

## 1. Bevezetés és célkitűzés

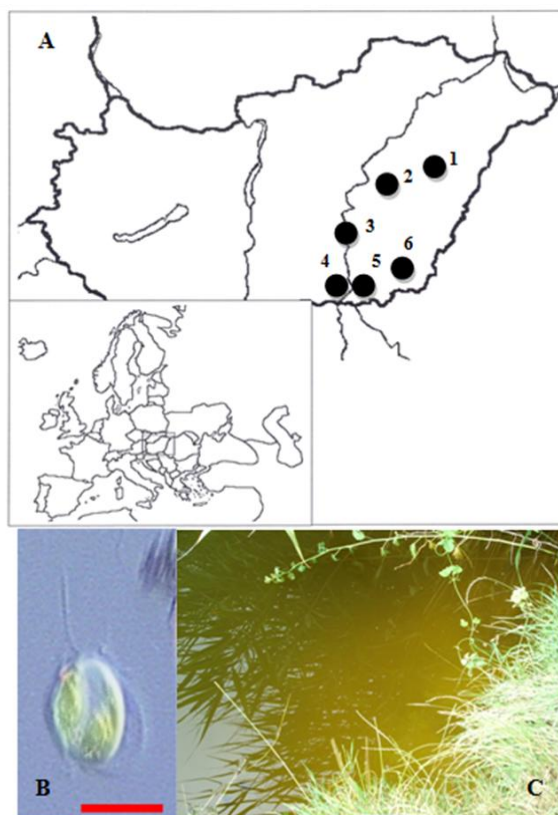
Az elmúlt néhány évtizedben széles körben elterjedt az a felismerés, hogy az eutrofizáció következményeként felszíni vizeinkben megjelenő algatoxinok komoly természetvédelmi, humán-egészségügyi problémaként is jelentkezhetnek. A tömegesen megjelenő fotoszintetizáló planktonikus szervezetek egy része nagy választékban termelnek szokatlan metabolitokat, amelyeknek természetes funkciója nem világos, jóllehet több közülük hatással van más élőlényekre. E toxinok, mind kémiai, mind toxikológiai szempontból a természetes toxinok egy igen változatos csoportját képviselik.

A pályázat fő célja az algavirágzások toxin-variabilitásának tanulmányozása, azon belül is elsősorban a cianobakteriális toxintermelés sajátosságainak és következményeinek kutatása mérsékeltövi kontinentális vizek kapcsán.

## 2. A *Prymnesium parvum* toxintermelése

*Prymnesium* algavirágzás során a víz arany-, vagy sárgásbarna színűvé válik, habzás akkor fordul elő, amikor a víz hullámzik. A nagyszámú aranyalga virágzások és azokkal járó következmények jól szemléltetik, hogy világméretű jelenséggel van dolgunk és a toxikus algavirágzásokat előidéző fajokon belül is kifejezetten komoly károkat okozó a *Prymnesium parvum* tömeges elszaporodása.

A hajdúszoboszlói Téglagyári Öregtávon különböző halfajok tömeges pusztulását figyeltük meg 2005. július 6.-án. Az elpusztult egyedek kopolyúfedőin és a végbélnyílásuk környékén jellegzetes bevérvéseket észleltünk. Az élő egyedek jelentős része pipált, illetve partközeli koordinálatlan mozgás volt rájuk jellemző. Vízkémiai paraméterek alapján a halpusztulás az oldott oxigén illetve az ammónia tartalom alapján nem volt magyarázható, azonban feltűnő volt a víz magas vezetőképessége.



**1. ábra.** Halpusztulással járó *Prymnesium parvum* algavirágzások, magyarországi vizekben (A) 1: Téglagyári Öregtó (Hajdúszoboszló, 2005), 2: Halastó (Kisújszállás, 2009), 3: Pankota tó (Szentés), 4: Kovács tó (Sándorfalva, 1996), 5: Téglagyári Dögös tó (Makó, 1995, 2010), 6: Horgásztó (Battonya, 1997). *P. parvum* két ostorral a rövidebb haptónémával és a jellegzetes bab alakú sárgászöld kloroplasztisszal (B) 40 millió per literes egyedszámmal bíró *P. parvum* virágzás aransárga színe az Öregtávon (Hajdúszoboszló, 2005).

Ezzel párhuzamosan a tó vize jellegzetes aranysárga elszíneződést mutatott (1. ábra) egy, a víztérben tömegesen megjelenő planktonikus eukarióta szervezetnek köszönhetően. A szervezetet fénymikroszkóppal történő határozás során *Prymnesium parvum* Carter-ként határoztuk, amelynek egyedei 35-40 millió/l egyedszámban voltak jelen a merített vízmintában. A merített vízminta töményítés nélkül is extrém mértékű toxikológiai eredményeket adott.

A Hajdúszoboszlón bekövetkező virágzást követően áttekintettük a régióinkban, az elmúlt években történt hasonló eseteket. Az adatok alapján jól látható, hogy elsősorban lúgos karakterű, a szokásosnál magasabb vezetőképességgel rendelkező vizekben jelent meg a faj viszonylag nagy számban.

Az elvégzett hemolitikus tesztek alapján felmerült a proteáz hatású anyagok vizsgálata, melyeket a szervezete tömeges elszaporodása kapcsán még nem vizsgáltak. A tömeges halpusztulásokat előidéző *P. parvum* vízvirágzásokból gyűjtött terepi minták („P1” és „P5” jelűek), valamint a laboratóriumi referenciatörzs-tenyészetünk (UTEX no. 2797) mintáit elemezve 14-20 zselatinbontó enzimaktivitással rendelkező fehérjesávit detektáltunk a géleken, közöttük azonos molekulatömeggel rendelkezőket, 1. táblázat). Specifikus aktivitásuk a különböző mintákban természetesen mutatott különbségeket, hiszen arányuk az egységnyi fehérjetartalmú mintákban sok tényezőtől függ (tenyészet kora, állapota, stb.). A terepi minták legtöbb proteázának működéséhez az optimális pH: 8,0-9,0, ami jó egyezést mutatott a vízvirágzás során mért vízkémiai adatokkal.

**1. táblázat.** Különböző magyarországi tavakból gyűjtött *P. parvum* minták (P1: Hajdúszoboszló és P5: Makó) és a laboratóriumi körülmények között nevelt *P. parvum* (UTEX no. 2797 törzs) azonos relatív molekulatömeggel jellemezhető zselatinbontó proteáz enzimei (pH: 8,0; Vasas et al., 2012).

relatív molekula- tömeg (kDa)	<i>Prymnesium</i> <i>parvum</i> tenyészet „UTEX”	„P1” terepi minta	„P5” terepi minta
≥125	+++	+++	++
120 ± 1.0		+	+
115 ± 2.0	+	+	+
108 ± 2.0	+	+	+
104 ± 1.0	+	+	+
95 ± 3.0	+	+	+
86 ± 2.0	+	+	+
80 ± 3.0	+	+	+
70 ± 2.0	+	+	+
64 ± 2.0	+		+
62 ± 2.0	+	+	
53 ± 3.0	+(E)	+	+ / +++
46 ± 3.0	+	+	+
38 ± 3.0	+	+	+
35 ± 0.5	+	+	+
33 ± 1.5			+
18 ± 1.0	+		+

\*+: a géleken magas zselatinbontó aktivitást mutató proteáz, (E): csak a tenyészet felülúszó frakciójában detektálható, extracelluláris proteáz, ++/+++: dupla vagy tripla sáv

Az UTEX tenyészet 10 és 21 napos mintáinak sejt- és felülúszó frakciója zimogramjait összehasonlítva az izoenzim mintázatokban különbségeket detektáltunk; a 10. napon a sejtfrakció mintájában a 115, 108, 104, 80, 62 és 38 kDa relatív molekulatömegű proteázok mutattak magas aktivitást, míg 11 nap múlva ezek a proteázok nem, vagy alig voltak detektálhatók. Míg a 108, 80, 62, 46 és 38 kDa proteázok lecsökkentek a sejtek mintáiban, megjelentek és magas aktivitást mutattak a felülúszókban. Az 53±3 kDa molekulatömegű proteázt csak a felülúszóból detektáltuk.

Eredményeink felhívták a figyelmet a tömeges halpusztulással kísért *P. parvum* vízvirágzások kárpát-medencei előfordulására és az ezeket kísérő magas proteáz-aktivitás jelenségére.

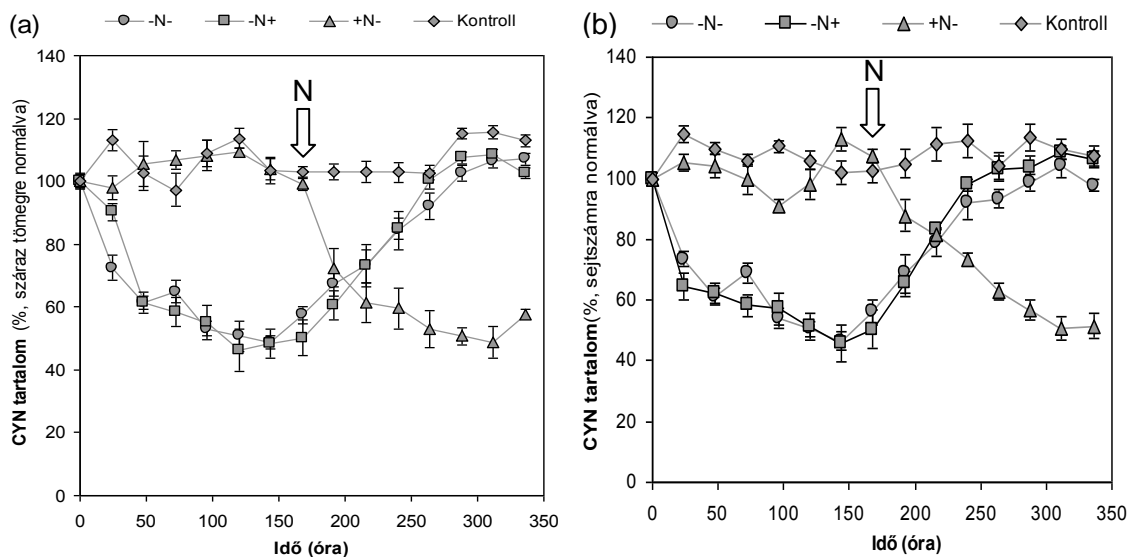
Tekintve, hogy a *P. parvum* proteázok az extracelluláris frakcióból is kimutathatók, azaz a toxinokhoz hasonlóan kikerülnek a sejtekből és jelentős koncentrációt érhetnek el a vízterben, valamint működésük pH optimuma egybeesik a vízvirágzások mintáinak pH értékeivel, valószínűsíthető, hogy működésükkel hozzájárulnak a *P. parvum* okozta sokrétű mérgezési tünetek kialakításához.

Vasas, G., M-Hamvas, M., Borics, G., Gonda, S., Máthé, Cs., Nagy, Zs. L. (2012) Occurrence of a toxic *Prymnesium parvum* bloom with high protease activity is related to fish mortality in Hungarian ponds *Harmful Algae* 17, 102-110. IF<sub>2014</sub>: 3.874

### 3. A Nitrogénéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cilindrospermopszin termelésre

A vízvirágzások kialakulásában a felvehető nitrogén mennyisége az egyik legfontosabb tényező. Mind környezetvédelmi, mind ökofiziológiai szempontból fontos és érdekes kérdés a különböző tápelemekkel való ellátottság és a cianobakteriális toxintermelés közötti összefüggések vizsgálata, különösen annak figyelembe vételével, hogy a cilindrospermopszint termelő szervezetekkel kapcsolatban kevés ilyen irányú ismeret és adat található az irodalomban.

Korábbi munkánk során a kén-, a foszfor-, jelen pályázati időszakban a nitrogénéhezés toxintermelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk az ILC-164 *Aphanizomenon ovalisporum* toxikus cianobaktérium törzs esetében. A toxintartalomra vonatkozó vizsgálataink eredményei szerint a nitrát hiánya a cilindrospermopszin tartalom csökkenéséhez vezet az *A. ovalisporum* sejtekben. Ha a toxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg, a nitrát hiányában volt a legkisebb mértékű a toxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 39-40%-kal csökkent 2 nap alatt). Nitrogénéhezés során a 6. naptól a cilindrospermopszin mennyisége újra megnövekedett, ami a törzs nitrogénkötő képességével magyarázható. Amennyiben a toxintartalmat sejtszámra vonatkoztatva számítjuk, nincs számottevő különbség a kénéhezés és a foszforéhezés között; a cilindrospermopszin 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 (2. ábra). Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a nitrát hiányában differenciálódó heterociszták nem tartalmaznak cilindrospermopszint, azaz anyagcseréjük a másodlagos anyagcseretermékek termelése tekintetében is átalakul.



2. ábra. (a) A cilindrospermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatva az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben a nitrátéhezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindrospermopszin mennyisége 4,84  $\mu\text{g mg}^{-1}$  száraz tömeg (a), illetve 1,89 pg per sejt (b). Ezeket a mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindrospermopszin tartalmat. A nyíl a nitrát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet 2% oldott nitrogént tartalmazó médiumba való átoltásának időpontját jelöli.

A cianobakteriális toxintermelés vizsgálata során kevés környezeti faktorról sikerült bizonyítani, hogy a toxintermelést jelentősen befolyásolja, különösen igaz ez a cilindropermopszin termelő cianobaktériumokra. Az esetek nagy többségében a toxintartalom szoros összefüggést mutatott a növekedési rátával. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium cilindropermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken (2. ábra). Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtekben csökken a cilindropermopszin mennyisége.

Vasas, G., Surányi, Gy., Bácsi, I., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Gonda, S., Borbely, G. (2013) Alteration of cylindropermopsin content of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria, Nostocales) due to step-down from combined nitrogen to dinitrogen *Advances in Microbiology* 3, 557-564.

## Mikrocisztinek, mikrocisztin-termelők előfordulásai

A magyarországi vízterekben 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.

Vizsgálataink alapján a *Microcystis* fajok által okozott virágzások toxikusabbnak bizonyultak, összevetve más cianobaktérium nemzetségekével. Az IC<sub>50</sub> érték 245 µg/ml volt a legtoxikusabb minta esetében, amit a Bárdos-tóból gyűjtöttünk. Egyetlen *M. aeruginosa* esetében nem mértünk toxintartalmat, amely az Ónod-tóból származott. A kalkulált IC<sub>50</sub> értékek jól korrelálnak a mért MC tartalommal. A legmagasabb értéket a Bárdos-tóból mértünk. 12 különböző MC variánst azonosítottunk a 14 minta esetében. A leggyakoribb variáns a MC-LR volt, a minták 70%-ban azonosítottuk. MC-LR 7, MC-RR 6, MC-YR 4, MC-WR 4, Dha7-RR 4, and Asp3MC-LR 3 esetben került azonosításra. A toxinvariánsok mellett, a környezeti mintákban megvizsgáltuk a *mcy* génklaszter egyes elemeinek jelenlétét is, az eredmények a toxintartalommal, toxicitással is jól összevethetőek.

A MALDI-TOF analízis segítségével azonosított variánsok nagy száma nem szokatlan, hiszen a jelenleg az ismert MC formák száma meghaladja a százat és több olyan algavirágzásról is beszámoltak, amelyben egy adott pillanatban 50 feletti volt a MC variánsok száma. Néhány alpesi országban (Ausztria, Németország, Svájc) elsősorban a *Planktothrix* fajok a legjellemzőbb MC termelők, de számos európai országban a hazai eredményeknek megfelelően a *M. aeruginosa* a legfőbb toxintermelő.

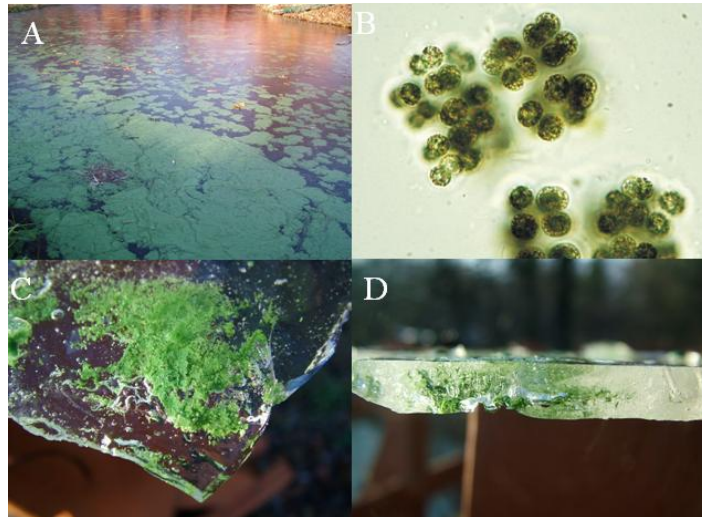
Farkas, O., Gyémant, Gy., Hajdu, G., Gonda, S., Parizsa, P., Horgos, T., Mosolygó, Á., Vasas, G. (2014) Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary *Acta Biologica Hungarica* 65, 227-239. IF<sub>2014</sub>: 0,589

## Toxintermelő *Microcystis* kolóniák azonosítása jégből, egy alternatív áttelelési stratégia.

A *Microcystis aeruginosa* a leggyakoribb és legismertebb virágzást alkotó *Microcystis* faj. A *M. aeruginosa* mellett a *Microcystis viridis* is gyakran jelenik meg a vízben tömegesen és okoz toxikus algavirágzást. A *M. aeruginosa*-hoz hasonlítva sejtjei a kolóniában tömöttebben helyezkednek el, erős nyálkaburok szintén jellemző rá. A morfológiai különbségek mellett molekuláris markerek segítségével is elkülönítették a két fajt.

A legtöbb *Microcystis* kolónia ősszel lesüllyed az üledékbe és a tó alján telel. Az életképesség vizsgálatok azt mutatják, hogy ezek az áttelelő telepek még fotoszintetikusan aktív *Microcystis* kolóniák, de az nem teljesen ismert, hogyan tudnak túlélni a sötét és gyakran anoxikus körülmények között. A legtöbb esetben ez a nagy áttelelő kolóniaszám lesz az oltóanyaga a következő év tavaszától meginduló algavirágzásoknak. A sejtek lecsökkenő sűrűsége, a turbulencia, a megváltozott környezeti viszonyok mind elősegítik a sejtek vízoszlopba, valamint a felszínre történő migrációját.

Egy Debrecen melletti sekély tóban találtunk nagy tömegben a jégbe fagyva *Microcystis* telepeket, melyek jelenléte szokatlan volt (3. ábra). Ahogyan a leírásokból is kiderül amennyiben ezek a sejtek életképesek, úgy azok egy alternatív oltóanyagot jelenthetnek a következő évi algavirágzások számára. Ráadásul, amennyiben ezek a kolóniák toxintermelőek, úgy e képességük a következő évi tömeges megjelenés mérgezőképességét is meghatározza. A vizsgálat célkitűzése volt, hogy azonosítsuk a jégbe fagyott cianobaktérium fajt/fajokat, megvizsgáljuk életképességüket és toxintermelésüket.



**3. ábra.** A Hármashegy tóban (47°33'N, 21°50'E) 2005 telén megjelenő *Microcystis viridis* algavirágzás (A). A jégből izolált *M. viridis* kolóniái (B) és a jégbe fagyott toxintermelő sejtek életképes tömegei.

Az életképesség vizsgálatok során a 7 napos inkubálás után a legtöbb élő telepet a jégből azonosítottuk. Az élő kolóniák 40%-a az üledékből származott, és csak 2 %-a származott a vízoszlopból. A jelenség, hogy a *Microcystis* kolóniák a tó fenekén telelnek át az üledékben, jól ismert. Az sem ismeretlen, hogy egy kis része a *Microcystis* populációnak képes áttelelni a vízoszlopban. Ezzel szemben a jégben áttelelt formákról ezidáig nem volt információnk. Ahogy az eredmények azt mutatják, közel 60%-a az életképes kolóniáknak a tó jégtakarójából volt izolálható.

A toxikológiai vizsgálatok eredményei szerint a jégből gyűjtött sejtömeg mérgezőnek bizonyult. Az eredmények szerint a faj egy viszonylag gyakori variánst tartalmazott, amit MC- RR (M + H = 1039,2)-ként azonosítottunk.

A toxintermelő képesség a jégbefagyott kolóniák esetében azért is érdekes jelenség, mert ma már ismert tény, hogy az algavirágzások nettó toxintermelését a heterogénnek mondható populáció kemotípusainak aránya határozza meg. Tehát az áttelelt kolóniák toxintermelő-képessége, mennyiségi és minőségi viszonyai a következő évi vízvirágzás toxicitását erőteljesen befolyásolhatják.

Vasas G., Bácsi I., Suranyi, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Nagy, S. A., Borbely, G. (2010) Isolation of viable cell mass from frozen *Microcystis viridis* bloom containing microcystin-RR. *Hydrobiologia* 639, 147-151. *IF*<sub>2014</sub>: 2,275

### ***M. aeruginosa* tömeges megjelenése egy kerti tóban és a cianobakteriális toxinok hatásvizsgálatai növényi rendszereken**

Munkánk során egy szegedi kerti dísztóból származó vízmintában azonosítottuk a jelenlévő cianobaktérium fajokat. Fénymikroszkóppal történő határozás után megállapítottuk, hogy a kerti tóban történt vízvirágzást *Microcystis* fajok tömeges elszaporodása okozta. A vízvirágzás-minta toxicitását

vizsgáltuk mustár csíranövény-teszttel (, valamint fűmagkeverékkel végzett tesztek segítségével. A locsolás hatását laboratóriumi körülmények között modelleztük az angol perje (*Lolium perenne*) növekedésére gyakorolt hatások tanulmányozásával. A sejttömeg liofilizátumából készült extraktum különböző koncentrációival végzett kísérleteink erőteljes gátló hatást mutattak ki mind a mustár csíranövények, mind az angol perje (*Lolium perenne*) gyökér- illetve hajtáshosszainak növekedésében.

A növénytesztek által kimutatott toxicitást az analitikai vizsgálatok igazolták; a kerti tóban lezajlott vízvirágzás mintában 9 mikrocisztin variánst mutattunk ki, közülük négyet szerkezetileg is azonosítottunk. Megállapítható, hogy nagyszámú mikrocisztin variáns és magas összmicrocisztin koncentráció (0,1 g/l összes - szabad és a sejtekben együttesen mérhető - MC-LR ekvivalens mennyiség) áll a szegedi kerti tóban bekövetkezett vízvirágzás erősen toxikus hátterében.

Az algaltoxinok hatásmechanizmusának kísérletes vizsgálata témakörében a mikrocisztin és a cilindropermopszin toxinokat tanulmányoztuk. A hatásaikat *in vivo* és *in vitro* körülmények között vizsgáltuk állati és növényi tenyészetekben. Publikációinkban elsősorban a toxinok citoskeletáris rendszerre valamint a növények abnormális gyökérképződésére hívják fel a figyelmet.

Bácsi, I., Surányi, G., Gonda, S., Gyémánt, Gy., Vasas, G. (2011) Observation of sward destruction caused by irrigation with toxic *Microcystis* morphospecies containing water in southern Hungary Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 86, 232-237. IF<sub>2014</sub>: 1,255

M-Hamvas, M., Mathe, Cs., Vasas, G., Jámbrík, K., Papp, M., Beyer, D., Meszaros, I., Borbély, G. (2010) *Cylindropermopsin* and *microcystin-LR* alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis Acta Biologica Hungarica 61,(SUPPL. 1) 35-48. IF<sub>2014</sub>: 0,589

Jámbrík, K., Máthé, Cs., Vasas, G., Bácsi, I., Surányi, G., Gonda, S., Borbély, G., M-Hamvas, M. (2010) *Cylindropermopsin* inhibits growth and modulates protease activity in the aquatic plants *Lemna minor* L. and *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel Acta Biologica Hungarica 61,(SUPPL. 1) pp. 77-94. IF<sub>2014</sub>: 0,589

Máthé, Cs., Hamvas, M. M., Vasas, G. (2013) *Microcystin-LR* and *cylindropermopsin* induced alterations in chromatin organization of plant cells: review Marine Drugs 11, 3689-3717. IF<sub>2014</sub>: 2,853

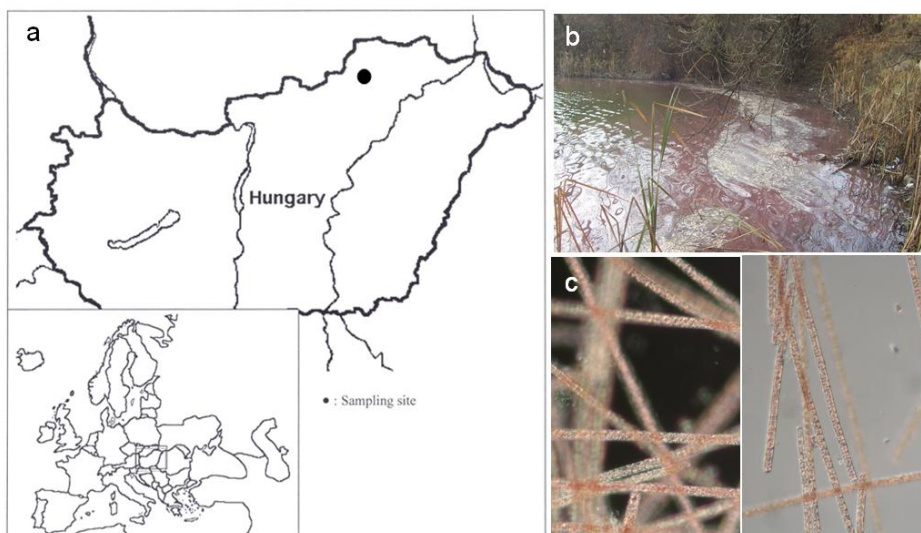
Máthé, Cs., Vasas, G., Borbély, G., Erdődi, F., Beyer, D., Kiss, A., Surányi, G., Gonda, S., Jámbrík, K., M-Hamvas, M. (2013) Histological, cytological and biochemical alterations induced by *microcystin-LR* and *cylindropermopsin* in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedling Acta Biologica Hungarica 64, 71-85. IF<sub>2014</sub>: 0,589

Jámbrík, K., Máthé, C., Vasas, G., Beyer, D., Molnár, E., Borbély, G., M-Hamvas, M. (2011) *Microcystin-LR* induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-preferring nuclease activity in *Phragmites australis* Journal of Plant Physiology 168, 678-686. IF<sub>2014</sub>: 2,557

### **Planktothrix** fajok toxintermelése

A magyarországi vizekben *Planktothrix* fajok által előidézett monocianobakteriális vízvirágzások toxintartalmát és toxintermelő képességét vizsgáltuk. A következő mintavételi helyeken fénymikroszkópos vizsgálattal *Planktothrix agardhii* által okozott vízvirágzást azonosítottunk: Gyula, Hősök-tava; Gyula, Pali-tó; Hajdúhadház, Sipos-tó; Várpalota, Bivalyos-tó; Kis-Balaton. A Szirmabesenyő, Kocka-tó esetében pedig a vörös színű vízvirágzást a *Planktothrix rubescens* cianobaktérium okozta (4. ábra).



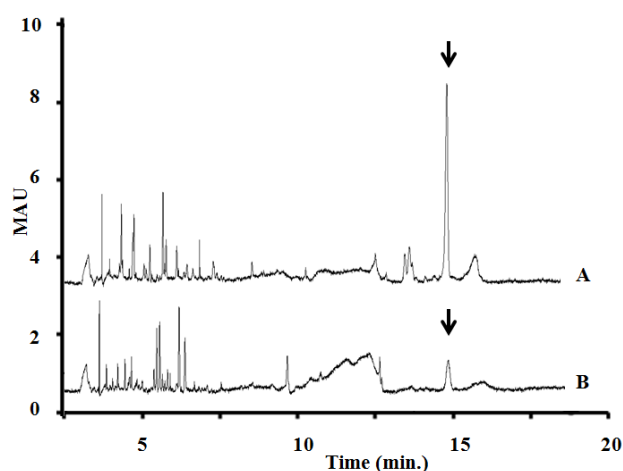


**4. ábra.** (a) A Kocka-tó lokalizációja (b) A *Planktothrix rubescens* virágzása a kavicsbánya tóban (c) A *Planktothrix rubescens* trichomái mikroszkópi képen.

A *Planktothrix rubescens* és a Bivalyos-tóból vett *Planktothrix agardhii* toxikusnak mutatkozott,  $IC_{50}$  értéke (50 %-os növekedésgátlás) 0,35 mg/ml-nek (*P. rubescens*) és 1,2 mg/ml-nek (*P. agardhii*) adódott. A terepi minták közül az egyetlen helyen előforduló *P. rubescens* és a Bivalyos-tóból gyűjtött *P. agardhii* okozta a legnagyobb növekedésgátlást, ami toxinok jelenlétére utalt. A bioteszt eredményeit alátámasztva a *P. agardhii* minták esetében a Bivalyos mintából mértük a legnagyobb MYC tartalmat (Farkas et al., 2014).

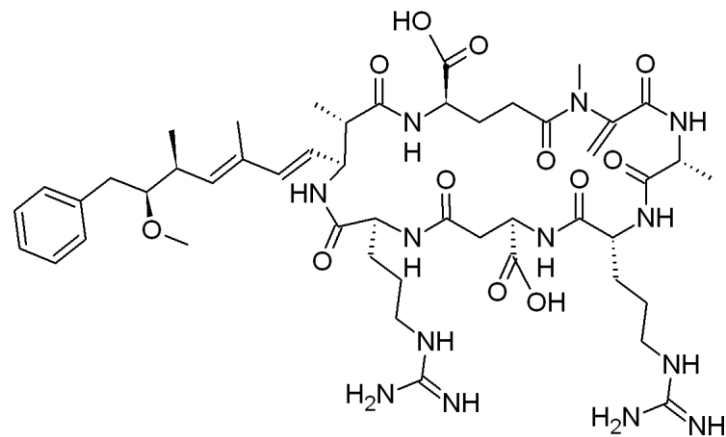
A *P. rubescens* megjelenése és tömeges előfordulása nem nevezhető szokványos jelenségnek hazánkban. Ahogyan bemutattuk, a faj elsősorban valódi rétegzett tavakban szokott tömegesen elszaporodni, Európában leginkább az alpesi országok víztereinek jellemző toxintermelő cianobaktérium faja. Bár hazánkra nem jellemző a tartósan rétegzett alpesi jellegű tavak jelenléte, egyes észak-magyarországi kavicsbányatavak hidrológiai viszonyai kedvező feltételeket teremthetnek az említett fajnak.

A MC tartalom, amit a vízvirágzás mintából meghatároztunk, magasnak számít. Nem csupán *Planktothrix* genusz által okozott tömeges virágzás tömegessége szokatlan, hanem más fajokkal is összevetve a legnagyobb MC tartalmat mutattuk ki a régióinkban, ez az érték nemzetközi viszonylatban is kifejezetten magasnak számít (5. ábra).



**5. ábra.** *P. rubescens* algavirágzás minta kapilláris elektroforézise (A) és az izolált *P. rubescens* BGSD-500 analízise (B). A D-Asp<sup>3</sup>, Mdha<sup>7</sup>]MC-RR toxin nyíllal jelölve. (kapilláris: 64,5 cm, 50  $\mu$ m i.d., puffer: 25 mM borát 75 mM SDS, pH 9,3, alkalmazott feszültség: +25 kV, detektálás UV 238 nm;).

Szerkezetvizsgáló módszerekkel pontosan azonosítottuk a MC variánst, ami a genuszra kifejezetten jellemző demetilált MC-RR forma a [D-Asp<sup>3</sup>, Mdha<sup>7</sup>]MC-RR volt (6. ábra). A meghatározott MC variáns jellemzője, hogy a leggyakoribb MC-LR-hez viszonyítva kevésbé toxikus egérre, ugyanakkor, ahogy részletes vizsgálatok kimutatták más élőlénycsoportokra, mint például az egyes *Daphnia* fajokra éppen az általunk azonosított variáns minősül toxikusabbnak.



6. ábra. A *P. rubescens*-ből azonosított mikrocisztin [D-Asp<sup>3</sup>, Mdha<sup>7</sup>]MC-RR

A *P. rubescens* virágzásból izoláltunk egy laboratóriumban fenntartható törzset (BGSD-500), aminek folyamatosnak mondható toxintermelésének mértéke különbözött a vízvirágzásban mért MC mennyiségi viszonyaitól. Érdekes módon ugyanazt a [D-Asp<sup>3</sup>, Mdha<sup>7</sup>]MC-RR variánst termelte, viszont analíziseink alapján csupán ötödannyi mennyiségben, mint a természetes tömegtermék esetében volt mérhető (8,57 mg/g az vízvirágzásban és 1,85 mg/g az izolált törzsből).

A *Planktothrix rubescens* magyarországi megjelenése azonban figyelemreméltó, tekintve, hogy nem vagyunk alpesi ország, valódi rétegzett mély tavaink száma csekély.

A *Planktothrix rubescens* által előidézett vízvirágzás nem más, mint a populációnak a metalimnionból a vízfelszínre történő vertikális migrációja, amely a sejtek gázvezikuláinak segítségével valósul meg. A vízkémiai paramétereket áttekintve elsősorban a pH, fajlagos vezetőképesség és a összes szerves szén adatait emeljük ki. Természetesen erre a szervezetre is általános érvényű, akárcsak az algatoxin-termelésnél általában, hogy a toxintermelés nem fajhoz köthető, egy adott faj populációi toxikusak, míg mások. Az elvégzett vizsgálatok alapján elmondható hogy a szervezet kivonata a Magyarországon legtoxikusabbnak számító *Microcystis* populációk toxicitásával vetekszik, tömeges megjelenésükkor toxintermeléssel számolhatunk.

Farkas, O., Gyémant, Gy., Hajdu, G., Gonda, S., Parizsa, P., Horgos, T., Mosolygó, Á., Vasas, G. (2014) Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary *Acta Biologica Hungarica* 65, 227-239. IF<sub>2014</sub>: 0,589

Vasas, G., Farkas, O., Borics, G., Felföldi, T., Sramkó, G., Batta, G., Bácsi, I., Gonda, S. (2013) Appearance of *Planktothrix rubescens* bloom with [D-Asp<sup>3</sup>, Mdha<sup>7</sup>] MC-RR in gravel pit pond of a shallow lake-dominated area *Toxins (Basel)* 5, 2434-2455 IF<sub>2014</sub>: 2,938

## 6. A *Cylindrospermopsis raciborskii* toxintermelésének sajátosságai

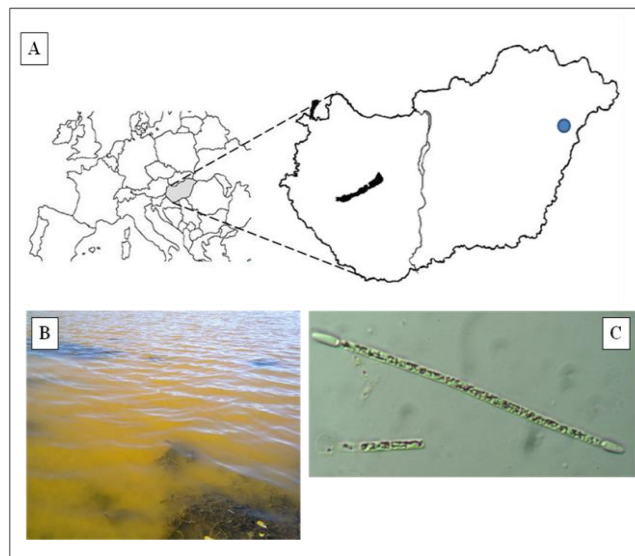
Az elmúlt időszakban feltűnő az egyes vizekben megjelenő nitrogénfixáló szervezetek nagy aránya és azon belül is az invazív *Cylindrospermopsis raciborskii* jelenléte hazai és a világ számos pontján megtalálható vizekben.

11 *C. raciborskii* minta cilindrospermopszin tartalmát vizsgáltunk meg, ebből 10 hazai és egy ausztráliai (AQS) minta volt. Az összes magyarországi minta a toxin termeléséért felelős génekre (PKS és PS gének) nézve negatívnak mutatkozott. Az AQS volt az egyetlen törzs, amiben a gének



jelenlétét igazolni tudtuk. Az *A. ovalisporum*, esetében három izolátumot, a CYN termelő izraeli (IL C-164) törzset és két általunk izoláltat vizsgáltunk meg. Az izraeli és az általunk a spanyolországi Blanesből izolált törzsből a toxin-termelést jelző géneket sikerült kimutatnunk. A magyarországi Szelidi-tóból származó minta esetében ezt nem tapasztaltuk. 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 *C. raciborskii* változatos megjelenésére 2012 novemberében figyelhetünk meg egy példát (7. ábra). Az említett időszakban a Debrecen melletti Fancsika tározó és horgásztóban tonnányi mennyiségű hal pusztult el. A víztérben tömegesen jelentkezett a faj helyenként  $10^6$ /ml-es fonalszámmal. Nemcsak az időszak és kifejezetten magas egyedszámú és homogén megjelenés volt szokatlan, hanem a tömeges megjelenésű biomassza a szokványos zöldes elszíneződés helyett élénk narancssárga színben jelentkezett. A feltehetően alacsony hőmérséklet hatására a fonalakban található klorofill elbomlott, a fonalak lizise beindult és a sejtek beltartalma, részben színanyaga (későbbiekben azonosított karotinoid formák) és értelemszerűen a faj más metabolitjai is szabad állapotban a vízbe kerültek.



**7. ábra.** *Cylindrospermopsis raciborskii* algavirágzás a Fancsika tározóban (A) 2012. november elején. A sejtekben felhalmozott karotinoidoknak köszönhetően a víztér élénk narancssárgára színeződött (B). A *C. raciborskii* fonala a jellegzetes terminális heterocisztákkal.

Jellemző volt, hogy a víz teljes halfaunája (*Sander lucioperca*, *Hypophthalmichthys nobilis* R., *Ctenopharingodon idella* (Valenciennes, 1844) *Cyprinus carpio* L., *Silurus glanis* L., *Ameiurus nebulosus* (Lesueur), *Carassius carassius* L.) kezdett tömegesen elpusztulni, ráadásul a neurotoxikus algavirágzások jellemző „tünete”, elpusztult emlősállatok (jelen esetben elpusztult macskák) is megfigyelhetők voltak a víz partján.

A puhatestű (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*) állatok azonosított központi idegrendszeri neuronjain elektrofiziológiai és farmakológiai eredmények igazolták, hogy az algavirágzásból származó mintákban a neurotoxinok elsődleges célpontja (target) az anatoxin-a típusú cianotoxinokhoz hasonlóan az idegsejtek nikotinerger acetilkolin-receptora (nAChR). Az anatoxin-termelő *Oscillatoria phormosa* PCC 6506 hasonlóképpen előállított kivonata ugyanezekben a sejteken ugyancsak nikotinerger blokkolóknak bizonyult, míg a CYN termelő AQS (20 mg/ml-ig tesztelve) nem váltott ki reprodukálható vagy dóziszfüggő nAChR gátló hatást. Eredményeink alapján a szervezet anatoxin hatású komponens(ek)e)t tartalmaz, melyek a neurotoxikus terepi következményekért felelősek lehetnek.

A *C. raciborskii* tömeges megjelenéseit mérgezések és toxinok előfordulásai kísérték a világ egyes tájain (Ausztrália, Dél-Amerika). Kitüntetett figyelemmel kísérik a faj terjedését minden régióban. Elterjedése és tömeges megjelenései Európa országaiban is gondot okozott. Toxintermelése kifejezetten változatos és a tömeges megjelenésre hajlamos cinaobaktériumokon belül is unikálisnak tekinthető. Az ausztráliai, egyes ázsiai és egyes afrikai törzsek esetében cilindrospermopszin termelést

azonosítottak, míg a dél-amerikai populációk esetében szaxitoxint és annak analógjait detektálták. Európai izolátumok esetében elmondható, hogy különböző biotesztek (egérteszt, mustár csíranövény teszt, izolált neuronok) alkalmazása során egyöntetűen megfogalmazódott, hogy mérgező metabolitokat termelnek egyes izolátumok, de azok nem tartoznak az ismert, már azonosított toxinok közé. Méréseink a cilindrospermopszin termelést kizárják a faj hazai megjelenései kapcsán és egy másik potenciálisan CYN termelő szervezet az *A. ovalisporum* esetében sem igazoltuk azt a hazai megjelenések során. Ugyanakkor a hazai jelentőségen túlmutat a neurotoxikus *C. raciborskii* kemotípus azonosítása, amely megjelenése a tágabb régióra is jellemző lehet, felveti a neurotoxikus forma európai megjelenését és egyértelműen bizonyítja újabb toxincsaládok jelenlétét a fajban.

**Vasas, G., Surányi, G., Máthé, Cs., M –Hamvas, M., Borbély, G. (2010) Investigation of toxin content in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenaya and Subba Raju and *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) strains isolated from shallow lakes of Hungary Acta Biologica Hungarica 61,(SUPPL. 1) 218-225. IF<sub>2014</sub>: 0,589**

**Vehovszky, Á., Kovács, W. A., Farkas, A., Győri, J., Szabó, H., Vasas, G. (2014) Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloom-forming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary Environmental Toxicology DOI: 10.1002/tox.21789. IF<sub>2014</sub>: 3,197**