractionation was performed using preparative HPLC (LabAlliance, Watrex, Prague) on a reverse phase column (C18 Reprosil100, 250x8mm, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH) and a modified gradient (see supplementary information). In these extracts the fractions were collected based on UV absorption in 237 and 220 nm for *Nostoc ellipsosporum* 51/91 and *Nostoc* sp. Ds1,

respectively. Finally, the collected fractions were evaporated and resuspended to obtain the concentration equivalent to the original extract and tested for toxicity to *A. salina* and Sp/2 as mentioned above.

3. Results

A total number of 63 cyanobacterial strains were included in the present study. The investigated cyanobacteria originated from four different habitats (plankton, soil, periphyton, and epiphytic communities), and besides these, strains originating from different symbiotic associations were also studied. For exact information about the origin and each strains' isolation see Table 1.

3.1 Toxicity of biomass extracts to *Artemia salina*

An overall toxicity causing mortality of *A. salina* $\geq 50\%$ was observed in 12.7% of biomass extracts. The highest occurrence of toxicity was found among strains originating from soil (22%). The most active soil isolates were *Nostoc* sp. 5/96 and *N. elliposporum* 51/91 that caused 100% mortality, followed by *Nostoc muscorum* 14/86 and *Nostoc commune* NC7 (65% and 64.3% inhibition, respectively). In *Cylindrospermum* sp. C24/89, *Nostoc* sp. 116/96 and *Nostoc* sp. 6/99, mortality slightly above 40% was found. A lower toxicity of 14% was recorded for the symbiotic strains. Nevertheless, the symbiotic strain *Nostoc* sp. Ds1 exhibited a very strong and fast toxic effect manifested by the death of all animals within 24 h. Only one toxic strain was found in both epiphytic and periphytic cyanobacteria; however, the low number of tested strains from these habitats (four from both habitats) did not allow relevant conclusions to be made. From these, the strain *Cylindrospermum* sp. Hrouzek 1/2004 isolated from leaves of water plants caused a strong toxic effect leading to a mortality of 100%. Out of 30 planktonic strains tested, only the strain *Anabaenopsis* cf. *elenkinii* Anaps OLE-03 caused a high mortality of *Artemia salina* (67%). Data are summarized in Figure 1. (Here, Figure 1 should be placed, width 90mm)

Table 1: List of studied cyanobacteria strains. Place of isolation, habitat, *A. salina* mortality (B – biomass, M – medium, + represents mortality $\geq 50\%$) and Sp/2 cell line inhibition is shown. Different habitats are marked by abbreviations: E (epiphytic), P (periphytic), S (soil), Sy (symbiotic) and Pl (planktonic).

Scientific name	Strain	Place of isolation	Habitat	<i>A. salina</i> mortality		Sp/2 inh.
				B	M	[%] mean
<i>Nostoc</i> sp.	BR III ^a	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	+	-	12*
<i>Nostoc</i> sp.	RQII ^a	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	-	7*
<i>Nostoc</i> sp.	BRIB ^a	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	n.a.	0*
<i>Nostoc</i> sp.	BROMEL ³	Paranapiacaba-Sao Paulo/Brazil	E	-	-	0*
<i>Nostoc</i> sp.	LC17S01	Alberta/Canada	P	-	-	27
<i>Nostoc</i> sp.	OSNI 32S01	Sitínový pond/Czech Republic	P	-	n.a.	0*
<i>Cylindrospermum</i> sp.	Hrouzek 1/2004	Zliv/Czech Republic	P	+	n.a.	100
<i>Calothrix</i> sp.	Hrouzek 2/2005	San Monoron-BUSRA/Cambodia	P	-	-	30
<i>Nostoc calcicola</i>	Lukešová 2/89 ^d	Havana/Cuba	S	-	-	6*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 5/96 ^d	Nezamyslice/Czech republic	S	+	-	52*
<i>Nostoc muscorum</i>	Lukešová 2/91 ^d	Nezamyslice/Czech republic	S	+	-	48*
<i>Cylindrospermum</i> sp.	C 24 ^d	Ellesmere island/Canada	S	-	-	60
<i>Trichormus variabilis</i>	ISB 13	Dlouhá Ves/Czech Republic	S	-	-	62,3
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 7/99 ^d	Germany	S	-	-	66*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 24/97 ^d	Germany	S	-	-	0*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 116/96 ^d	Sokolov/Czech republic	S	-	-	1*
<i>Nostoc</i> sp.	Lukešová 6/99 ^d	Germany	S	-	+	54*
<i>Nostoc</i> sp.	Cam2S01 ^c	Camerun	S	-	-	48*
<i>Nostoc ellipso sporum</i>	Lukešová 51/91 ^d	Nezamyslice/Czech republic	S	+	-	39*
<i>Nostoc commune</i>	NC1	Třeboň/Czech republic	S	-	-	70
<i>Nostoc commune</i>	NC2	Třeboň/Czech republic	S	-	-	12
<i>Nostoc commune</i>	NC3	Nové Hradý/Czech republic	S	-	+	0
<i>Nostoc commune</i>	NC4	Nové Hradý/Czech republic	S	-	-	40
<i>Nostoc commune</i>	NC 7	České Budějovice/Czech republic	S	+	n.a.	34
<i>Nostoc</i> sp.	NC 9	Rožnov p. R.Czech republic	S	-	n.a.	27
<i>Nostoc</i> sp.	OBU36S07 ^c	The Burren Clare/Ireland	S	-	-	42*
<i>Nostoc</i> sp.	CC2 ^c	greenhouse Pisa/Italy	Sy	-	-	30
<i>Nostoc</i> sp.	CR4 ^c	greenhouse Florence/Italy	Sy	-	-	5*
<i>Nostoc</i> sp.	De1 ^c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-	-	64*
<i>Nostoc</i> sp.	OGU 36S01 ^c	Achill Island/Ireland	Sy	-	-	31*
<i>Nostoc</i> sp.	Gm1 ^c	greenhouse Siena/Italy	Sy	-	+	14*
<i>Nostoc</i> sp.	Ds1 ^c	greenhouse Rome/Italy	Sy	+	-	54
<i>Nostoc</i> sp.	Mm1 ^c	greenhouse Rome/Italy	Sy	-	-	0
<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	04 06 ^b	Březová/Czech republic	Pl	-	-	n.a.
<i>Anabaena mendotae x sigmoidea</i>	04 12 ^b	Černíš/Czech republic	Pl	-	-	70
<i>A. compacta</i>	04 17 ^b	Dubnenský/Czech republic	Pl	-	-	67
<i>A. cf. curva</i>	04 19 ^b	Hejtman/Czech republic	Pl	-	-	n.a.
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 22 ^b	Husinec/Czech republic	Pl	-	+	50
<i>A. lemmermannii</i>	04 24 ^b	Husinec/Czech republic	Pl	-	-	13
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 26 ^b	Jesenice/Czech republic	Pl	-	+	46
<i>A. cf. circinalis</i>	04 28 ^b	Hodějovický/Czech republic	Pl	-	-	29
<i>A. lemmermannii</i>	04 33 ^b	Orlík/Czech republic	Pl	-	-	n.a.
<i>A. lemmermannii</i>	04 38 ^b	Senecký/Czech republic	Pl	-	-	17
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 40a ^b	Skalka/Czech republic	Pl	-	+	n.a.
<i>A. lemmermannii</i>	04 42 ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	57
<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>	04 43 ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	92
<i>Anabaena affinis</i>	04 44 ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	66
<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	04 45 ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	87
<i>A. cf. spiroides</i>	04 51 ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	62
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 52a ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	+	25
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 53 ^b	Švarcenberk/Czech republic	Pl	-	+	53
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 56 ^b	Vajgar/Czech republic	Pl	-	-	47
<i>A. cf. flos-aquae</i>	04 57 ^b	Vajgar/Czech republic	Pl	-	+	76
<i>A. circinalis x crassa</i>	04 59 ^b	Valcha/Czech republic	Pl	-	+	82
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i>	Anaps Plást 05 ^b	Plástovice/Czech republic	Pl	-	+	n.a.
<i>A. compacta</i>	Acom Pěšák 06 ^b	Pěšák/Czech republic	Pl	-	+	43
<i>A. compacta</i>	Acom Svět 06 ^b	Svět/Czech republic	Pl	-	-	2
<i>A. lemmermannii - morfotypS</i>	Alem Lipno 05 silná ^b	Lipno/Czech republic	Pl	-	-	33
<i>A. lemmermannii - morfotypT</i>	Alem Lipno 05 tenká ^b	Lipno/Czech republic	Pl	-	+	40
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i>	Anaps-Ole 03 ^b	Olekovice/Czech republic	Pl	+	+	92
<i>A. eucompacta x reniformis</i>	Anarenif Pěšák 2 ^b	Pěšák/Czech republic	Pl	-	+	77
<i>A. eucompacta x reniformis</i>	Anarenif Pěšák 4 ^b	Pěšák/Czech republic	Pl	-	+	90
<i>Anabaena affinis</i>	Staňk 05-11 ^b	Staňkovský/Czech republic	Pl	-	+	37

*Values of inhibition have been taken from Hrouzek et al., 2010

3.2 Toxicity of media extracts to *Artemia salina*

Media extracts were available for 58 strains out of the total number 63. Almost forty per cent (37.9%) of all tested media extracts exhibited significant toxicity against *Artemia salina*. This high number can be attributed to the frequent toxicity occurrence found in media of planktonic cyanobacteria (Fig. 1). In contrast to the low incidence of biomass toxicity in planktonic strains, 63.3% of their media extracts exhibited a significant toxic effect. Among these, *Anabaena lemmermanii* (100% inhibition), *Anabaena cf. spiroides* 04-51 (91% inhibition) and *Anabaena circinalis/crassa* 04-22 (86% mortality) caused the strongest effect. The incidence of media toxicity was much lower among cyanobacteria from other habitats: 11.1% in soil strains and 14.3% in symbiotic strains. The medium extract of the symbiotic strain *Nostoc* sp. Gm1 caused significant mortality of *Artemia salina* (50% inhibition) in contrast to its biomass extract with no effect. On the other hand, medium extract of the strain *Nostoc* sp. Ds1 lacked any effect in contrast to its biomass extract (see above). Soil strains *Nostoc commune* NC2 and NC3 exhibited significant medium toxicity (46 and 50%, respectively) with no inhibition found in their biomass extracts. No toxicity of a medium extract was found in epiphytic strains and cyanobacteria isolated from periphyton.

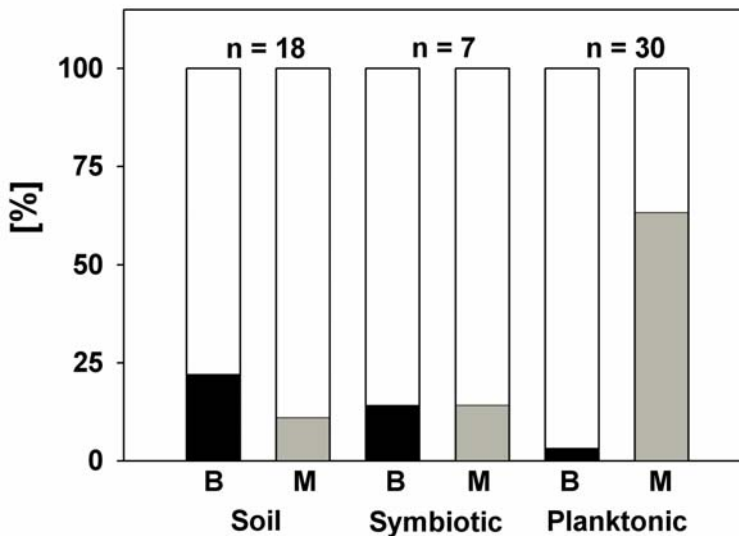


Figure 1: Percentage of biomass (B) and medium (M) extracts causing lethal effects to *Artemia salina* in strains isolated from soil, different symbiotic associations and plankton. Black and grey parts of columns indicate toxicity occurrence in biomass and media respectively, white parts of columns correspond to percentage of non-toxic extracts.

3.3 Comparison of *A. salina* mortality with Sp/2 cell line inhibition values

The percentage values of *A. salina* mortality (X-axis, Fig. 2) were compared with percentage inhibition values of Sp/2 cell line (Y-axis, Fig. 2) for each extract in order to find whether a correlation between cytotoxicity and toxicity to *Artemia salina* existed. We did not find any significant relationship between toxicity of biomass extracts to Sp/2 cell line and *Artemia salina* and such correlation was also rejected by the linear regression model ($R=0.1115$ $p=0.4047$). A high number of extracts (31% of all tested strains) were highly toxic to Sp/2 cell lines and nontoxic to *A. salina* (Fig. 2, area A), while only three strains were toxic to *A. salina* with no activity to the cell line (Fig. 2, area C). *Nostoc* sp. BR III exhibited strong toxicity to *Artemia* while having only a marginal effect to the cell line. In other strains belonging to area C (*Nostoc commune* NC7 and *Nostoc ellipsosporum* 51/91), strong activity to *Artemia* was found; however, it is accompanied by a moderate cytotoxic effect to Sp/2. The activity of strains *Nostoc* sp. Mm1 and *Nostoc* sp. 116/96 (area B) to *Artemia* was apparent; however, toxicity was slightly under the artificial threshold value 50%. In these strains, no effect to Sp/2 cell line was recorded. Other strains grouped in the area B of Figure 2 cannot be considered as significantly toxic due to their low toxic effect to both *A. salina* and Sp/2 cell line. (Here, Figure 2 should be placed, width 140mm)

Five of all the tested strains (*Cylindrospermum* sp. Hrouzek 1/2004, *Anabaenopsis* cf. *elenkinii* Anaps Ole-03, *N. muscorum* 14/86, *Nostoc* sp. Ds1 and *Nostoc* sp. 5/96) were found to cause strong damage to both *Artemia* and cell lines (area D). In *N. ellipsosporum* 51/91, 6/99, *Nostoc commune* NC7 and *Cylindrospermum* sp. C24/89, similar effects with inhibition values near the threshold value were found.

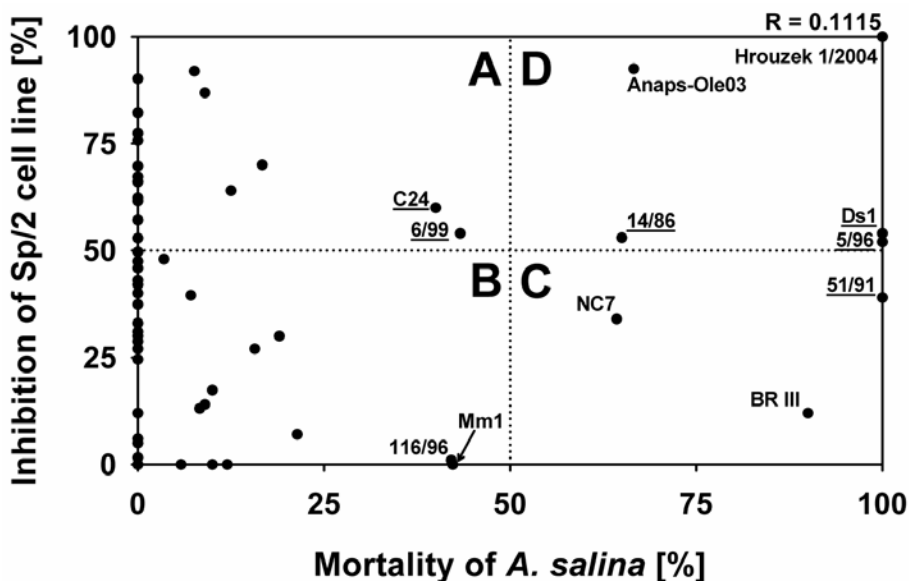


Figure 2: Comparison of effects of biomass extracts of studied strains on *A. salina* mortality and Sp/2 cells inhibition. The non-significant correlation of inhibition values in *A. salina* and Sp/2 cells is obvious from the graph ($R = 0.1068$, $p=0.4047$). The high number of strains toxic to Sp/2 cells with no activity to *A. salina* can be seen in Area B. By contrast, only a few extracts causing mortality to *A. salina* were not accompanied by a cytotoxic effect (Area C). The dotted lines represent the borders for both *A. salina* mortality and Sp/2 cell line inhibition values $\geq 50\%$. Extracts with an inhibition $\geq 50\%$ were considered strongly toxic. The names of considerably toxic strains are given. Underlined strains were selected for fractionation.

3.4 Fractionation of selected strains

Six selected strains were fractionated by analytical and preparative HPLC in order to detect their active compounds. Unfortunately, two strains exhibiting the highest toxicity to both *A. salina* and Sp/2 cells (*Cylindrospermum* 1/2004 and *Anabaenopsis* cf. *elenkinii* Anaps OLE-03), were not studied due to problems with their cultivation and the low amount of extracts obtained. The active fractions of the selected strains were further analyzed to find out their composition. Chromatograms and the active fractions causing toxic effects to Sp/2 cell line and *A. salina* are shown in Figures 3 and 4.

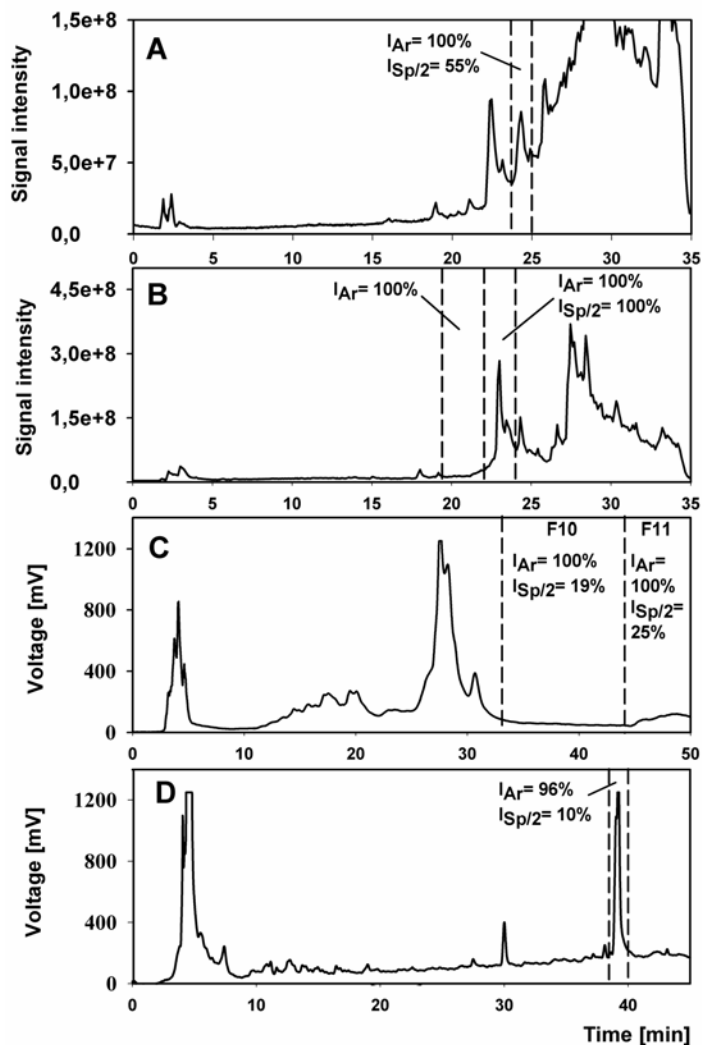


Figure 3: Chromatograms of cyanobacterial strains in which only one fraction toxic to both *A. salina* and Sp/2 cells was observed. The active fraction is marked by dashed lines and the inhibition values of these fractions to *A. salina* (I_{Ar}) and Sp/2 cells ($I_{Sp/2}$) are shown. **A:** *Cylindrospermum* sp. C 24/89 (Total ion chromatogram), **B:** *Nostoc* sp. 5/96 (Total ion chromatogram), **C:** *Nostoc elliposporum* 51/91 (UV absorption at 237 nm), **D:** *Nostoc* sp. Ds1 (UV absorption at 220 nm).

In four of the six studied strains, the toxicity to *Artemia salina* and Sp/2 cell line was caused by an identical fraction or compound (Fig. 3). The toxicity of *Cylindrospermum* sp. C24/89 to both *A. salina* and Sp/2 cells was caused by a compound collected between

23.5' and 25.0' of analytical gradient. Within its mass spectrum, ions corresponding to molecular ion 1146 $[M+H]^+$ and its sodium adduct 1168 $[M+Na]^+$ were detected. The toxicity of this compound was also proved in its pure state obtained by preparative HPLC. In the strain *Nostoc* sp. 5/96, activity in both tests was caused by a compound with a molecular weight of 849.6, which exerted a very strong (100%) inhibition to both *A. salina* and Sp/2 cell lines. Additionally, fraction 3 was also highly toxic to *A. salina* with a mortality of 100% in an extract of this strain. As with the previous two strains, in *Nostoc ellipsosporum* 51/91 toxicity to the murine cell line and *Artemia salina* was also caused by identical fractions. Fractions 10 and 11 with no UV absorption or clear peak in a total ion chromatogram were responsible for 100% mortality to *A. salina* in this strain and caused a moderate effect on the Sp/2 cell line (19 % and 25 % inhibition respectively). The strong toxic effect on *A. salina* was also observed for fraction 10 obtained from an extract of the strain *Nostoc* sp. Ds. The fraction was collected by preparative HPLC based on strong UV absorption at 220 nm and subsequent analysis proved the presence of a compound with a molecular weight of 460.1. The activity of this compound to Sp/2 cells was weak (10%); however, no other fractions of this extract exhibited an inhibition. Thus, it is possible that other components of the extract enhanced the inhibitory effect of this compound and the observed crude extract inhibition was therefore higher (54 %).

Different compounds were responsible for the toxicity to *A. salina* and Sp/2 in the strains *Nostoc muscorum* 14/86 and *Nostoc* sp. 6/99. In *Nostoc muscorum* 14/86, fraction 3 containing a compound of MW = 885.0 (886 $[M+H]^+$; 908 $[M+Na]^+$) caused 61.1% mortality to *A. salina*, whereas 79% inhibition of the Sp/2 cell line was caused by fraction 9 containing a novel cyclic peptide of MW = 1211 (1212 $[M+H]^+$; 1234 $[M+Na]^+$) (Hrouzek et al., 2010). In the second strain *Nostoc* sp. 6/99, fractions 2 and 5 containing compounds of MW = 1006.9 and 1076.1, respectively, exhibited a significant mortality to *A. salina* (Fig. 4). The cytotoxicity of this strain had been previously found to be caused by a fraction containing Nostopeptolide A1 (MW = 1081) (Golakoti et al., 2000; Hrouzek et al., 2010) and this result was confirmed by our study (Fig. 4).

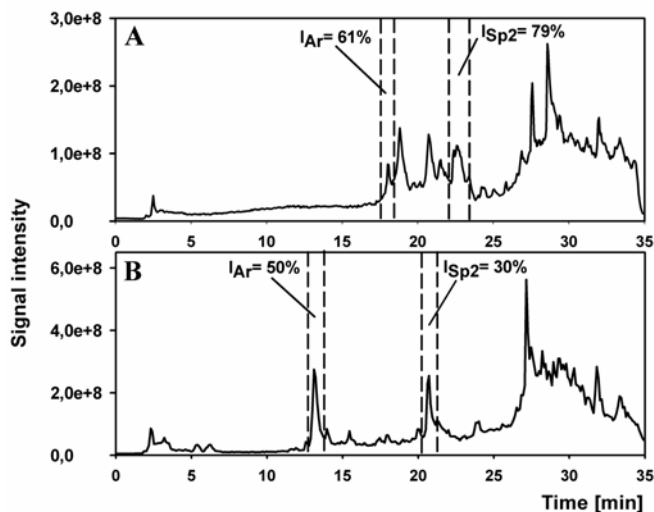


Figure 4: Chromatograms of cyanobacterial strains in which distinct fractions were found to have a toxic effect on *A. salina* and Sp/2 cells. Active fractions are marked by dashed lines and inhibition values of these fractions to *A. salina* (I_{Ar}) and Sp/2 cells ($I_{Sp/2}$) are shown. **A:** *Nostoc muscorum* 14/86 (Total ion chromatogram), **B:** *Nostoc* sp. 6/99 (Total ion chromatogram).

4. Discussion

Our data demonstrate that 12.7 % of the biomass extracts of all studied strains exerted a toxic effect on *A. salina*. This is in full accordance with Jaki et al. (1999) and Mian et al. (2003), who found toxicity to *A. salina* in 13.9 % and 9.1 % of strains, respectively. A slightly higher number of toxic strains (24 %) was reported by Piccardi et al. (2000) who studied the bioactivities of *Nostoc* strains. On the other hand, Falch et al. (1995) reported that 80 % of all strains were toxic when tested on *A. salina*; however, the strains included in the study were selected because they were previously reported to possess some pharmacological and biological effects, so the frequency of the reported toxic strains therein could be misleading. Based on all the facts above, it seems that the frequency of strains toxic to *A. salina* ranges between 10 to 25 %.

An *Artemia salina* toxicity assay has been suggested as a valid method to evaluate cytotoxic activity (Solis et al., 1993) and thus the method is commonly used as a substitute assay for the screening of cytotoxic compounds. However, Jaki et al. (1999), Mian et al. (2003), and also Berry et al. (2004), all found no correlation between *A. salina* mortality and cell lines inhibition values, and our data are in full accordance with their findings. Only 8.6

% of all tested strains were toxic to both *A. salina* and the Sp/2 cell line. By comparison, 31 % of all extracts exhibited a strong cytotoxic effect and did not cause any mortality to *A. salina*. This result suggests that cytotoxicity is a more frequently occurring feature among cyanobacteria than the toxicity to invertebrates.

The defence mechanisms of cyanobacteria, for example, the production of toxic secondary metabolites as a reaction to the presence of a potential grazer, belong to some of the important questions of cyanobacterial ecology. Many studies have proved the inhibitory effects of cyanobacterial secondary metabolites or extracts to invertebrates (Berry et al., 2004; Biondi et al., 2004; Rohrlack et al., 1999, 2004, 2005; Agrawal et al., 2005). One of the most important questions concerning cyanobacteria-grazer interactions is whether the metabolites synthesized by cyanobacteria are specifically against invertebrates or whether their effect is more general.

A comparison of cytotoxicity occurrence and number of extracts positive to *A. salina* indicates that in most cases the toxic effect is targeted to various basal metabolic pathways present in the eukaryotic cell rather than being a specific mechanism against a complex organism. This result is strongly supported by the fractionation of extracts found to be toxic both to *A. salina* and Sp/2 cell lines. In four of the six fractionated extracts the toxic effects were caused by an identical compound, suggesting that the mechanism of the function is probably the same for both the cell and the complex organism. The activity to *A. salina* that was not accompanied by inhibition of Sp/2 cells was only found in the fractions of strains *N. muscorum* 14/86 and *Nostoc* sp. 6/99 and in three raw extracts (Mm1, BRIII and 116/96). However, it is questionable whether the concentration of these compounds was sufficiently high to manifest the effect in the cells. Moreover, no particular compound toxic to *A. salina* was found in the strain *Nostoc* sp. BR III although the strain as a whole was found highly toxic to *Artemia*; the toxicity of this strain to Sp/2 cells was insignificant. So the mechanism of final toxicity of this extract to *A. salina* could be based on the synergic effect of many compounds present in the strain.

As a second issue concerning cyanobacterial-grazer interactions we tested if the differences in frequency of toxicity to *A. salina* existed among strains isolated from different habitats. For this purpose, mainly soil, planktonic and symbiotic strains were selected. The toxicity of biomass (intracellular) extracts was detected in 22 % of the 18 soil strains. This approximately corresponds to the results of Jaki et al. (1999) who found toxicity in 16.6 % of 30 studied soil strains. On the other hand, our results do not agree with data published by Mian et al. (2003) who did not find any toxic strain, and neither with data of Falch et al.

(1995) and Piccardi et al. (2000), who respectively observed toxicity in 83 % and 75 % of strains. However, Mian et al. (2003), Falch et al. (1995) and Piccardi et al. (2000) studied a low number (8, 12 and 8 resp.) of soil strains and thus reliable conclusions cannot be drawn. Only one out of 30 intracellular extracts (3.3 %) of our planktonic strains exerted a toxic effect to *A. salina*. Though they worked with a low number of strains, Mian et al. (2003) and Piccardi et al. (2000) published very similar results (0 % of toxic strains in both). The occurrence of toxic strains among symbiotic cyanobacteria was over 14 % in the present study, which is slightly lower compared to the results given by Piccardi et al. (2000), who observed toxicity in 6 out of 23 (26 %) studied strains.

As seen from our results the distribution of toxicity to *A. salina* was different in cultivation media (extracellular compounds). The overall occurrence of toxicity in media extracts was lower than in the biomass of soil, subaerophytic, epiphytic and periphytic cyanobacteria. No toxic medium extracts were found in epiphytic and periphytic strains and only a marginal occurrence of toxicity (14.3 % and 11.1 %) was observed in symbiotic and soil strains, respectively. By contrast, a high occurrence of toxic media extracts was found among planktonic strains. However, only one toxic intracellular extract from planktonic strains was found as discussed above. A similar extracellular production of inhibitory compounds was published by Jüttner and Wessel (2003), who found that all five studied strains of *Cylindrospermum* synthesized and excluded zooplankton glucosidases' inhibitor DMDP–di(hydroxymethyl) dihydroxypiperidine. The major part of DMPD (80 %) was found to be extracellular. Such a distribution of toxicity in intra- and extracellular extracts can have an easy explanation ecologically. The diffusion of toxins towards a grazer is easier in a planktonic environment compared with a soil environment, where the intracellular storage of compounds toxic to the grazer will be more efficient. Cyanobacteria with intracellular toxin production will be probably more successful in competition with other soil cyanobacteria and their frequency of occurrence in soils will be consequently higher, which is in accordance with our results. Our data have revealed that planktonic cyanobacteria produce, and are able to release, compounds toxic to *A. salina*. More than 63 % of media extracts of planktonic strains were found to be toxic to *A. salina*, whereas only one strain was found toxic among biomass extracts. In contrast, only 11.1 % of media extracts of all soil strains were toxic to *A. salina*.

Based on our results, we conclude that cyanobacterial secondary metabolites are not synthesized specifically against grazers but are highly toxic in general and interact with basal cell metabolism. However, they can play a role in the defensive mechanisms of

cyanobacteria against grazers and can be more frequent in habitats with a higher predation pressure. Regarding these results, it may not be possible to monitor cytotoxicity using only the brine shrimp bioassay, since cytotoxicity is more a frequent feature compared with the toxicity to *A. salina*.

Acknowledgement

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project FRVŠ no. 3491/2005 and MŠM 6007 665 808, MŠMT 1MO571; partly by MŠM 6007665801), Institutional Research Concept AVOZ50200510 and the Research plan of ISB AV0Z60660521. Partial financial assistance was provided by the Grant Agency of the Czech Republic (P504/10/1501). We gratefully thank Pavel Souček, Lada Samcová and Lucie Marková for their technical help and practical advice. We also thank Jan Kopecký from the Institute of Parasitology, the Biology Centre of the ASCR, who kindly provided the Sp/2 cell line.

References

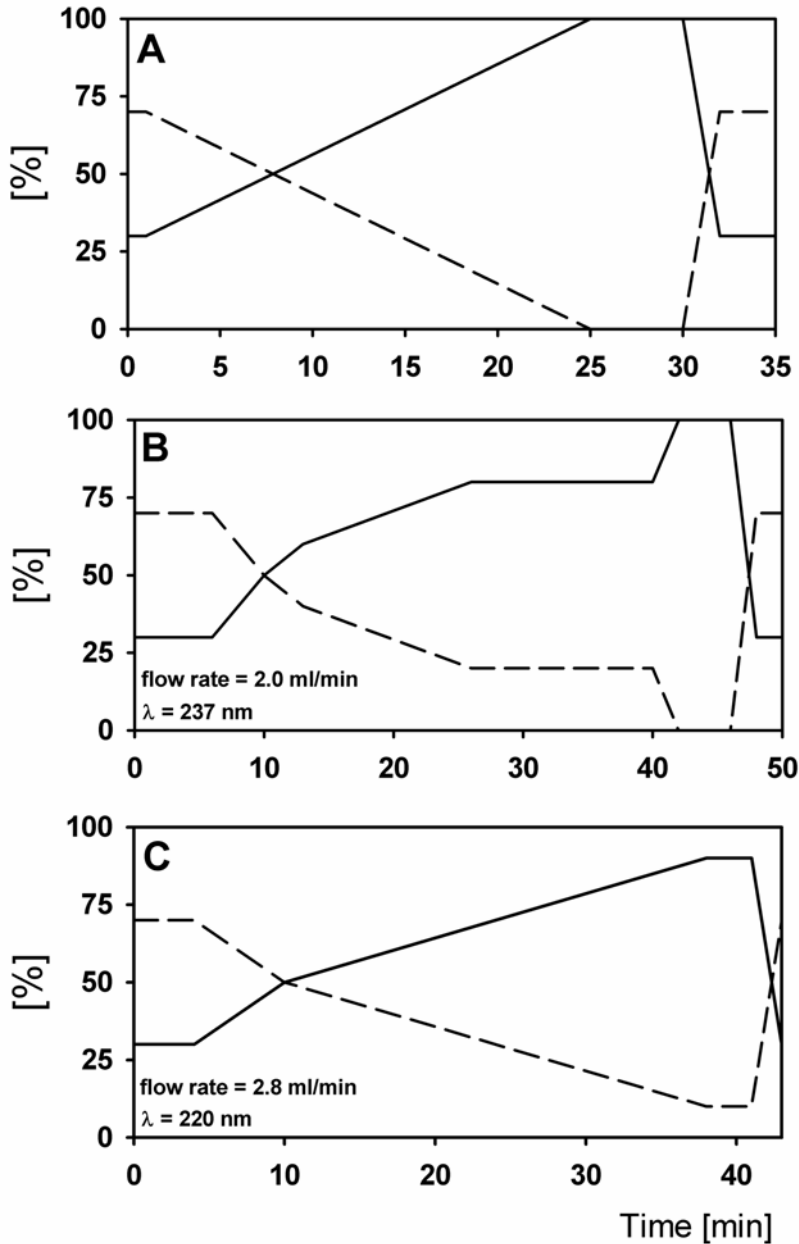
- Agrawal, M.K., Bagchi, D., Bagchi, S.N., 2005. Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comp. Biochem. Phys. B.* 141: 33-41.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L., Suffness, M., 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Anal. 2*, 107-111.
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y., Wada, K., 1974. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.* 357, 231-245.
- Berry, J.P., Gantar, M., Gawley, R.E., Wang, M., Rein, K.S., 2004. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 139, 231-238.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith, G.D., Tredici, M.R., 2004. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3313-3320.
- Blom, J.F., Baumann, H.I., Codd, G.A., Jüttner, F., 2006. Sensitivity and adaptation of aquatic organisms to oscillapeptin J and [D-Asp3, (E)-Dhb7]microcystin-RR. *Arch. Hydrobiol.* 167, 547-559.
- Dodds, W.K., Gudder, D.A., Mollenhauer, D., 1995. The ecology of *Nostoc*. *J. Phycol.* 31, 2-18.
- Falch, B.S., König, G.M., Wright, A.D., Sticher, O., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., Bachmann, H., 1995. Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Med.* 61, 321-328.
- Ferrão-Filho, A.S., Azavedo, S.M.F.O., DeMott, W.R., 2000. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshw. Biol.* 45, 1-19.
- Gademann, K. and Portman, C., 2008. Secondary metabolites from cyanobacteria: Complex structures and powerful bioactivities. *Curr. Org. Chem.* 12, 326-341.
- Golakoti, T., Yoshida, W.Y., Chagany, S. and Moore, R.E., 2000. Isolation and Structures of Nostopeptolides A1, A2 and A3 from the Cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV224. *Tetrahedron.* 56, 9093-9102.
- Guillard, R.R.L. and Lorenzen, C.L., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide C. *J. Phycol.* 8, 10-14.

- Hrouzek, P., Tomek, P., Lukešová, A., Urban J., Voloshko, L., Pushparaj, B., Lukavský, J., Štys, D., Kopecký, J., 2010. Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial *Nostoc* strains originating from different climatic/geographic regions and habitats: Is their cytotoxicity environmentally dependent? *Environ. Tox.* (In press).
- Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.R., Sticher, O., 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm. Biol.* 37, 138-143.
- Jüttner, F., Wessel, H.P., 2003. Isolation of di (hydroxymethyl) dihydroxypyrrolidine from the cyanobacterial genus *Cylindrospermum* that effectively inhibits digestive glucosidases of aquatic insects and crustacean grazers. *J. Phycol.* 39, 26-32.
- Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemelä, S.I., Huovinen, K., 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 423-436.
- Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapala, J., Sivonen, K., Niemela, S.I., 1995. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 109-114.
- Lincoln, R.D., Strupinski, K., Walker, J.M., 1996. The use of *Artemia* naupli (Brine shrimp larvae) to detect toxic compounds from microalgal cultures. *Pharm. Biol.* (formerly *Int. J. Pharmacog.*) 34, 384-389.
- Lürling, M. and Beekmann, W., 2006. Growth of *Daphnia magna* males and females fed with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the green alga *Scenedesmus obliquus* in different proportions. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 34, 375-382.
- Metcalf, J.S., Lindsay, J., Beattie, K.A., Birmingham, S., Saker, M.L., Törökne, A.K., Codd, G.A., 2002. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparison with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicol.* 40, 1115-1120.
- Mian, P., Heilmann, J., Bürgi, H.R., Sticher, O., 2003. Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm. Biol.* 41, 243-247.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
- Murakami M., Okita Y., Matsuda H., Okino T., Yamaguchi K., 1994. Aeruginosin 298-A, trombin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). *Tetrahedron Lett.* 35, 3129-3132.
- Murakami M., Ishida K., Okino T., Okita Y., Matsuda H., Yamaguchi K., 1995. Aeruginosins 98-A and B, trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98). *Tetrahedron Lett.* 36, 2785-2788.
- Piccardi, R., Frosini, A., Tredici, M.R. et Margheri, M.C., 2000. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *J. Appl. Phycol.* 12, 543-547.

- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K., 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. PNAS 101, 568-573.
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner, T., Kohl, J.G., 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 737–739.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M., and Neilan, B.A., 2004. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulex*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5047–5050.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Friberg-Jensen, U., 2005. Frequency of inhibitors of daphnid trypsin in the widely distributed cyanobacterial genus *Planktothrix*. Environ. Microbiol. 7, 1667-1669.
- Sarnelle, O. and Wilson, A.E., 2005. Local adaptation of *Daphnia pulex* to toxic cyanobacteria. Limnol. Oceanogr. 50, 1565-1570.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). Planta Med. 59, 250-252.
- Wilson, A.E., Sarnelle, O., Tillmans, A.R., 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta analyses of laboratory experiments. Limnol. Oceanogr. 51, 1915-1924.

Appendices

Supplementary data: Separation gradients used for fractionation of the six selected strains. Standard separation gradient used for fractionation of extracts from strains *Cylindrospermum* sp. C 24/1989, *Nostoc* sp. 5/96, *Nostoc muscorum* 14/86, *Nostoc* sp. 6/99. (A). Extracts from strains *Nostoc ellipsosporum* 51/91 and *Nostoc* sp. Ds1 was separated using gradients B and C, respectively. Percentage of methanol is marked by a solid line, water by a dashed line. Flow rate and monitored absorbance is shown in the lower left corner for B and C.



© for non-published parts Jana Tomšíčková

jana.tomsickova@centrum.cz

Fungicidní aktivita sinic rodu *Nostoc*
Ph.D. Thesis Series, 2013

All rights reserved
For non-commercial use only

University of South Bohemia in České Budějovice
Faculty of Science
Branišovská 31
CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

Phone: +420 387 772 244
www.prf.jcu.cz, e-mail: sekret@prf.jcu.cz