

## STRESZCZENIE

Termin "allelopatia" pochodzi od greckiego słowa *allelon* oznaczającego wzajemny i *pathos* znaczącego szkodliwy i został wprowadzony do nauki w 1937 roku przez austriackiego profesora Hansa Molischa (Molisch, 1937). Użył on pojęcia allelopatii do określenia wzajemnego oddziaływania pomiędzy organizmami roślinnymi poprzez wydzielanie związków chemicznych. Przez lata termin ten ewoluował, ponieważ autorzy znajdowali kolejne organizmy zdolne do oddziaływań allelopatycznych. Rice (1984) do tej definicji włączył mikroorganizmy i rozważył zarówno pozytywny, jak i negatywny efekt wydzielanych związków chemicznych na organizmy targetowe. Definicja allelopatii czasami zawiera również obronę przed drapieżnikami (Rizvi i Rizvi, 1992). Natomiast Inderjit i Dakshini (1994) wskazali, że aktywność allelopatyczna występuje również w środowisku wodnym także pomiędzy sinicami i mikroglonami. W 1996 roku International Allelopathy Society (IAS, 1996) ujednoliciło tę definicję, wskazując, że jest to każdy proces, w którym substancje chemiczne wydzielane przez organizmy oddziałują na rozwój innych gatunków roślinnych i zwierzęcych (Legrand i in., 2003). Metabolity, które są produkowane i wydzielane do środowiska naturalnego przez różne organizmy donorowe, zostały nazwane związkami allelopatycznymi (Leflaive i Ten-Hage, 2007).

Oddziaływania allelopatyczne pomiędzy gatunkami budującymi fitoplankton poprzez wydzielanie wtórnych metabolitów może odgrywać znaczącą rolę w środowisku wodnym (Margalef, 1958; Suikkanen i in., 2006). Skład a szczególnie biomasa fitoplanktonu ma podstawowe znaczenie dla funkcjonowania sieci troficznej ekosystemów wodnych. Wytwarzanie aktywnych związków organicznych jest ważną adaptacją, dzięki której niektóre gatunki sinic i mikroglonów mogą osiągać przewagę konkurencyjną nad pozostałymi producentami pierwotnymi (Legrand i in., 2003). Wiele badań wskazuje, że allelopatia może być istotnym czynnikiem wpływającym na formowanie się masowych zakwitów sinic i glonów w wielu słodkowodnych, brakicznych i morskich zbiornikach wodnych. Zjawisko szkodliwych zakwitów glonów w ostatnich dekadach wzrosło znacząco na świecie, a problem ten dotyczy zarówno ekosystemów słodkowodnych, jak i morskich (Smayda, 1990; Hallegraeff, 1993; van Dolah, 2000; Allen i in., 2006). Masowe pojawianie się prokariotycznych i eukariotycznych organizmów fitoplanktonowych przyczynia się do powstawania wielu problemów ekologicznych i ekonomicznych. Problemy te związane są przede wszystkim z pogorszeniem jakości wody, wzmożoną zachorowalnością i śmiertelnością organizmów roślinnych i zwierzęcych, w tym także człowieka oraz stratami finansowymi związanymi z rybołówstwem i turystyką (Anderson, 1989; Skulberg, 2000; Anderson i in., 2002; Stal i in., 2003; Granéli i Hansen, 2006). Negatywne konsekwencje powstawania

masowych zakwitów sinic i mikroglonów są silnym bodźcem do intensywnych badań zjawiska allelopatii (Reynolds, 1991).

Zakwity sinic w Morzu Bałtyckim są powszechnie notowane od XIX wieku, lecz w ostatnich dziesięcioleciach znacznie się nasiliły (Kahru i in., 1994; Stal i in., 2003). Jednym z najważniejszych gatunków sinic tworzących tutaj toksyczne zakwity jest nitkowata *Nodularia spumigena* (Kahru i in., 1994), co czyni z niej szczególnie interesujący obiekt badań. Natomiast mniej rozpoznane sinice pikoplanktonowe z rodzaju *Synechococcus* i *Synechocystis* mogą w Bałtyku stanowić nawet 80% całkowitej biomasy sinic i 50% całkowitej produkcji pierwotnej w letnim zakwicie (Stal i in., 2003; Jasser, 2006; Jodłowska i Śliwińska, 2014). Ponadto badania wykazały, że zarówno sinice *N. spumigena* (Suikkanen i in., 2004, 2005, 2006), jak i *Synechococcus* sp. (Śliwińska i Latała, 2011; Śliwińska i in., 2011; Śliwińska in., 2014a, b) wykazują aktywność allelopatyczną i mogą oddziaływać na otaczający je ekosystem. Zakwity sinic są często prawie monogatunkowe, co sugeruje na występowanie istotnego mechanizmu, który powoduje dużą przewagę tych gatunków nad innymi gatunkami fitoplanktonu. Dlatego głównym celem niniejszej pracy było określenie zakresu występowania zjawiska allelopatii oraz scharakteryzowanie działania związków allelopatycznych produkowanych przez bałtyckie sinice, często dominującą w okresie letnim, *Nodularia spumigena* oraz mniej poznaną, będącą jednak istotnym komponentem środowiska wodnego, pikoplanktonową sinicę *Synechococcus* sp. na wybrane gatunki mikroglonów i sinic. Ważnym zadaniem było też zbadanie czy i w jakim stopniu na oddziaływania allelopatyczne mają wpływ wybrane czynniki środowiskowe.

W doświadczeniach nad zjawiskiem allelopatii u analizowanych sinic została wykorzystana metoda „cross-culturing” (Suikkanen i in., 2004). W metodzie tej badania określające oddziaływania allelopatyczne były prowadzone przez dodanie do hodowli badanych organizmów targetowych przesączu uzyskanego z hodowli organizmów donorowych, czyli wybranych szczepów sinic będących w fazie logarytmicznego lub stacjonarnego wzrostu. Przesącz (V=2 ml) pochodził z przefiltrowanej kultury sinicy przez sączki z bibuły szklanej Whatman GF/C i był dodawany raz, na początku eksperymentu lub wielokrotnie do kolb Erlenmeyera o objętości 25 ml zawierających medium i testowane organizmy (V=20 ml). We wszystkich eksperymentach wyjściowe stężenie chlorofilu *a* w kulturach badanych sinic i mikroglonów wynosiło 0,8  $\mu\text{g chl } a \text{ ml}^{-1}$ . Hodowle kontrolne sporządzano analogicznie, ale zamiast przesączu dodawano samą pożywkę f/2 o objętości 2 ml. W przypadku doświadczeń z wielokrotnie dodawanym przesączem codziennie usuwano z każdej kolby po 2 ml zawiesiny komórkowej i dodawano równoważną ilość przesączu w hodowlach właściwych lub pożywki f/2 w hodowlach kontrolnych, w celu utrzymania stałej objętości hodowli przez cały czas trwania eksperymentu. Po 1, 3 i 7 dniach ekspozycji badanych

szczepów w hodolach określona była koncentracja komórek (patrz rozdz. 2.4), natomiast po 0 (oznaczającym 1 godz. ekspozycji), 1, 3 i 7 dniach ekspozycji była mierzona fluorescencja chlorofilu *a* oraz dodatkowo 7 dnia eksperymentu określano tempo wymiany gazowej zawiesiny komórek. Hodowle organizmów donorowych, czyli sinic, prowadzono odpowiednio na 3 poziomach: natężenia napromieniowania fotosyntetycznego (PAR) - 10, 100 i 190  $\mu\text{mol fotonów}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatury - 15, 20 i 25°C lub zawartości soli odżywczych - NP - pełny skład pożywki mineralnej f/2, czyli nadwyżka azotanów i fosforanów, -N - niedobór azotanów oraz -P - niedobór fosforanów. Hodowle właściwe organizmów targetowych prowadzono zawsze w takich samych warunkach, czyli natężeniu PAR 10  $\mu\text{mol fotonów}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperaturze 20°C i na pożywce f/2 o pełnym składzie. Każdy wariant doświadczenia prowadzono w trzech powtórzeniach, a wyniki z eksperymentów zostały przedstawione jako wartość średnia z trzech niezależnych pomiarów.

W niniejszej pracy udokumentowano po raz pierwszy oddziaływania allelopatyczne występujące u pikoplanktonowej sinicy *Synechococcus* sp., a także potwierdzono występowanie zjawiska allelopatii u większej, nitkowatej sinicy *N. spumigena*. Ponadto przeprowadzone badania pozwoliły na określenie zakresu występowania zjawiska allelopatii oraz sposobu działania związków allelopatycznych produkowanych przez te sinice na wybrane gatunki mikroglonów i sinic pod wpływem różnych czynników środowiskowych. Zasadność przeprowadzenia takich badań podyktowana była nielicznymi pracami podejmującymi temat oddziaływania allelopatycznego sinic w środowisku Morza Bałtyckiego.

W pracy wykazano, że wszystkie 3 analizowane szczepy pikoplanktonowej sinicy *Synechococcus* sp. wykazywały oddziaływanie allelopatyczne, jednakże obserwowany efekt nie był dla nich identyczny. Różnica w hamowaniu wzrostu pomiędzy najbardziej i najmniej aktywnym szczepem wniosła 18%. Ku zaskoczeniu stwierdzono, że toksyczna *N. spumigena* nie wykazywała oddziaływania allelopatycznego na *Synechococcus* sp., natomiast nieznana do dzisiaj z takiego oddziaływania pikoplanktonowa sinica negatywnie oddziaływała na *N. spumigena* powodując spadek jej wzrostu nawet o 67%. Udokumentowane i opisane po raz pierwszy oddziaływanie allelopatyczne występujące u pikoplanktonowej sinicy z rodzaju *Synechococcus* jest ważnym odkryciem, które może w części wyjaśnić możliwe przyczyny osiągnięcia przez ten organizm przewagi konkurencyjnej nad innymi gatunkami fitoplanktonu w wielu zbiornikach wodnych.

Na podstawie uzyskanych wyników zanotowano, że czynniki biotyczne miały wpływ na oddziaływanie allelopatyczne sinic, a obserwowany efekt był zależny od organizmu targetowego. Analizując efekt działania związków allelopatycznych sinic wykazano, że dodanie przesączu powodowało największe hamowanie wzrostu u zielenicy *C. vulgaris* i okrzemki *S. marinoi*.

Nieznacznym wpływem oddziaływania allelopatycznego sinic został zanotowany u okrzemki *B. paxillifer*, natomiast zielenica *O. submarina* była praktycznie niewrażliwa na zadany przesącz komórkowy. Różny efekt działania związków allelopatycznych u różnych organizmów targetowych może być związany rozmiarem organizmu targetowego. Badania wykazały, że małe komórki organizmów eukariotycznych były bardziej wrażliwe niż organizmy, które osiągały większe rozmiary. Ponadto odporność niektórych gatunków zielenic i sinic może świadczyć o różnej przepuszczalności ich błon komórkowych lub wykształceniu mechanizmów ochronnych przed związkami allelopatycznymi innych sinic, które występują w tym samym środowisku. Z kolei duża wrażliwość okrzemek może być spowodowana faktem, że organizmy te nie wykształciły mechanizmów chroniących je przed wtórnymi metabolitami produkowanymi przez organizmy, które nie występują w tym samym czasie w danym ekosystemie wodnym. W pracy wykazano, że oddziaływanie allelopatyczne dwóch analizowanych bałtyckich sinic na organizmy targetowe było zbliżone. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń zanotowano, że intensywność efektu allelopatycznego różniła się jedynie w zależności od organizmu donorowego. W pracy zanotowano, że generalnie sinica *Synechococcus* sp. w zależności od badanych czynników biotycznych i abiotycznych miała większy wpływ na *C. vulgaris* niż *N. spumigena*. Z kolei *N. spumigena* powodowała największe zahamowanie wzrostu u okrzemki *S. marinoi*. Ten różny efekt oddziaływania gatunków donorowych na targetowe, jak również zmienna odporność gatunków targetowych może mieć znaczenie dla zjawiska sukcesji sinic i mikroglonów w zbiornikach wodnych. Niniejsza praca pozwoliła także na określenie oddziaływań allelopatycznych w zależności od stanu fizjologicznego badanych sinic oraz w zależności od ilości dodawanego przesączu komórkowego. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że sinice będące w fazie logarymicznego wzrostu zdolne były do aktywnego wydzielania związków allelopatycznych, które wpływały na badane organizmy targetowe. Natomiast przesącz pochodzący z sinic będących w fazie stacjonarnego wzrostu zasadniczo nie miał wpływu na badane mikroglony i sinice. Ponadto w pracy zanotowano, że obserwowany efekt działania związków allelopatycznych zależał od częstotliwości dodawanego przesączu do organizmów targetowych. W większości zanotowanych przypadków, wielokrotne dodanie przesączu miało większy wpływ na organizmy targetowe, niż przesącz dodawany raz, na początku eksperymentu. Natomiast u organizmów, które były najbardziej odporne na oddziaływanie allelopatyczne sinic, zanotowano podobny efekt działania związków allelopatycznych, niezależnie od sposobu dodawanego przesączu. Dowodzi to, że w celu dokładniejszego poznania oddziaływań allelopatycznych na organizmy targetowe powinno się przeprowadzać i porównywać ze sobą eksperymenty z pojedynczym i wielokrotnym dodaniem przesączu, uzyskanym z wybranych sinic będących w różnych fazach wzrostu, ponieważ

obserwowane efekty mogą się znacznie od siebie różnić.

W pracy wykazano, że czynniki abiotyczne wpływają na oddziaływanie allelopatyczne bałtyckich sinic. W pracy zaobserwowano, że największe oddziaływanie allelopatyczne występowało po dodaniu przesączu z sinic przetrzymywanych w najwyższym zadanym świetle, najwyższej temperaturze i przy nadwyżce składników pokarmowych. Ponadto w wśród wymienionych czynników abiotycznych, natężenie światła miało generalnie największy wpływ na produkowanie związków allelopatycznych przez bałtyckie *Synechococcus* sp. i *N. spumigena*. Stwierdzono na przykład, że dodanie przesączu z *N. spumigena* hodowanej w  $10 \mu\text{mol fotonów}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , ograniczało liczebność komórek *S. marinoi* o 58%, natomiast z hodowli w  $190 \mu\text{mol fotonów}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aż o 82%. Na podstawie uzyskanych wyników zanotowano, że badane sinice wykazywały najwyższą produkcję związków allelopatycznych w warunkach zapewniających ich aktywny wzrost. Badania pozwoliły na określenie zakresu tolerancji i wrażliwości analizowanych organizmów na związki allelopatyczne produkowane przez sinice rosnące w warunkach bardziej optymalnych, jak i bardziej stresowych, które nawiązują do tych, występujących w Morzu Bałtyckim w okresie letnim.

W niniejszej pracy zanotowano, że oddziaływanie allelopatyczne sinic wpływało na liczebność komórek w hodowlach, a obserwowany efekt zależał od badanego organizmu i czasu ekspozycji. Wykazano, że przesącz uzyskany z bałtyckich sinic zazwyczaj najbardziej hamował wzrost analizowanych organizmów targetowych po tygodniu trwania eksperymentu, a najbardziej wrażliwym gatunkiem była okrzemka *S. marinoi*. Po dodaniu przesączu z hodowli *N. spumigena* jej wzrost stanowił tylko 18% kontroli.. Doświadczenia z dodaniem przesączu uzyskanym z kultur sinic wykazały istotny hamujący wpływ na liczebność badanych komórek w hodowlach zielenicy *C. vulgaris* i okrzemek *S. marinoi* i *B. paxillifer*, natomiast nie miały wpływu na zielenicę *O. submarina*. Z kolei analizując wzajemne oddziaływanie allelopatyczne sinic wykazano, że pikoplanktonowe sinice hamowały wzrost *N. spumigena*, natomiast same nie wykazywały wrażliwości na zadany przesącz komórkowy *N. spumigena*. Zdolność badanych bałtyckich sinic do produkowania i wydzielania związków allelopatycznych, które powodują hamowanie wzrostu poszczególnych mikroglonów i sinic może świadczyć o przewadze konkurencyjnej *Synechococcus* sp. i *N. spumigena* nad innymi producentami pierwotnymi w zbiornikach wodnych. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, że oddziaływanie allelopatyczne sinic wpływało na wartości fluorescencji chlorofilu *a* i parametr  $F_v/F_m$  u badanych organizmów. Przeprowadzone doświadczenia z dodaniem przesączu wykazały, że wartość parametru fluorescencji zależała od badanego szczepu zarówno sinic, jak i organizmów targetowych. U badanych organizmów

targetowych spadek wartości parametru  $F_v/F_m$  był zazwyczaj notowany w hodowlach szybciej, niż hamowanie wzrostu komórek. Największy jego spadek zanotowano dla *S. marinoi*, dla której odpowiedź po dodaniu przesączu z *Synechococcus* sp. wyniosła 14% kontroli. Pomiar fluorescencji chlorofilu *a* umożliwiły badanie przebiegu zjawisk zachodzących w obrębie II fotosystemu spowodowanych oddziaływaniem allelopatycznym analizowanych sinic. Dzięki temu uzyskano szczegółowe informacje na temat efektywności procesu fotosyntezy badanych organizmów targetowych. W przedstawionej pracy zaobserwowano również, że oddziaływanie allelopatyczne wpływa na przebieg krzywych świetlnych P-E oraz parametry charakteryzujące tempo wymiany gazowej u wybranych organizmów targetowych. Wykazano, że dodanie przesączu z sinic wpływało na niższe wartości parametru  $P_m$ , natomiast nie powodowało zmian parametru  $\alpha$  u badanych organizmów targetowych. Fotosynteza maksymalna była np. istotnie ograniczona u okrzemki *S. marinoi* o 42% i 41% w zależności od tego, czy dodawany przesącz pochodził z *Synechococcus* sp. czy *N. spumigena*. Obok klasycznego podejścia, jakim było badanie oddziaływań allelopatycznych poprzez analizę zmian liczebności komórek w hodowli, zastosowanie dwóch dodatkowych metod, czyli pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* oraz tempa fotosyntezy, istotnie wzbogaciło nasze rozumienie mechanizmów działania związków allelopatycznych sinic.

Uzyskane wyniki badań stanowią zatem istotny wkład w stan wiedzy na temat zjawiska allelopatii bałtyckich sinic, które nie były tak szczegółowo badane pod kątem oddziaływania allelopatycznego, a które powszechnie znane są z odgrywania znaczącej roli w fitoplanktonie. W przeprowadzonych badaniach udokumentowano zdolność oddziaływania allelopatycznego dwóch gatunków bałtyckich sinic *Synechococcus* sp. i *N. spumigena* na wybrane mikroglony oraz określono wzajemne oddziaływanie allelopatyczne pomiędzy badanymi sinicami. W pracy ponadto przedstawiono sposoby działania związków allelopatycznych produkowanych przez bałtyckie sinice na organizmy targetowe pod wpływem różnych czynników biotycznych i abiotycznych. Chcąc lepiej ocenić znaczenie zjawiska allelopatii w zbiornikach wodnych, potrzebne są dalsze badania czynników środowiskowych, które wpływają na produkowanie i wydzielanie aktywnych związków allelopatycznych przez sinice oraz głębsze poznanie mechanizmów ich oddziaływania na otaczający je ekosystem. Dostarczenie nowych informacji na temat sposobu i zakresu oddziaływania allelopatycznego sinic na mikroglony może mieć bardzo ważne znaczenie dla pełniejszego zrozumienia nasilającego się na całym świecie zjawiska pojawiania się masowych zakwitów sinic w ekosystemach wodnych, w tym również w Morzu Bałtyckim.