

## Összefoglaló jelentés

A cianobakteriális toxintermelés témakörében elért tudományos eredményeinket három fejezetben tárgyaljuk:

- A cianobakteriális toxintermelés analitikai, bioanalitikai vizsgálata
- A cianobakteriális toxintermelés laboratóriumi vizsgálata
- A cianobakteriumok, algák okozta tömegprodukciók toxintermelésének vizsgálata felszíni vizekben.

Az egyes fejezetekben az aktuális tudományos ismeretanyag mellett bemutatjuk eredményeinket.

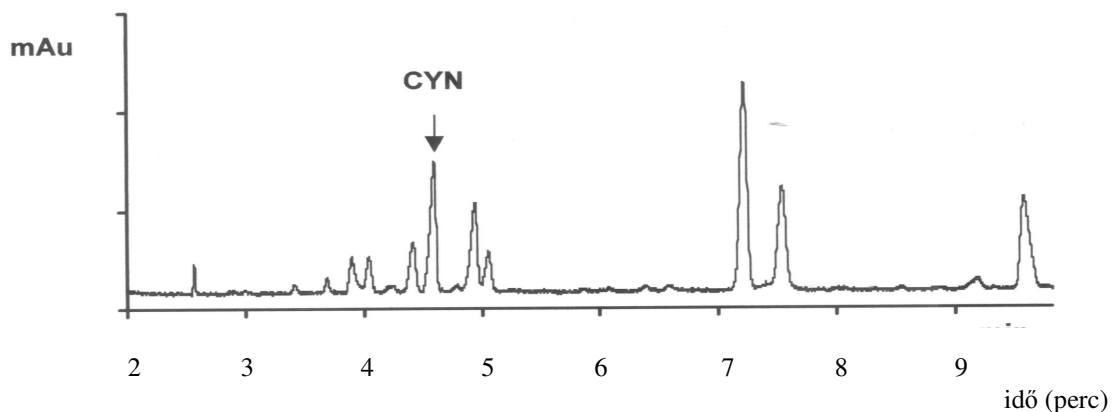
### **A cianobakteriális toxintermelés analitikai, bioanalitikai vizsgálata**

Analitikai módszerfejlesztéseink során a kapilláris elektroforézis technikáját alkalmaztuk. Célunk volt olyan módszerek kidolgozása, amelyek a leggyakoribb cianobakteriális toxinok nyomkövetését, termelésének tanulmányozását lehetővé teszik nem csupán laboratóriumi modell oldatokból, hanem valós biológiai mátrixokból is (vízvirágzás-mintákból, laboratóriumi tenyészetek sejttartalmából). Célunk volt továbbá olyan nagy hatékonyságú módszer fejlesztése, ami lehetővé teszi a toxin(ok) közvetlen analízisét minél kevesebb minta-előkészítéssel. A téma kapcsán a legnagyobb kihívást jelentette annak a problémának a megoldása, hogy a leggyakoribb cianotoxinok analízisére, olyan módszer nem létezik, amivel egyidőben (szimultán) lehetne a különbözőkarakterű cianotoxinokat detektálni.

Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

Publikációk sora jelent meg a CYN kimutatásának, analízisének nehézségeiről, hiszen kimutatása során az egerésztben csak hosszabb expozíciós idő után jelentkezik érzékenyen a toxikus hatása. A kémiai analízisek során a legáltalánosabban használt fordított fázison

történő HPLC-s elválasztás során néhány perces retenciót (visszatartást) eredményezett még 1:99 MeOH/H<sub>2</sub>O eluens összetétel esetében is.. A rövid retenció jelentős problémát jelenthet a célkomponens (jelen esetben CYN), mátrix komponenseitől történő elválasztására. Az intracelluláris, valamint a természetes környezetből származó vízvirágzás minták metanolos extraktuma esetében ez többszáz, zavaró komponens jelenthet. Analitikai fejlesztéseink során egy új módszert dolgoztunk ki a CYN detektálására, amely a komponensek eltérő elektroforetikus mobilitásán alapszik. A kapillárelektroforézis segítségével elválasztott komponenseket, a HPLC-s mérések esetében leggyakrabban alkalmazott, diódasoros UV detektorral detektáltuk. A méréshez minimális mintaelőkészítés, szűrés szükséges, az intracelluláris és extracelluláris CYN közvetlen mérésére van lehetőség szerves extrakció nélkül. A nagy fehérjemolekulák zavaró hatását a puffer SDS tartalmával küszöböltük ki. A módszer segítségével kevesebb, mint 5 perc alatt identikus, tiszta CYN csúcsot detektáltunk, ami alkalmas a CYN mennyiségi meghatározására (3. ábra). A módszert a Kineret tóból származó és bizonyítottan CYN termelő *Aphanizomenon ovalisporum* fonalas cianobaktérium cianotoxin tartalmának meghatározására dolgoztuk ki.

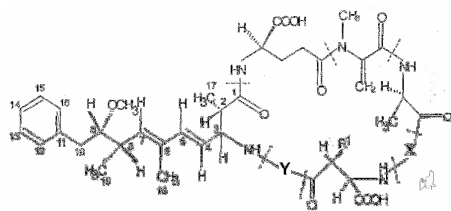


3. ábra cilindrospermopszin kimutatása kapilláris elektroforézis módszerével az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktériumból

Igazolták, hogy a *mikrocisztin* családba tartozó cianotoxinok (heptapeptidek) a protein foszfatázok specifikus inhibitorai (a PP1 és PP2A típusú enzimek) és alapvetően megzavarják a sejtek regulációs folyamatait. A Mcy-ek előfordulására jellemző, hogy az édesvizekben jelentkező toxikus vízvirágzás mérgezős tüneteit közel 90%-ban e vegyületek idézik elő. A mikrocisztinek családjába tartozó toxinok száma megközelíti a százat, köszönhetően a

toxinmolekula variábilis régióinak. Az 1991-es velencei tavi vízvirágzást egy *Microcystis aeruginosa* cianobaktérium idézte elő, a faj izolátuma a Debreceni Egyetem, Növénytani Tanszékén BGSD-243-as törzs néven szerepel, a toxicitásáért felelőssé tehető mikrocisztin-LR, -YR jelenlétét Kós és munkatársai (1995) közzölték.

Vizsgálataink során a BGSD-243-as törzs kivonatából a két legnagyobb koncentrációban jelenlévő mikrocisztin mellett, további mikrocisztinek jelenlétét mutattuk ki és a szervezetből sikerült izolálnunk és leírunk egy új ritka mikrocisztin variánst (4. ábra):



[Asp<sup>3</sup>,Dha<sup>7</sup>]MCY-YA: X=Tyrosine, Y= Alanine, (MT=931)

#### 4. ábra [Asp<sup>3</sup>,Dha<sup>7</sup>]MC-YA szerkezeti képlete

A leggyakoribb mikrocisztinek és az új általunk leírt mikrocisztin variáns elválasztására és kimutatására módszert dolgoztunk ki kapillárelektroforézis készülék segítségével.

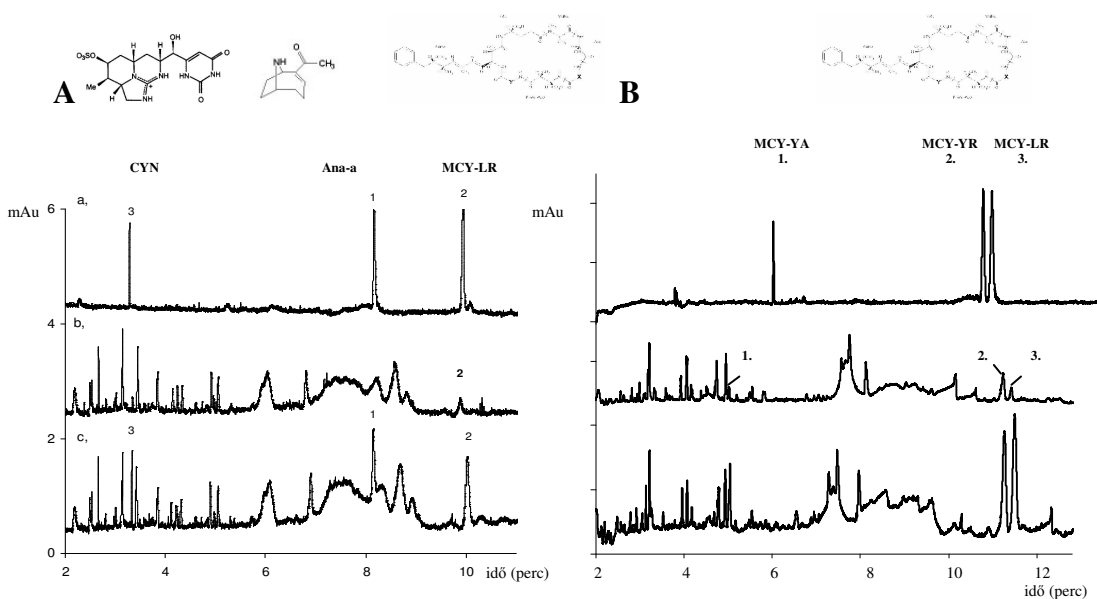
A módszer újdonsága az, hogy eddig a meglévő ismert mikrocisztin variánsok közül leginkább a mikrocisztin-LR, -RR és -YR analízisére dolgoztak ki analitikai eljárásokat. A fejlesztett módszerünk pedig a nyomokban jelenlévő mikrocisztin variánsok elválasztására és detektálására is koncentrál. A munkánk során alkalmazott kapilláris elektroforézis két technikája a “kapilláris zónaelektroforézis”, valamint a “micelláris elektrokinetikus kromatográfia” pH, ionerő SDS tartalom optimálás után alkalmasnak mutatkozott a több mikrocisztin variáns elválasztására (5. ábra).

A mikrocisztinek és a cilindropermopszin analízisére kidolgozott technikák után célul tűztük ki, egy olyan módszer fejlesztését, amivel a leggyakrabban problémát okozó cianotoxinok (mikrocisztin-LR, cilindropermopszin, anatoxin-a) jelenlétét nagy hatékonysággal mérni lehet, viszonylag rövid időintervallumban.

A pH, ionerő SDS tartalom optimálás után alkalmasnak mutatkozott a cianotoxinok elválasztására munkánk során alkalmazott kapilláris elektroforézis két technikája. A fejlesztett

módszer során használt puffer-rendszerben megvizsgáltuk a toxinok abszorpciós maximumát és olyan hullámhosszat kerestünk, amely pontokon mindhárom toxin detektálható (230 nm). Az általunk kidolgozott módszer alkalmas a három leggyakoribb cianotoxin szimultán módon történő elválasztására és detektálására (5. ábra).

A fejlesztett módszereket nem csupán az analitikai módszerfejlesztésekhez elengedhetetlen laboratóriumi modelloldatokon (bemért standardokat tartalmazó törzsoldatok) teszteltük, hanem a toxinok természetes megjelenésére jellemző biológiai mátrixokban is, így segítségével gyorsan és nagy hatékonysággal lehet vízvirágzásból származó mintákat, valamint vízvirágzásokból származó szervezetek cianotoxintartalmát meghatározni.



5. ábra cianobakteriális toxinok szimultán történő elválasztására és detektálására kidolgozott módszer (A) és a mikrocisztin variánsok elválasztására és detektálására kidolgozott módszer elektroferogramjai (B)

A cianobakteriális toxinok meghatározásához, a kidolgozott módszereinket alkalmaztuk a laboratóriumi körülmények között folytatott toxintermeléssel foglalkozó kísérleteinkben, illetve a vizekben bekövetkező cianobakteriális tömegprodukciók toxinanalízise kapcsán.

## **A cianobakteriális toxintermelés laboratóriumi vizsgálata**

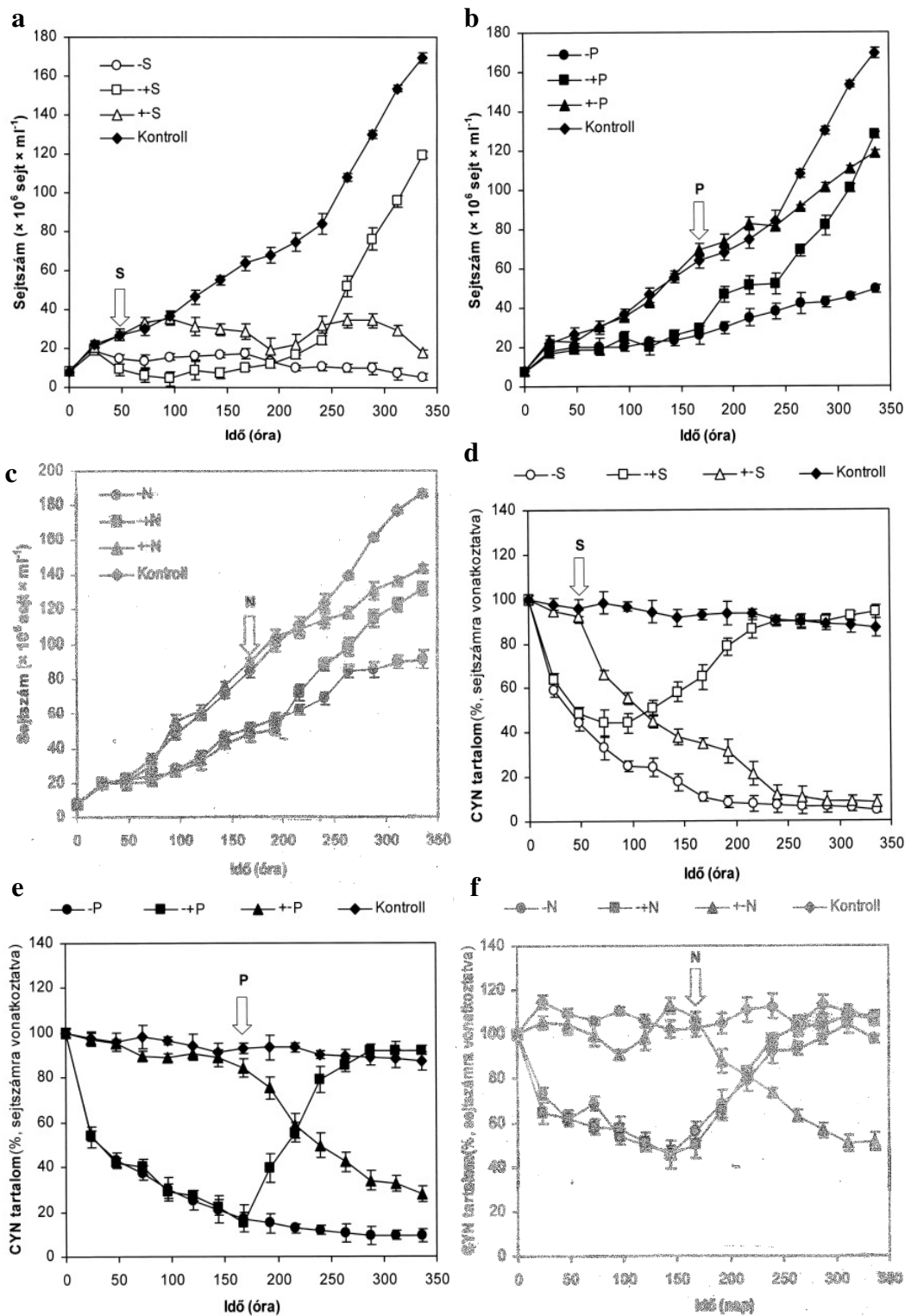
Célkitűzésünk, a cilindrospermopszin-termelés tanulmányozása kén-, foszfor-, illetve nitrogénéhezés körülményei között, az intracelluláris toxinkoncentráció nyomkövetése és tanulmányozása a vegetatívsejtekben és a heterocisztában, valamint az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedésének és az adott anyagcserében egyes kulcsenzimek aktivitásának vizsgálata megfelelő kén-, foszfor-, illetve nitrogénellátottság esetén, illetve a kén-, foszfor-, valamint a nitrogénéhezés körülményei között.

Eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

A kontroll, azaz szulfátot, foszfátot illetve nitrátot optimális mennyiségben tartalmazó tenyészethez képest mind a kénéheztetett, mind a foszforéheztetett, mind pedig a kötött nitrogén hiányában nevelt tenyészetben a növekedés gátlást szenvedett. A gátlás, különböző mértékű a különböző éhezési körülmények között.

Legnagyobb mértékű növekedésgátlás a kénéheztetett tenyészetben mérhető. A foszforéheztetett tenyészetek növekedése ennél jóval jelentősebb, 6-8-szoros növekedés tapasztalható a 14. napra, a kiindulási állapothoz képest. Megállapítható, hogy a foszforéheztetett tenyészet növekedése nem áll le, mint az a kénéhezés során tapasztalható, hanem a 14. napig fennmarad. A szulfát hiányában a tenyészet 72-96 óra alatt olyan mértékű károsodást szenved, hogy ekkor már a szulfát visszaadása után sem képes regenerálódni (6. ábra). Eredményeink alapján megállapítható, hogy az *Aphanizomenon ovalisporum* sejtek – az irodalmi adatok alapján a cianobaktériumokra általánosan jellemzőnek tekinthető módon – nem képesek nagy mennyiségű kén felhalmozására és annak valamilyen formában történő raktározására. Más a helyzet a foszfor esetében: a sejtek – a cianobaktériumokra ugyancsak általánosan jellemző módon – képesek nagy mennyiségű foszfor felhalmozására (főként polifoszfát formájában - Stanier és Cohen-Bazire, 1977). A foszforraktárak kimerülése után azonban, legkésőbb a 16-18. napra a tenyészet összeomlik.

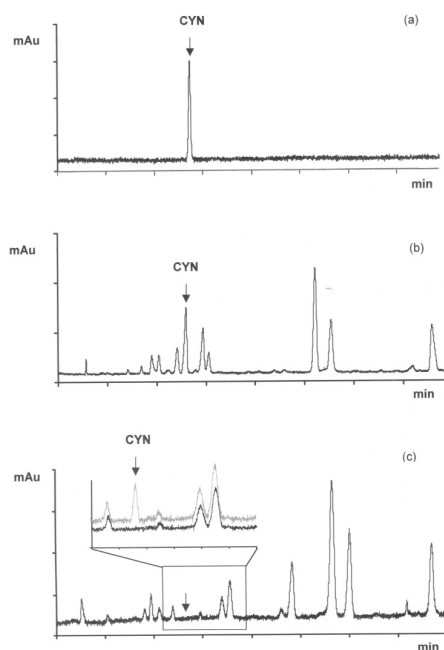
Az irodalom szerint a cianobaktériumokban a fikobiliproteinek, nitrogénraktárként szerepelhetnek kötött nitrogén hiányában. Megfigyeléseink részben összhangban állnak az irodalmi adatokkal: kötött nitrogén hiányában a tenyészetek sárgulásának oka a fikobiliproteinek lebomlása. A heterociszták kialakulása után a tenyészet teljesen nitrátmentes tápoldatban fenntartható, növekedése a kötött nitrogénre jellemző növekedésnél alacsonyabb rátával stabilizálódik.



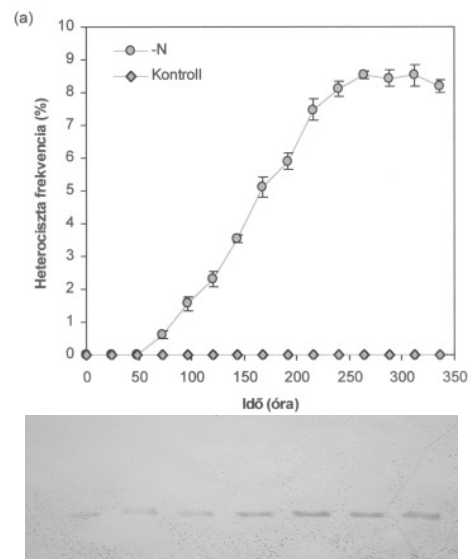
6. ábra Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedése a kén-(a), foszfor(b)- és nitrogénéhezés (c) során. A tenyészetek növekedését a sejtszám (sejt  $\times \text{ml}^{-1}$ ) meghatározásával követtük nyomon. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek intracelluláris cilindrospermopszintartalma a kén-(a), foszfor(b)- és nitrogénéhezés (c) során. A nyíl a tápelem visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet tápelem-mentes médiumba való áttöltésének időpontját jelöli.

Belső kontrollként enzimológiai vizsgálatokkal kimutattuk az adott tápelem metabolizmusában szereplő kulcsenzimek indukcióját (-S: ATP-szulfuriláz; -P: alkalikus foszfatáz; -N: nitrogenáz). Meghatároztuk az *A. ovalisporum* indukálható ATP-szulfuriláz enzimének pH optimumát, valamint megállapítottuk, hogy a szulfát hiánya az enzim aktivitásában kb. hússzoros növekedést indukál. A foszfátéhezés körülményei között az alkalikus foszfatáz enzim aktivitása a tenyésztés teljes ideje alatt emelkedett, a tenyésztés végére a kiindulási érték harmincszorosára nőtt. Az enzim aktivitásának növekedése kloramfenikollal (specifikus prokarióta fehérjeszintézis inhibitor) gátolható, mindez a foszforlimitált körülmények között indukálódó *de novo* enzimszintézisre utal. A kötött nitrogénformák csökkent mennyisége, majd hiánya a tápoldatban a nitrogenáz enzim indukciójához vezetett, az enzim jelenlétét, illetve mennyiségének növekedését immunológiai eljárással mutattuk ki a heterocisztákban (7. ábra).

## I.



## II.



7. ábra A heterociszták cilindrospermopszin tartalmának vizsgálata kapilláris elektroforézis (CE) módszerrel (I). (a) A tiszta cilindrospermopszin (CYN) elektroferogramja. (b) A vegetatív sejtek elektroferogramja, a nyíl a cilindrospermopszin csúcsot jelöli. (c) Az izolált heterociszták elektroferogramja. A bekeretezett részben a nyíl a cilindrospermopszin csúcs helyét jelöli. A kinagyított részben feketével jelöltük a tisztított heterociszták kivonatának elektroferogramját, szürkével a tiszta cilindrospermopszinnal kiegészített heterociszta-kivonat elektroferogramját. A heterociszta frekvencia változása II. (a), illetve a nitrogenáz enzimkomplex mennyiségének változása az idő függvényében (b) a nitrátéhezés során.

A sejtek cianotoxin-tartalmára vonatkozó vizsgálataink eredményei szerint a szulfát, a foszfát és a nitrát hiánya is a cilindropermopszin tartalom csökkenéséhez vezet az *A. ovalisporum* sejtekben (6. ábra).

Ha a toxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg, legnagyobb mértékben a kénéheztetett tenyészetben csökken a toxintartalom (a kiindulási érték 64-65%-kal csökkent két nap alatt). A foszfát hiányában mérsékeltebb csökkenést tapasztalhattunk (a kiindulási érték 47-48%-kal csökkent két nap alatt), míg nitrát hiányában volt a legkisebb mértékű a toxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 39-40%-kal csökkent két nap alatt). Nitrogénéhezés során a 6. naptól a cilindropermopszin mennyisége újra megnövekedett, ami a törzs nitrogénkötő képességével magyarázható (6. ábra).

Amennyiben a toxintartalmat sejszámra vonatkoztatva számítjuk, nincs számottevő különbség a kénéhezés és a foszforéhezés között; a cilindropermopszin mennyisége mindkét esetben a kiindulási érték 42-44%-ára csökken két napon belül. A nitrátmentes táptalajban nevelt tenyészet esetében itt is speciális dinamikával találkozunk, a fentebb említett nitrogénkötő képességnek köszönhetően. Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a nitrát hiányában differenciálódó heterociszták nem tartalmazzak cilindropermopszint, azaz anyagcseréjük a másodlagos anyagcseretermékek termelése tekintetében is átalakul, a cilindropermopszin termelés represszálódik (7. ábra).

### **A cianobakteriumok, algák okozta tömegprodukciók toxintermelésének vizsgálata felszíni vizekben**

A világ különböző kontinenseiről származó jelentések számos esetben számolnak be toxintermelő planktonikus szervezetek tömeges megjelenéséről és azok káros következményeiről. Általánosságban elmondható néhány cianobaktériumfajról, hogy populációi a Föld majd minden országában okoznak tömeges elszaporodást. Ilyen szervezetnek mondható, pl. a *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena spiroides*, *Cylindropermopsis raciborskii* és néhány *Planktolyngbia* faj. A cianobakteriális toxintermelés sajátosságai közé tartozik, amint azt már leírtuk a II. fejezetben, hogy egyes szervezetek megjelenése nem von maga után feltétlen toxintermelést és csupán a toxintermelő faj morfológiai jegyei sem határozzák meg a cianobakteriális



toxinok melyik csoportja okozza a faj toxicitását. A *Cylindrospermopsis raciborskii* tömeges megjelenései kapcsán megállapították, hogy a különböző kontinensekről származó izolátumok toxintermelése eltérő. Kelet-Ázsiából származó *C. raciborskii* fajok cilindrospermopszint termelnek a Dél-Amerikából származó izolátumok szaxitoxin-analógokat termelnek, az európai kontinens törzsei pedig eddig nem azonosított toxinoknak köszönhetik mérgező-képességüket. Sokkal homogénebb a kép a *Microcystis aeruginosa* toxintermelése kapcsán. A világ különböző vizeitől származó minták esetében szinte kizárólag mikrocisztineket sikerült kimutatni a szervezetből, azonban árnyalja a képet, hogy a mikrocisztinek több mint száz variánsa az egyes populációkban eltérő variabilitással, eltérő koncentrációban jelennek meg. Egyes *Anabaena* és *Aphanizomenon* fajokra a teljes variabilitás jellemző, hiszen egyes populációkban hepatotoxikus mikrocisztineket, más esetben hepatotoxikus cilindrospermopszinokat, neurotoxikus anatoxinokat, szaxitoxinokat sikerült kimutatni. Hazánkban az első vízvirágzással kapcsolatos közlés 1934-ben jelent meg. Sebestyén Olga a tihanyi Biológiai Kutatóintézet előtti Kis-öbölben augusztus 11-én zöldessárga *Microcystis aeruginosa* és *Microcystis flos-aquae* okozta vízvirágzást figyelt meg. A második közlés 1960. július 30-áról való, világoszöld, sávós vízvirágzást észleltek Balatonbogláron a part közvetlen közelében egy védett beöblösödésben, melyet *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb. f. *jacutica* (Kissel.) Elenk. idézett elő. A következő vízvirágzást Hortobágyi közölte: 1960. augusztus 23-án a balatonboglári partmenti részeken kisebb-nagyobb *Microcystis flos-aquae* csomók úsztak a vízben. Megjelenésük egyedülálló, úgynevezett „szórt” vízvirágzás volt. A *Microcystis flos-aquae* további szórt megjelenésű virágzásairól tettek jelentést, 1960. augusztus 19-én és 1961. szeptember 17.-19. között (Hortobágyi, 1962). Az eddig említett hazai vízvirágzások viszonylag kis területre korlátozódtak és gyors lefutásúak voltak. Az első fokozott mértékű és hosszan tartó balatoni vízvirágzásra 1966. szeptember 2-án figyeltek fel. A jelenség a Keszthelyi-öbölben mutatkozott, a Zala torkolatához közel. A vízvirágzás 6 km széles és 11 km hosszú területen alakult ki, melyet egyetlen cianobaktérium faj okozott: az *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. A hetvenes évek balatoni vízvirágzásait szintén ez a faj idézte elő. Rendszeretelenül a nyári hónapokban vízvirágzást idézett elő 1982-ben, 1992-ben és 1994-ben a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Padisák, 1997).

A magyarországi vízvirágzások toxicitásának vizsgálata a 90-es évek előtt elsősorban a hagyományos biológiai toxintesztekre korlátozódtak. A megfelelő műszeres analitikai háttér,

a rendelkezésre álló standardok és fejlesztett analitikai módszerek segítségével célul tűztük ki a magyarországi vízvirágzások, algák és cianobaktériumok okozta tömegprodukciók toxicitásának feltérképezését. Milyen planktonikus fajok okoznak tömegprodukciót és milyen toxinok megjelenése jellemző a magyarországi vizezrekre. Az 1990-es évek közepétől kezdve rendszeresen vizsgáltuk a hazai és külföldi vizezrekben előforduló vízvirágzások toxicitását. A megmintázott sejtömeg toxicitását elsősorban mustár-csíránövényteszttel mértük, toxintartalmát pedig az általunk kidolgozott analitikai módszerekkel vizsgáltuk mikrocisztinekre, cilindrospermopszinra és anatoxin-a-ra. A három esetben eukarióta alga és 48 esetben cianobaktérium által előidézett tömegprodukció kapcsán kapott eredményeket az I. táblázatban foglaltuk össze.

I. táblázat A laboratóriumunkban megvizsgált plankton-minták analízise

<b>Mintavételi hely/idő</b>	<b>Faj(ok)</b>	<b>Toxicitás*</b>	<b>Toxin**</b>
3T Kis-Balaton,	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
3T Kis-Balaton	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
3T Kis-Balaton,	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
3T Kis-Balaton,	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
3T híd Kis-Balaton,	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
4 Rutin Kis-Balaton,.	<i>Aphanizomenon sp.</i> <i>Microcystis sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
4T Kis-Balaton,	<i>Anabaena spiroides</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
4T Kis-Balaton,	<i>Anabaena spiroides,</i> <i>Microcystis sp.</i> <i>Aphanizomenon sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+

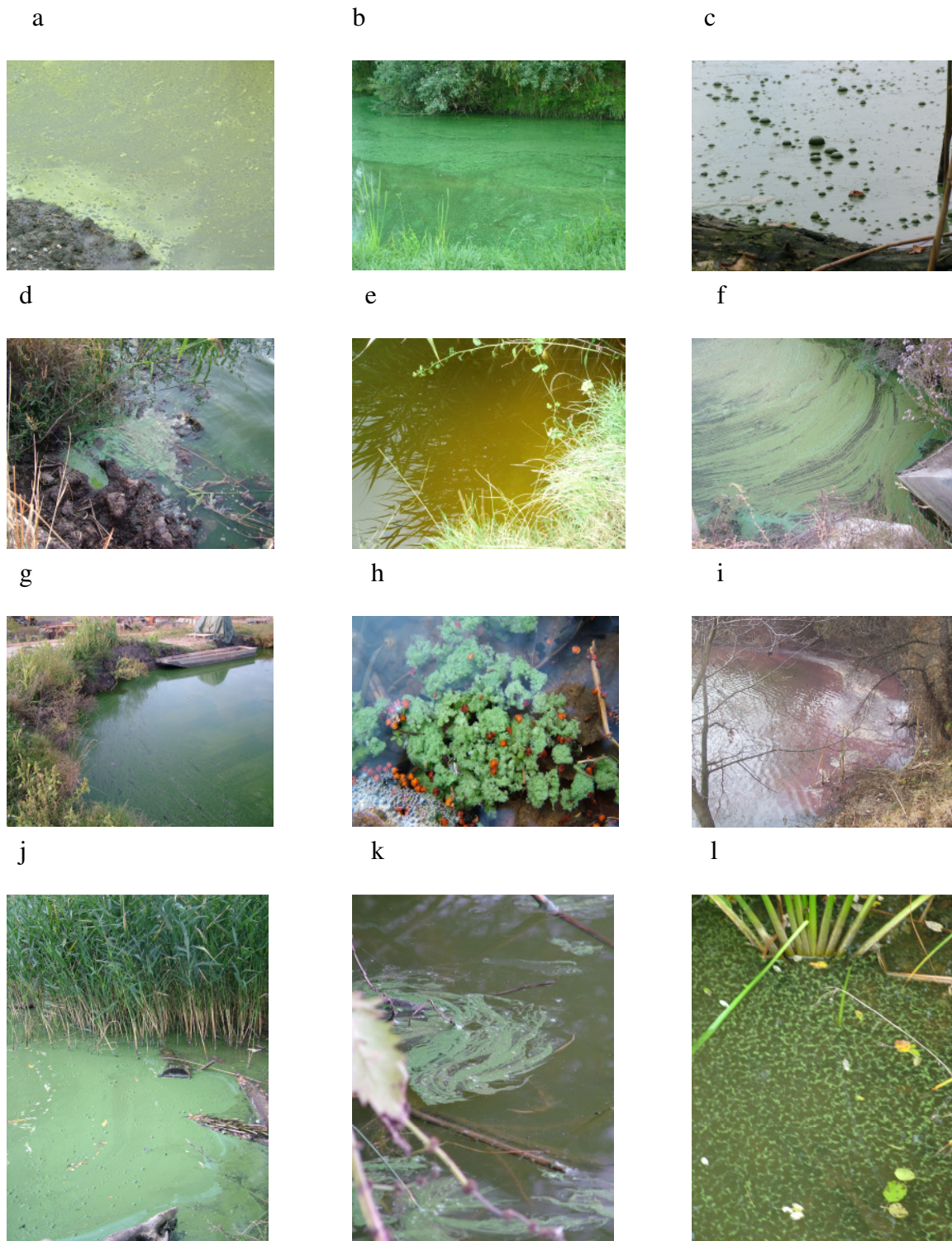
<b>Mintavételi hely/idő</b>	<b>Faj(ok)</b>	<b>Toxicitás*</b>	<b>Toxin**</b>
Balaton, szeptember	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:-
Balaton, szeptember	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:-
Balaton szeptember	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:-
Bariri Tietê basin, Brazília	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Aphanizomenon sp.</i> , <i>Aphanizomenon issatchenkoi</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Barra Bonita Tietê basin, Brazília	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Békás-tó (Debrecen)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Blanes (Spanyolország)	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Planktolyngbia limnetica</i>	BGST: +	CYN:+ ANA:- MCY:-
Csónakázó-tó (Gyula)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Csónakázó-tó (Gyula)	<i>Microcystis sp.</i> <i>Anabaena solitaria</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Csónakázó-tó (Gyula)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Anabaena spiroides</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Ebédleső szik, halastó 5ha (Gyula)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Ebédleső szik, halastó 7ha (Gyula)	<i>Aphanizomenon sp.</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Fancsika (II) (Debrecen)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Microcystis sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Fűzfazugi-holtág (Gyomaendrőd)	<i>Aphanizomenon sp.</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-

<b>Mintavételi hely/idő</b>	<b>Faj(ok)</b>	<b>Toxicitás*</b>	<b>Toxin**</b>
Görbeházi elfolyó csatorna	<i>Chlorella sp.</i>	BGST:-	CYN:- ANA:- MCY:-
Hármashegyi tározó (Debrecen)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Hármashegyi tározó (Debrecen)	<i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Microcystis viridis</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Hármashegyi tározó (Debrecen)	<i>Microcystis viridis</i> , <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Hármashegyi tározó (Debrecen)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Hármashegyi tározó (Debrecen)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Homokbánya-tó (Békéscsaba)	<i>Microcystis flos-aquae</i>	BGST:+	CYN:- ANA:- MCY:+
Ibitinga Tietê basin, Brazília	<i>Microcystis sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Ingói –berek Kis-Balaton,	<i>Anabaena sp.</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Microcystis sp.</i> <i>Aphanizomenon sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Ingói I (nyílt) Kis-Balaton,	<i>Microcystis sp.</i> <i>Anabaena spiroides</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Ingói-berek Kis-Balaton,	<i>Microcystis sp.</i> <i>Anabaena spiroides</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Kazetta (délkeleti sarok) Kis-Balaton,	<i>Microcystis sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Kerék-láp Kis-Balaton,	<i>Aphanizomenon sp.</i> <i>Microcystis sp.</i> , <i>Anabaena spiroides</i> , <i>Anabaena sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Major tó Kis-Balaton,	<i>Aphanizomenon sp.</i> <i>Microcystis sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Major tó Kis-Balaton,	<i>Aphanizomenon sp.</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-

<b>Mintavételi hely/idő</b>	<b>Faj(ok)</b>	<b>Toxicitás*</b>	<b>Toxin**</b>
Major tó Kis-Balaton,	<i>Anabaena spiroides</i> , <i>Microcystis sp.</i> <i>Aphanizomenon sp.</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Nagycsécsi horgásztó (Nagycsécs)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST:+	CYN:- ANA:- MCY:+
Promissao Tietê basin, Brazília	<i>Microcystis sp.</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Révzugi-holtág (Gyomaendrőd)	<i>Planktothrix agardhii</i> <i>Anabaenopsis sp.</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Siratói-holtág (Gyomaendrőd)	<i>Aphanizomenon sp.</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Téglagyári 2-es tó (Gyula)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:-
Téglagyári 6-os tó (Gyula)	<i>Anabaena solitaria</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Téglagyári Őreg-tó (Hajdúszoboszló)	<i>Prymnesium parvum</i>	Hemolitikus teszt:+ BGST:-	CYN:- ANA:- MCY:-
Vekeri tó (Debrecen)	<i>Anabaena solitaria</i> , <i>Anabaena spiroides</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Vekeri tó (Debrecen)	<i>Aphanizomenon flos- aquae</i> , <i>Anabaena spiroides</i>	BGST: -	CYN:- ANA:- MCY:-
Vekeri tó (Debrecen)	<i>Aphanizomenon flos- aquae</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+
Velencei tó,	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BGST: +	CYN:- ANA:- MCY:+

\* A toxicitás + : liofilezett plaktonminta IC<sub>50</sub> értéke ≤ 1 mg/ml

\*\* A toxin - : A liofilezett plaktonminta toxin-koncentrációja ≤ 0.01 µg/g



8. ábra Cianobakteriumok, algák okozta tömegprodukciók magyarországi vízterekben, (a) *Chlorella* sp. virágzás, (b) *Microcystis viridis* virágzás, (c) *Planktothrix agardhii* virágzás, (d) *Microcystis* sp. virágzás (e) *Prymnesium parvum* virágzás, (f) *Microcystis aeruginosa* virágzás, (g) *Aphanizomenon* sp. virágzás. (h) *Microcystis* sp. kolóniák (i) *Planktothrix rubescens* virágzás (j) *Aphanizomenon* sp. virágzás (k) *Anabaena* sp. virágzás (l) *Microcystis* sp. virágzás

A magyarországi vizekben előforduló tömegprodukciók toxicitásának kapcsán elmondható, hogy a toxikus vízvirágzások megjelenése elsősorban mikrocisztintermelő szervezeteknek köszönhető. Feltűnő a *Microcystis* fajok dominanciája, azok közül is a *Microcystis aeruginosa* nagyszámú megjelenése. A *Microcystis* fajok előfordulása vízvirágzásokban, néhány kivételtől eltekintve mikrocisztinek megjelenését is indikálta. Mikrocisztin-termelést azonban nemcsak az említett szervezet kapcsán detektáltunk.

Az utóbbi években Nyugat-Európa majd minden országából jelezték a *Planktotrix rubescens* (régiben *Oscillatoria rubescens*) tömeges megjelenését és toxintermelését. Spanyolország, Franciaország, Svájc, Olaszország és Szlovénia után 2006 novemberében egy észak-magyarországi kavicsbánya-tóban találtuk meg és izoláltuk a fajt, amely tömeges megjelenésével vörösre színezte a vizet. A szervezetből mikrocisztinek jelenlétét igazoltuk az általunk mikrocisztinek detektálására kidolgozott módszer segítségével. A vörös-színű szervezet megjelenése azért különleges, mert a faj valódi rétegzett mélytavakban fordul elő, ami hazánkban kifejezetten ritkának számít.

A különböző cianobaktérium-szervezetek által okozott tömegprodukciókból szerkezetazonosítással illetve standardok segítségével a mikocisztin-LR, mikocisztin-RR, mikocisztin-YR, mikocisztin-FR, mikocisztin-YA variánsokat azonosítottuk. A leggyakoribb és egyben az egyik legtoxikusabb variáns a mikocisztin-LR a hazai vizekben, ami megfelel más kontinensek és európai országok megfigyeléseivel. A legnagyobb „összes mikocisztin-tartalmat” a velecei-tavi *Microcystis aeruginosa* szervezetből mutattunk ki (10,51 mg/g), amit mikocisztin-LR, mikocisztin-RR, mikocisztin-YR toxinok jelenléte okozott.

A legtöbb mikocisztin-variánst egy szegedi kerti tóban előforduló vízvirágzásból mértünk, ahol 15 variáns együttes jelenlétét igazoltuk egy *Microcystis* fajból.

Az 1. táblázat tanulmányozása kapcsán feltűnő az egyes vizekben megjelenő nitrogénfixáló szervezetek nagy aránya és azon belül is a *Cylindrospermopsis raciborskii* jelenléte. A cylindrospermopszin-analízisek kapcsán megvizsgáltuk a különböző vizek planktonmintáit és a potenciálisan cylindrospermopszin-termelő szervezeteket izoláltuk, megvizsgáltuk toxicitásukat.

A különböző vizekből izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek toxicitása mustár csíranövénytesztben, vízterenként különböztek, amely alátámasztja azt a törvényszerűséget, hogy a cianobaktériumok toxicitása, egy adott cianotoxin termelése nem köthető kizárólagosan egy fajhoz, hanem egyes fajok egyes izolátumainak jellemzője. A vizsgált mustár csíranövénytesztben a Balatonból izolált törzsek (*C. raciborskii*, BGSD 266, BGSD 2000, BGSD 2001) toxikusak voltak, amelyek kivonatainak IC<sub>50</sub> értékei közel azonosak voltak és jellegzetes gyökér növekedésgátló hatásuk is megfigyelhető. A szelidi-tavi, valamint kis-balatoni izolátumok IC<sub>50</sub> értékei különböztek a fent említett izolátumoktól, azonban a magyarországi, általunk izolált törzsekről általánosan elmondható, hogy cilindrospermopszin kimutatható mennyiségben nem tartalmaznak. A magyarországi vizek *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumának cilindrospermopszin analízise természetesen nem általánosítható a magyarországi vizekben jelenlévő *C. raciborskii* törzsekre, nem zárható ki cilindrospermopszin termelő törzsek jelenléte Magyarországon, azonban a Balatonból származó több év izolátumának analízise valószínűsíti hogy a Balatonban előforduló, szeptemberi időszakokban tömegprodukciónak adó cianobaktérium faj a *Cylindrospermopsis raciborskii* nem termel cilindrospermopszint.

A cilindrospermopszin egy *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsből került leírásra, azóta több publikáció jelent meg cilindrospermopszin nem termelő *C. raciborskii* izolátumokról és sorra kerültek leírásra egyéb fajok (*Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*) melyek egyes izolátumai termelik az alkaloid típusú cilindrospermopszint. Az Ausztráliából származó izolátumaink (BGSD AQS, LT) szintén alátámasztották hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* CYN termelése esetenkénti, hiszen az AQS izolátumunk termeli, míg LT izolátumunk nem termeli az alkaloid típusú hepatotoxint.

A laboratóriumunk egyik modell-szervezetének, az Izraelből származó *Aphanizomenon ovalisporum* (BGSD-423) cilindrospermopszin analízisét a II. fejezetben részletesen tárgyaltuk. A Spanyolországból (Blanes, botanikus kerti tó) származó *Aphanizomenon ovalisporum* izolátumból szintén CYN-t sikerült kimutatnunk, ami megmagyarázza a tóban megjelenő vízvirágzás mintájában detektált CYN tartalmat.

A magyarországi vizekben előforduló vízvirágzásokat néhány kivételtől eltekintve cianobaktériumok idézték elő, ami megfelel annak az általános vélekedésnek, hogy a tengervizekben általában eukarióta algák, míg az édesvizekben a prokarióta cianobaktériumok idéznek elő vízvirágzást. Magyarországon három esetben sikerült algák okozat vízvirágzást



megfigyelni: *Euglena sanguina* (*Euglenophyta*) virágzás a Kis-Balatonon, *Chlorella sp.* (*Chlorophyta*) tömegprodukció a görbeházi szivárgó-csatornában és a *Prymnesium parvum* (*Haptophyta*) tömeges megjelenését a hajdúszoboszlói téglagyári Öregtavon. Az előző két esetben toxintermelést nem igazoltunk illetve még enyhe toxicitást sem sikerült kimutatni a szervezetekből. A *Prymnesium parvum* virágzásnál erőteljes toxintermelést tapasztaltunk és annak következményeit figyeltük meg a vízvirágzás helyszínén.

A hajdúszoboszlói Téglyagyári Öregtavon különböző halfajok tömeges pusztulását figyeltük meg 2005. július 6.-án. Az elpusztult egyedek kopolyúfedőin és a végbélnyílásuk környékén jellegzetes bevérzéseket észleltünk. Az élő egyedek jelentős része pipált, illetve partközeli koordinálatlan mozgás volt rájuk jellemző.

Helybéli horgászok szerint 5-10 évente hirtelen, nagymértékű halpusztulás következik be a tavon, amikor is a 2005-ös évnek megfelelő mértékben, a víz halfaunájának jelentős része elpusztul.

Vízkémiai paraméterek alapján a halpusztulás az oldott oxigén illetve az ammónia tartalom alapján nem volt magyarázható, azonban feltűnő volt a víz magas vezetőképessége. Ezzel párhuzamosan a tó vize jellegzetes aranysárga elszíneződést mutatott, egy a vízterben tömegesen megjelenő planktonikus eukarióta szervezetnek köszönhetően. A szervezetet fénymikroszkóppal történő határozás során *Prymnesium parvum* Carter-nek határoztuk, amelynek egyedei 35-40 millió/l egyedszámban voltak jelen a merített vízmintában.

A merített vízminta töményítés nélkül is extrém mértékű toxikológiai eredményeket adott. Víztóxicológiai tesztek segítségével megállapítható volt, hogy a vízből származó minta erősen mérgező. A haltest expozíció ideje ugyan 96 óra, de a víz eredeti töménységében már 10 perc elteltével 100%-os mortalitást mutatott, és csupán 11 szerez hígítás esetén sikerült LD<sub>50</sub> értéket kalkulálnunk. A Daphnia-teszt hasonló eredményeket hozott. A csíranövénytesztben erőteljes toxikus hatást nem sikerült kimutatni.

A *Prymnesium parvum* toxicitásának megerősítésére, beállítottunk egy specifikus tesztet, amely kifejezetten a hemolitikus anyagokat tartalmazó közegek tesztelésére alkalmas. A teszt lényege, hogy hígított fibrinmentes borjúvért kezeltünk a vízmintával. Míg a kontroll rendszerben a vörösvértestek a hemoglobin tartalmukkal ülepednek, addig a hemolitikus anyag(ok) hatására a vörösvértestek degradálódnak, szétesnek és a hemoglobin a felülúszóba kerülve nem ülepszik, ezért vörös színűre festi az oldat felülúszóját. Az egyik legismertebb hemolitikus komponenseket tartalmazó anyag a szappangyökér növény kivonata, amelynél a

*Prymnesium parvum* kivonata szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva kb. 500-szor erősebbnek mutatkozott. A hemolitikus tesztet megismételtük szilárd táptalajon, amely borjúvért tartalmazott (későbbiekben véres agar). A véres agarra a *Prymnesium parvum* sejteket tartalmazó vízminta egy-egy részletét, *Prymnesium* sejteket nem tartalmazó vízminta, illetve desztillált víz egy-egy részletét cseppentettük fel. A *Prymnesium* sejteket tartalmazó minta esetében a véres-agar felszínén erőteljes „lízis-foltot” figyelhettünk meg, amit a szervezet kivonata a táptalaj komponenseinek kiemésztésével idézett elő.

A teszt alapján felmerült a proteáz hatású anyagok vizsgálata, amelyeket poliakrilamid gélen vizsgáltunk. A *Prymnesium* nyers fehérjekivonatok (2,5-8 µg protein/mintahely) pH: 5,0-ön kis mértékű proteáz aktivitást mutattak, éles fehérjesávokat nem lehetett elkülöníteni. Ezzel szemben lúgos közegben a *Prymnesium* kivonatok proteáz aktivitása nagyon magas volt, 15 proteáz aktivitással rendelkező enzimet/izoenzimet tudunk a zselatin tartalmú géleken elkülöníteni. Az egységnyi fehérjére vonatkoztatott ún. specifikus aktivitás felülmúlta a még vizsgált toxintermelő cianobaktériumok kivonatánál tapasztalt proteázaktivitást.