

# Fikocianin meghatározási módszerek és alkalmazásuk különböző trofitású víztereken

Horváth Hajnalka<sup>1</sup>, Kovács W. Attila<sup>1</sup>, Vörös Lajos<sup>1</sup>, Zsigmond Eszter<sup>2</sup> és Présing Mátyás<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA ÖK BLI, 8237. Tihany, Klebelsberg Kuno u. 3. - <sup>2</sup>Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Románia

## Kivonat

fikocianin, főként a cianobaktériumokban (kéalgák) szintetizáló fotoszintetikus pigment, melynek mennyiségi meghatározása alkalmas a cianobaktériumok jelenlétének és relatív megoszlásának gyors becslésére. A pontos mennyiségi meghatározásra alkalmas extrakciós módszerek többsége speciális felszereltséget igénylő, drága eljárás. Kísérleteink során –melyekben négy, rutin laboratóriumokban is kivitelezhető módszert hasonlítottunk össze– megállapítottuk, hogy a legelterjedtebb, fagyasztásos-olvasztásos ciklusokon alapuló módszer alacsony alga-biomassza tartományban (< 30 µg/l) bizonytalan és alulbecsülheti a valós értéket. Ezért célunk volt kidolgozni egy fikocianin meghatározáson alapuló gyors és reprodukálható módszert, mely alkalmas oligo-mezotróf tavak fitoplanktonjának cianobaktérium biomassza becslésére (is). Eredményeink szerint egyetlen fagyasztási-olvasztási ciklus ultrahangos roncsolással kiegészítve, 25 %-kal hatékonyabb extrakciót eredményez. E módszer természetes viszonyok közötti kipróbálása során, a Balatonban a fikocianin koncentrációja erős korrelációt mutatott ( $r^2 = 0.8018$ ) a mikroszkóppal meghatározott cianobaktérium biomasszával. Eredményeink alátámasztják a módszer alkalmazhatóságát és érzékenységét oligo- és mezotróf vízterek fikocianin alapján való jellemzésére és alkalmazása biztos lehetőséget nyújt pl. a modern távérzékelés módszerének széles trofitási skálán történő értékelésére.

**Kulcsszavak:** *Cylindropermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena spiroides*, fikocianin, extrakciós módszerek.

## Bevezetés

A fikobiliproteinek a cianobaktériumokra, Rodophyta és néhány Cryptophyta fajra jellemző pigment-protein komplexek, melyekben alapvetően három fikobilin kromofor fordul elő: az allofikocianin, a fikocianin és esetenként a fikoeitritin (Williams és mtsai, 1980). A fikobilin kromoforok a tilakoid membrán külső felszínén elhelyezkedő szupramolekuláris komplexekben a fikobiliszómában található, mint fő fotoszintetikus kisegítő pigmentek (Sidler, 1994). A fikobiliproteinek szintézise csak az algák egy szűk körére jellemző, ezért e pigmentek meghatározásával ezen algák adott vízterben való jelenléte becsülhető (Watras és Baker, 1988). A cianobaktériumok előfordulásának a fikocianin meghatározásán alapuló becslése évtizedekre visszamenő, kiterjedt irodalommal rendelkezik: „*in situ*” fluorimetriás terepi meghatározás, (pl. Seppälä és mtsai, 2007), „*in vivo*” fluorimetriás meghatározás (Gregor és Maršálek, 2005), távérzékelés (pl. Simis és mtsai, 2005) vagy „*in vitro*” kémiai extrakciós módszer (Sarada és mtsai, 1999). Azonban ezek többsége drága felszereltséget igénylő és/vagy időigényes eljárás. Ezért célunk volt kidolgozni egy megbízható, gyors és olcsó módszert a fikocianin mennyiségének meghatározására, a cianobaktérium biomassza gyors becslésére.

## Anyag és módszer

### Alga kultúra és tenyésztési feltételek

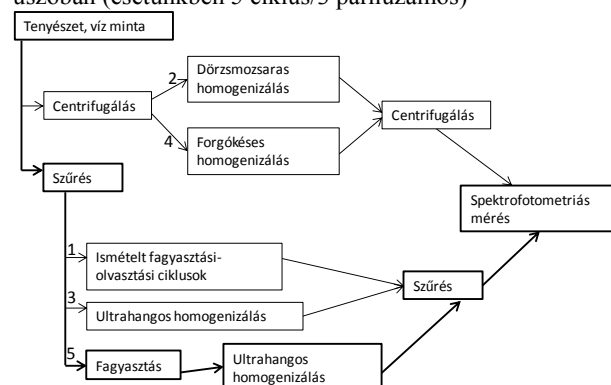
*Cylindropermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenayya et Subba Raju ACT 9502, *Anabaena spiroides* (Kleb.) ACT 9607, *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs ACT 9605 és *Aphanizomenon issatschenkoi* (Ussatzew.) Proschkina-Lawrenko) ACT 9608 izolált törzsét használtuk a módszerek hatékonyságának összevetése során. Az alga törzseket 24°C-on, 14–10 óra fény-sötét ciklusban, 40 µmol/m<sup>2</sup>/mp intenzitású fényvel megvilágítva (fény mérése LI-COR 1400 fénymérőhöz csatlakoztatott 4π kvantum szenzorral (Walz US-SQS/L)), NaNO<sub>3</sub>-mentes BG-11 tápoldaton szaporítottuk (Rippka és mtsai 1979).

### Extrakciós módszerek

A fikocianin kinyeréséhez a 15 ml 0,05 M foszfát puffert (pH = 6,8, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Whatman GF/C membrán-szűrőt és BHG HERMLE Z320 centrifugát (4000 rpm/10 perc) használtunk.

1) Fagyasztás-olvasztás módszer (Bennett és Bogorad, 1973): a minták szűrését követően az alga sejtek fikocianin tartalmát 5 párhuzamos fagyasztási-olvasztási ciklusban vontuk ki. A mintákat –20°C-on fagyasztottuk és 9±1°C-on, termosztátban olvasztottuk ki (NESLAB RTE 17).

2) Dörzsmozsaras homogenizálás: a centrifugált mintát jégben hűtött dörzsmozsárban homogenizáltuk (~5 percig). Az egyes dörzslési ciklusokat követően a mintát centrifugáltuk; a felülúszóból meghatároztuk a fikocianin koncentrációját, a visszamaradt extraktumot további ciklusokban újra homogenizáltuk. A ciklusok számát addig növeltük, míg a fikocianin koncentrációja még mérhető volt a felülúszóban (esetünkben 5 ciklus/3 párhuzamos)



1. ábra:

### Az alkalmazott extrakciós módszerek sematikus ábrája.

3) Ultrahangos homogenizálás (Cole Parmer Instrument Ultrasonic Homogenizer 4710, normal szonikáló fej, 5 teljesítmény kapcsoló álláson és 50 %-os megszakítási ciklussal): a minták szűrését követően az alga sejteinek összetöréséhez különböző ideig tartó ultrahangos roncsolást alkalmaztunk (0; 15; 30; 45; 60; 90 és 120 mp/3 párhuzamos).

4) Forgóképes homogenizálás (Polytron Homogenizer PT 10-35; 710 W): a centrifugált mintát különböző ideig tartó homogenizáltuk (0; 15; 30; 45; 60; 90 és 120 mp).

5) Kombinált módszer ('1' és '3' módszer kombinálva): a mintát GF/C-n szűrtük, –20°C-on egyszer fagyasztottuk majd termosztátban olvasztottuk. A fikocianin sejtől való kinyeréséhez a mintákat különböző ideig szonikáltuk a 3. pontban leírt beállításoknak megfelelően (0; 15; 30; 45; 60; 90 és 120 mp/3 párhuzamos).

A különböző extrakciós módszereket követően a mintákat szűréssel (kivéve '2'-módszer esetében centrifugálással) tisztítottuk. A fikocianin mennyiségi meghatározása során a mérésekhez Shimadzu UV-1601 spektrofotométert és Siegelman & Kycia (1978) egyenletét használtuk:

$$C\text{-fikocianin (PC)} = (A_{615} - 0,474 \cdot A_{652}) / 5,34.$$

ahol: A<sub>615</sub>: a mért abszorbancia 615 nm-en; A<sub>652</sub>: a mért abszorbancia 652 nm-en egy cm-es küvetében.

### Természetes vízminta elemzése

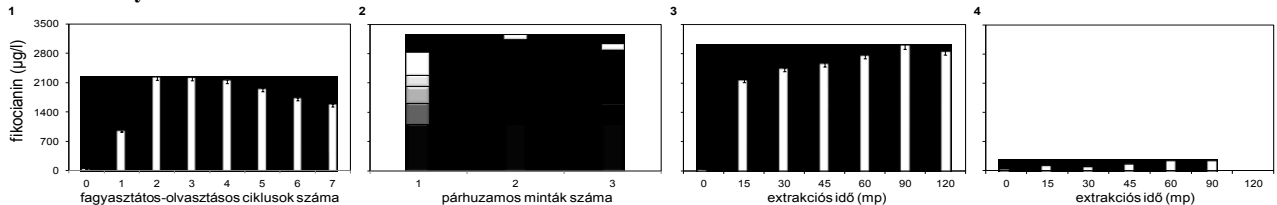
2010 augusztusában a Balaton négy medencéjéből gyűjtött vízminták (merített, ~ 40 cm vízmélységből) fikocianin koncentrációját '1' és '5' módszer szerint határoztuk meg és a kapott eredményeket összevetettük a mikroszkóppal meghatározott cianobaktérium biomasszával.

A '3' és '5' módszer hatékonyságát laboratóriumi és természetes körülmények között is vizsgáltuk. Kísérleteink során különböző alga-biomassa és faji összetétellel jellemezhető természetes vizekből (Pátkai-tározó, Zámolyi-tározó, Kis-Balaton Ingói-berek és Balaton Keszthelyi-medence) gyűjtött mintákkal és a fent említett négy cianobaktérium fajjal is dolgoztunk.

#### Biomassa számolás

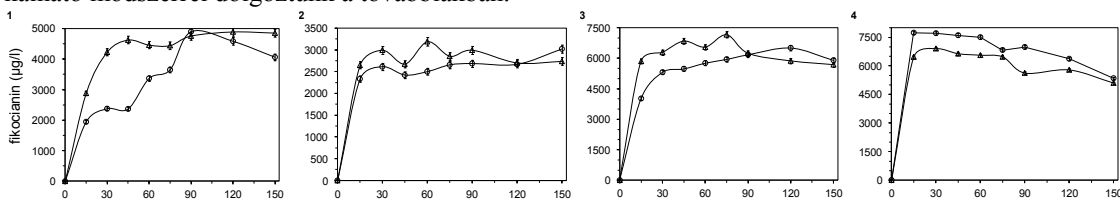
A mintákat Lugol-oldattal tartósítottuk a fitoplankton összetételét és mennyiségét mikroszkóppal határoztuk meg (Utermöhl, 1958).

#### Eredmények és értékelésük



2. ábra: Négy extrakciós módszer ('1-4') hatékonysága a *Cylindrospermopsis raciborskii* tenyészeténél: 1) fagyasztás-olvasztás módszer, 2) dörzsmozsaras homogenizálás, 3) ultrahangos homogenizálás, 4) forgóképes homogenizálás.

A fagyasztás-olvasztás módszernél és az ultrahangos homogenizálásnál az extrakciós időt növelve, kezdetben növekvő fikocianin koncentráció figyelhető meg (1. ábra: 1, 3), majd –feltehetően a bomlás következtében– folyamatos csökkenés. A fagyasztás-olvasztás módszernél a kinyerhető fikocianin koncentráció a 2. ciklusban elérte maximumát ('2' módszer 68 %-a, ~2200 µg/l), majd a következő ciklusoktól folyamatos csökkent. Ez a csökkenés kezdetben néhány tízed % volt, ami az 5. ciklusnál már elérte a 15 %-ot. Ebből látható, ha rosszul választjuk meg –pl. irodalmi adatok alapján, (pl.: Sarada és mtsai, 1999)– az extrakciós ciklusok számát, akkor jelentős fikocianin koncentráció csökkenéssel kell számolnunk. Az ultrahangos homogenizálás esetében egy viszonylag nagy időintervallum áll rendelkezésre a maximálisan kinyerhető fikocianin tartalom elérésére. Mindkét módszer könnyen reprodukálható (c.v. = 2,94%), egyszerű és költséghatékony, azonban a fagyasztás-olvasztás módszernél az optimális ciklus számát befolyásolhatja az adott víztér biomassa és faji összetétele is. Az ultrahangos homogenizálás 25 %-kal nagyobb mennyiségű fikocianin kinyerését tette lehetővé, mindamellett, hogy a legkevesebb időt vette igénybe. A dörzsmozsaras homogenizálás és az ultrahangos roncsolás hatékonysága közötti különbség 5 % körüli volt, így ez utóbbi reprodukálható módszerrel dolgoztunk a továbbiakban.



3. ábra: Az ultrahangos roncsolás ('3' módszer; háromszöggel jelölve) és a kombinált módszer ('5' módszer; körrel jelölve) összehasonlítása négy cianobaktérium faj esetében: 1) *Cylindrospermopsis raciborskii*, 2) *Anabaena spiroides*, 3) *Aphanizomenon flos-aquae*, 4) *Aphanizomenon issatschenkoi*.

### Extrakciós módszerek összehasonlítása

Számos fikocianin extrakciós protokoll létezik az irodalomban, melyek többsége tengeri, egysejtű (coccoid) cianobaktérium fajok fikocianin tartalmának kinyeréséről szólnak. Kísérleteink során az irodalomban található négy extrakciós módszer hatékonyságát hasonlítottuk össze, melynek során a *Cylindrospermopsis raciborskii* fonalas nitrogénkötő cianobaktérium (kl-a 575 µg/l, 20-20 ml szűrlet) ugyanazon tiszta tenyészetével dolgoztunk.

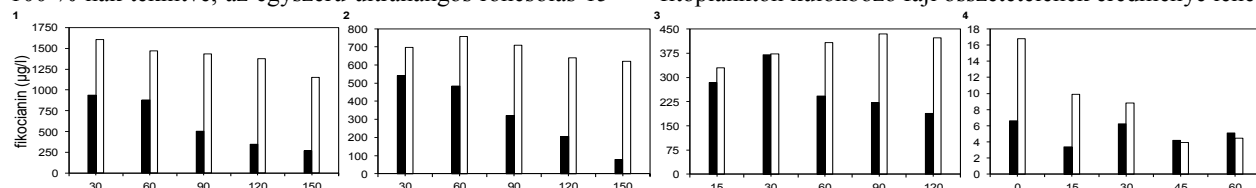
A fent leírt módszerek közül a forgóképes homogenizálás volt a legkevésbé hatékony (2. ábra); a maximálisan kinyerhető fikocianin tartalom alig 10%-át lehetett ily módon kivonni a sejtekből. A dörzsmozsaras homogenizálás során értük el a legnagyobb fikocianin koncentrációt (3213 µg/l), azonban rendkívül idő- és munkaigényes feltárásnak bizonyult, valamint nehézkes és nem reprodukálható; az egyes párhuzamos extrakciók ciklusai közötti relatív szórások 5 és 73 % között változtak.

A Balatonban dominánsan előforduló négy cianobaktérium faj esetében vizsgáltuk az egyszerű fagyasztás hatását a fikocianin kinyerésére (3. ábra).

Downes és Hall (1998) szerint az extrakció hatékonysága az alkalmazott szonikálási időtől és a szonikáló teljesítmény beállításától függ. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy ugyanolyan beállítások mellett, a fajok mechanikai hatással szembeni ellenálló képessége is befolyásolja a feltárás idejét. Fajtól függően esetünkben 15–90 mp között változott az optimális roncsolási idő. Kísérleteink során a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejteinek összetörése vette igénybe a legtöbb időt, ami ~1000 µg/l kl-a koncentráció mellett 90 mp volt. Ezt az *Aphanizomenon flos-aquae* (~500 µg/l-1 kl-a) és az *Anabaena spiroides* (~800 µg/l-1 kl-a) követte. E két utóbbi esetében kevesebb, mint egy perc elegendő volt a maximális pigment tartalom kinyeréséhez, míg az *Aphanizomenon issatschenkoi*-nál ez mindössze 15 mp volt (1500 µg/l kl-a). Ez utóbbi faj volt az egyetlen a vizsgáltak közül, mely fikocianin koncentrációja a fagyasztást követően kevesebb volt az egyszerű szonikáláshoz képest. Ez az eredmény is alátámasztja ezen faj „érzékenységet” mechanikai hatással szemben. A többi vizsgált faj esetében a kombinált módszer 0,1–9 %-al magasabb fikocianin koncentrációt eredményezett.

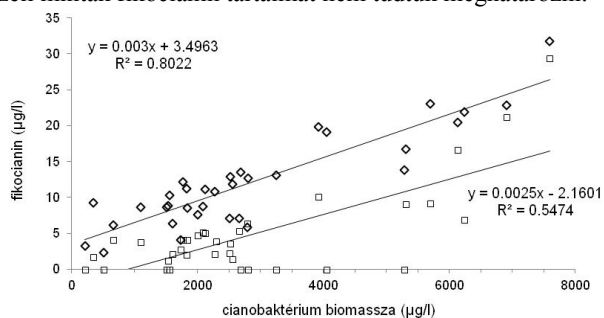
Az eltérő biomasszájú és faji összetétellel rendelkező természetes vízminták esetén (4. ábra) a fent említett két módszer ('3' és '5') közötti különbség szembetűnőbb, mint az állandó laboratóriumi körülmények között tenyésztett cianobaktérium fajoknál.

A kombinált módszerrel kinyert fikocianin koncentrációt 100 %-nak tekintve, az egyszerű ultrahangos roncsolás 15–



4. ábra: A fagyasztás-olvasztás (fekete oszlopok) és kombinált módszerek (fehér oszlopok) összehasonlítása: 1) Pátkai-tározó, 2) Zámolyi-tározó, 3) Kis-Balaton Ingói-berek, 4) Keszthelyi-medence esetében.

2010-es kísérletorozatunkban a Balaton négy medencéjéből származó 35 felszíni vízminta esetében először nyílt lehetőségünk a fent említett két módszer hatékonyságának összehasonlítására és mikroszkóppal meghatározott biomasszával való összevetésére. (5. ábra). A fagyasztás-olvasztás módszerrel a minták közel 1/3-ánál a fikocianin tartalom nem érte el a kimutatási határértéket, annak ellenére, hogy a cianobaktériumok részeseége az alga biomasszából esetenként meghaladta a 90 %-ot is (14–93 %). Ezen minták 2/3-ánál a domináns cianobaktérium faj az *Aphanizomenon issatschenkoi* volt. A kombinált módszer viszont sokkal érzékenyebbnek bizonyult, valamennyi minta fikocianin tartalma kinyerhető és mérhető volt. Mindkét módszerrel kapott fikocianin tartalmat összevetettük a valós cianobaktérium biomasszával (4. ábra). A kombinált módszerrel sokkal szorosabb összefüggést kaptunk ( $r^2=0,8022$ ), mint a fagyasztás-olvasztás módszerrel ( $r^2=0,5474$ ), mellyel a part közeli minták fikocianin tartalmát nem tudtuk meghatározni.



5. ábra: A fagyasztás-olvasztás (négyzettel jelölt) és a kombinált (rombuszsal jelölt) módszerrel kapott fikocianin koncentráció és a mikroszkóppal meghatározott biomassza mennyisége közötti összefüggés a Balaton felszíni vízmintáiban.

Bár az ultrahangos roncsolással önmagában közel ugyanazon hatékonyságot el lehet érni, mint a kombinált módszerrel (2. ábra: állandó körülmények között szaporított fajok esetében), ez utóbbi több előnyt ad a mintafeldolgozás során. A minták fagyasztása alkalmas ad a későbbi pigment meghatározásra, lehetőséget biztosítva az extrakciós idő op-

65 %-kal kisebb hatékonyságú volt. Ezek az eredmények az adott élőhely alga biomassza nagyságától függetlenül alakultak így (kl-a koncentrációk: Pátkai-tározó 515 µg/l, Zámolyi-tározó 373 µg/l, Kis-Balaton Ingói-berek 187 µg/l és Keszthelyi-medence 24,8 µg/l). Az eltérő extrakciós időnél jelentkező fikocianin maximumok pedig a fentiek alapján a fitoplankton különböző faji összetételének eredménye lehet.

timalizálására, melyet a biomassza nagysága és faji összetétele alapvetően befolyásol, továbbá rövidebb ideig tartó szonikálást tesz lehetővé, mely csökkenti az ultrahangos roncsolás során bekövetkező hőmérséklet-emelkedésből adódó pigment bomlást.

Az általunk kidolgozott kombinált módszerrel elért eredményeink ( $r^2=0,8082$ ) jó alapot szolgáltathatnak a fikocianin koncentrációja és a cianobaktérium biomassza közötti viszonyzás leírására.

#### Köszönetnyilvánítás

Jelen munka a KTIA–OTKA CNK–80140, a NERC-ARF & NERC FSF (EU10/03) és a TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0038 számú pályázatok támogatásával valósult meg.

#### Irodalom

- BENNETT, A. & BOGORAD, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58: 419–435.
- DOWNES, M. T. & HALL, J.A. (1998). A sensitive fluorometric technique for the measurement of phycobilin pigments and its application to the study of marine and freshwater picophytoplankton in oligotrophic environments. *Journal of Applied Phycology*, 10: 357–363.
- GREGOR, J. & MARŠÁLEK, B. (2005). A simple in vivo fluorescence method for the selective detection and quantification of freshwater Cyanobacteria and Eukaryotic Algae. *Acta Hydrochimica Hydrobiologica* 33: 2, 142–148.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY J.B., HERDMAN M. & STANIER R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1-61.
- SARADA, R., PILLAI, M.G. & RAVISHANKAR, G.A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina sp.*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem* 34: 795–801.
- SEPPÄLÄ, J., YLÖSTALO, P., KAITALA, S., HÄLLFORS, S., RAATEOJA, M. & MAUNULA, P. (2007). Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 73: 489–500.
- SIDLER, W.A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In: BRYANT D.A. (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 139-216.
- SIEGELMAN, H. & KYCIA, J.H. (1978). Alga biliproteins. In: *Handbook of phycolological methods: physiological and biochemical methods/eds. HELLEBUST, J.A. & CRAIGIE, J.S.*, 1978 Cambridge University Press, 72–78.
- SIMIS, S.G.H., PETERS, S.W.M. & GONS, H.J. (2005). Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water. *Limnology and Oceanography* 50: 237–245.
- UTERMÖHL, H. (1958). Zur Vollkommenheit der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 9: 55–57.
- WATRAS, C.J. & BAKER, A.L. (1988). Detection of planktonic cyanobacteria by tandem in vivo fluorimetry. *Hydrobiologia* 169: 77–84.
- WILLIAMS, R.C., GINGRICH, J.C. & GLAZER, A.N. (1980). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Cell Biology* 85: 558–566.

#### Phycocyanin extraction methods and its application in freshwaters with different trophic states

Hajnalka Horváth, Attila W. Kovács, Lajos Vörös, Eszter Zsigmond and Máttyás Présing

**Abstract** Phycocyanin (PC) is one of the water-soluble accessory pigments of cyanobacteria species which concentration is used to estimate the presence and relative abundance of cyanobacteria. A number of studies have been published on phycocyanin extraction methods, but there is no standard protocol for PC extraction from cyanobacteria cells. After several experiments with four filamentous N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria strains (*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena spiroides*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Aphanizomenon issatschenkoi*), the effectiveness of four selected extraction methods (repeated freeze-thaw method, homogenization with mortar and pestle, Ultrasonic and Polytron homogenizer) was compared with the culture of *C. raciborskii*. It was found that the extraction efficiency of phycocyanin was the highest (of the methods compared) when a single freezing-thawing cycle was followed by sonication (25% more yield was extracted than with freezing-thawing method alone). Applying this combined method to surface water of Lake Balaton, a good correlation was found between PC concentration and cyanobacterial biomass ( $r^2 = 0.8082$ ). It has been shown that the combined method could be suitable to measure cyanobacteria PC content and estimate contribution of cyanobacteria to total biomass.

**Keywords:** *ylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena spiroides*, phycocyanin, extraction methods.