

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Ekologii i Ochrony Środowiska

Aleksandra Grażyna Jaskulska

**Cyjanofagi i ich rola w regulacji występowania sinicowych
zakwitów wody**

Cyanophages and their role in the regulation
of cyanobacterial blooms

Praca doktorska

Wykonana w Katedrze UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej
we współpracy z Europejskim Regionalnym Centrum Ekohydrologii PAN

Pod kierunkiem

Prof. dr hab. Joanny Mankiewicz-Boczek

 Łódź, 2021

Streszczenie

Sinice (cyjanobakterie) to grupa organizmów prokariotycznych, które istnieją najprawdopodobniej od ponad 3,5 miliarda lat. W tym czasie wykształciły liczne mechanizmy adaptacyjne pozwalające im zasiedlać skrajnie różne ekosystemy wodne oraz dające im przewagę konkurencyjną nad innymi organizmami eukariotycznymi wchodzącymi w skład fitoplanktonu. W świetle zmian klimatycznych sprzyjających globalnemu ociepleniu, wraz ze wzrostem ilości zanieczyszczeń biogennych pochodzenia antropogenicznego oraz wzrostem emisji CO₂ – zwiększa się również udział cyjanobakterii w powierzchniowych zakwitach wody. Tym samym sinice wpływają na intensyfikację problemu eutrofizacji wód słono- oraz słodkowodnych. Ponadto ich zdolność do wytwarzania toksycznych metabolitów wtórnych – cyjanotosyn stanowi poważne zagrożenie dla ekosystemów wodnych oraz człowieka.

Biologicznie czynnymi cząstkami, zdolnymi do infekcji sinic są wirusy – cyjanofagi. Uważa się, że są one ważnym czynnikiem determinującym różnorodność genetyczną oraz rozwój populacji cyjanobakterii. Ponadto, cyjanofagi poprzez proces degradacji komórek swoich gospodarzy mogą odgrywać ważną rolę w cyklu biogeochemicznym środowiska wodnego. Pierwsze doniesienia na temat cyjanofagów pochodzą już z lat 60. Jednakże, mimo kilkudziesięciu lat badań nad tymi wirusami, najwięcej informacji na ich temat udało się zgromadzić na podstawie badań prowadzonych dla środowiska słonowodnego, które jest o wiele bardziej homogeniczne niż zróżnicowane ekosystemy słodkowodne. Dotychczasowe badania filogenetyczne słodkowodnych wirusów sinicowych wykazały, że różnią się one zarówno ewolucyjnie jak i genetycznie od swoich morskich odpowiedników. Jednym z narzędzi wykorzystywanych do detekcji, identyfikacji, analiz ilościowych i filogenetycznych cyjanofagów są tzw. markery molekularne tj. specyficzne dla nich geny - wśród nich można wyróżnić pomocnicze geny metaboliczne np.: *psbA* i *nblA* oraz geny strukturalne tak jak gen *g91*.

W związku z powyższym przedstawiona praca doktorska miała na celu analizę jakościową i ilościową występowania słodkowodnych cyjanofagów oraz sinic (z uwzględnieniem ich genotypów toksynogennych odpowiedzialnych za produkcję mikrocytyn) w Zbiorniku Sulejowskim oraz Zbiorniku Jeziorsko przy użyciu wybranych genów markerowych, w tym analizę wpływu parametrów fizyko-chemicznych i hydrologicznych badanych zbiorników. Ponadto przeprowadzono ocenę obecności cyjanofagów w wodach polskich i litewskich (geny: *psbA*, *nblA* oraz gen *g91*), z uwzględnieniem wpływu takich parametrów biotycznych i abiotycznych jak struktura gatunkowa i biomasa sinic, podstawowe parametry fizyko-chemiczne wody oraz dystans geograficzny. Przeanalizowano także aktywność transkrypcji cyjanofagów specyficznych względem sinic z rodzaju *Microcystis* w cyklu dobowym z udziałem genu *g91* (cyjanofagi) oraz genu 16S rRNA (sinice) w Zbiorniku Jeziorsko i Zbiorniku Sulejowskim.

Pozyskane wyniki wykazały, iż cyjanofagi, specyficzne m.in. względem sinic z rodzaju *Microcystis* oraz sinic z rodzaju *Synechococcus* były obecne w badanych, po raz pierwszy pod tym kątem,

słodkowodnych jeziorach Polski oraz Litwy. Zostało to również potwierdzone na podstawie znacznego podobieństwa fragmentów genów fagów: *psbA* i *nblA* oraz *g91*, dostępnych w bazie GenBank. Z kolei podczas kilkuletnich analiz sezonowej dynamiki występowania cyjanofagów, infekujących sinice z rodzaju *Microcystis* (z uwzględnieniem ich genotypów toksynogennych), wykazano, że pojawiały się one równocześnie lub po pojawieniu się sinic i w większości monitorowanych okresów – występowały ze swoimi gospodarzami w zbiornikach Sulejowskim oraz Jeziorsko. Jednakże, w powyższych badaniach zaobserwowano również zjawisko o charakterze „killing the winner”, podczas których to okresów następowało załamanie dynamiki występowania sinic tworzących zakwit – ich nagły spadek, połączony z szybkim wzrostem ilości cyjanofagów. W przypadku analizy wpływu parametrów biotycznych oraz abiotycznych na występowanie cyjanofagów wykazano, że:

1. Całkowity skład sinic wyrażony poprzez ich biomasę korzystnie wpływał na zwiększenie wykrywalności cyjanofagów;
2. Czynniki fizyko-chemiczne takie jak: TP, przewodność i pH były ważnymi parametrami środowiskowymi różnicującymi jeziora Polski oraz Litwy, które mogły bezpośrednio lub pośrednio (poprzez gospodarza - sinice) wpływać na występowanie cyjanofagów;
3. Dodatkowo wpływ hydrologii monitorowanych zbiorników zaporowych - zwiększony czas retencji wody, sprzyjał wzrostowi infekcji fagowych względem sinic z rodzaju *Microcystis*.

Natomiast, biorąc pod uwagę monitoring dobowych zmian w dynamice występowania sinic z rodzaju *Microcystis* i swoistych dla nich cyjanofagów, na podstawie analizy zmian ilościowych transkryptu genu *g91* cyjanofagów w ciągu doby, zaobserwowano, że proces transkrypcji przebiegał intensywniej w godzinach dziennych (08:00-16:00), co sugeruje, że cykl światła wpływa pośrednio lub bezpośrednio na replikację wirusową w komórkach ich gospodarza.


mgr Aleksandra Jaskulska

Katedra UNESCO Ekohydrologii
i Ekologii Stosowanej

Abstract

Cyanobacteria are a group of prokaryotic organisms that have probably existed for more than 3.5 billion years. During this time, they have developed numerous adaptive mechanisms that allow them to inhabit extremely diverse aquatic ecosystems and give them a competitive advantage over other eukaryotic organisms of phytoplankton. Due to climatic changes favoring global warming, the increase of biotic pollutants of anthropogenic origin, and CO₂ emission, cyanobacteria's contribution to surface water blooms is also increasing. Thus, cyanobacteria impact the problem of saltwater and freshwater eutrophication. Moreover, their ability to produce toxic secondary metabolites (cyanotoxins) poses a severe threat to aquatic ecosystems and humans.

Cyanophages (viruses) are biologically active particles capable of infecting cyanobacteria. They are considered to be an essential factor determining the genetic diversity and development of cyanobacterial populations. Moreover, through the process of degradation of their host cells, cyanophages may play an important role in the biogeochemical cycle of the aquatic environment. The first reports on cyanophages date back to the 1960s. However, despite decades of research on these viruses, most information has been gathered from studies conducted for saltwater environments, which are much more homogeneous than diverse freshwater ecosystems. Previous phylogenetic analyses of freshwater cyanobacterial viruses have shown that they differ evolutionarily and genetically from their marine counterparts. One of the tools used for detection, identification, and quantitative and phylogenetic analyses of cyanophages are so-called molecular markers (genes specific for them). Among these genes, we can distinguish auxiliary metabolic genes such as: *psbA* and *nblA* as well as structural genes such as *g91* gene.

Given the above, the presented thesis aimed to provide the qualitative and quantitative analyses of the occurrence of freshwater cyanophages and cyanobacteria (including their toxigenic genotypes responsible for the production of microcystins) in Sulejow and Jeziorsko reservoirs. The above-mentioned analysis was made the use of the selected marker genes. Additionally, the influence of physicochemical and hydrological parameters of the studied reservoirs was also investigated.

Moreover, the presence of cyanophages in Polish and Lithuanian waters (genes: *psbA*, *nblA*, and *g91* gene) was analyzed, together with taking into account the influence of such biotic and abiotic parameters as species structure and biomass of cyanobacteria, basic physical and chemical parameters of water, and geographical distance. The transcription activity of cyanophages specific for cyanobacteria of the genus *Microcystis* was also analyzed on a diurnal cycle involving the *g91* gene (cyanophages) and the 16S rRNA gene (cyanobacteria) in Jeziorsko and Sulejow reservoirs.

The results showed that cyanophages, specific for cyanobacteria of the genus *Microcystis* and cyanobacteria of the genus *Synechococcus*, were present in freshwater lakes of Poland and Lithuania. This was also confirmed by the significant similarity of phage gene fragments *psbA*, *nblA* and *g91* to their counterparts available in the GenBank database. The analyses of seasonal

occurrence of cyanophages infecting cyanobacteria of *Microcystis* genus (including their toxigenic genotypes) showed that they appeared simultaneously or after cyanobacteria had appeared, and in most of the monitored periods, they co-occurred with their hosts in Sulejow and Jeziorsko reservoirs.

However, in the above-mentioned studies, a phenomenon of "killing the winner" was also observed. There was a breakdown in the dynamics of cyanobacterial bloom occurrence - their sudden decrease was combined with a rapid increase in the number of cyanophages. In the case of the analysis of biotic and abiotic parameters influence on the occurrence of cyanophages, it was shown that:

1. The total composition of cyanobacteria expressed by their biomass positively influenced the increase in the detection of cyanophages;
2. Physical and chemical factors such as: TP, conductivity, and pH were important environmental parameters differentiating lakes of Poland and Lithuania, which could directly or indirectly (through the host - cyanobacteria) affect the occurrence of cyanophages;
3. Additionally, the influence of hydrology of the monitored dam reservoirs - increased water retention time-favored increased phage infections against cyanobacteria of the genus *Microcystis*.

On the other hand, considering the monitoring of daily changes in the dynamics of occurrence of cyanobacteria of the genus *Microcystis* and their specific cyanophages (based on the analysis of quantitative changes in the transcript of the cyanophage *g91* gene during the day) it was observed that the transcription process was more intense during daylight hours (08:00-16:00), suggesting that the light cycle directly or indirectly affects viral replication in their host cells.


M.Sc. Aleksandra Jaskulska

UNESCO Chair on Ecohydrology
and Applied Ecology