



**A foszfát-, szulfát-, és nitrátéhezés hatása a
toxikus *Aphanizomenon ovalisporum*
cianobaktérium cilindropermopszin
termelésére**

Doktori (PhD) értekezés

Bácsi István

Debreceni Egyetem, TTK, Növénytani Tanszék
Debrecen, 2007.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK *Biológia* Doktori Iskola *A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai* programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2007. április 16.

.....
Bácsi István

Tanúsítom, hogy Bácsi István doktorjelölt 2002-2005 között a fent megnevezett Doktori Iskola *A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai* programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2007. április 16.

.....
Dr. Borbély György

Tanúsítom, hogy Bácsi István doktorjelölt 2002-2005 között a fent megnevezett Doktori Iskola *A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai* programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2007. április 16.

.....
Dr. Vasas Gábor

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A cianobaktériumok	3
2.1.1. A cianobaktériumokról általában	3
2.1.2. A cianobaktériumok kénanyagcseréje	6
2.1.3. A cianobaktériumok foszforanyagcseréje	9
2.1.4. A cianobaktériumok nitrogén-anyagcseréj	12
2.1.4.1. Az elemi nitrogén megkötése	12
2.1.4.2. A szervesetlen és szerves nitrogénvegyü- letek asszimilációja	16
2.2. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	20
2.3. A vízvirágzások	22
2.4. A cianotoxinok	25
2.4.1. A hepatotoxikus ciklikus peptidok – mikrocisztinok és nodularinok	25
2.4.2. A neurotoxikus alkaloidok – anatoxinok és saxioxinok	26
2.4.3. A citotoxikus alkaloidok	27
2.4.4. A dermatotoxikus alkaloidok – az aplysiatoxinok és a lynbyotoxinok	28
2.4.5. Az irritáló hatású toxinok – a lipopoliszacharidok	28
2.4.6. Egyéb cianobakteriális bioaktív vegyületek	29
2.4.7. A cianotoxinok szintézisének szabályozása, cianotoxinok a környezetben	29
2.5. A cilindrospermopszin	32
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	36
3.1. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyésztése	36
3.2. Fénymikroszkópos morfológiai vizsgálatok	38
3.3. A tenyészetek növekedésének nyomon követése	38
3.3.1. A klorofill-a tartalom meghatározása	39
3.3.2. A száraz tömeg meghatározása	39
3.3.3. A fehérjetartalom mérése	39
3.3.4. A sejtszám meghatározása	40
3.4. A heterociszták izolálása	40
3.5. Enzimológiai vizsgálatok	41
3.5.1. Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának mérése	41
3.5.2. Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának mérése	41
3.5.3. A nitrogenáz enzimkomplex kimutatása nitrogénéhezés körülményei között	42
3.6. A toxintartalom meghatározása	43
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	45
4.1. Az <i>A. ovalisporum</i> fénymikroszkóppal megfigyelhető morfológiai változásai	45

4.1.1. Morfológiai változások kontroll körülmények között	46
4.1.2. Morfológiai változások a kénéhezés során	48
4.1.3. Morfológiai változások a foszforéhezés során	50
4.1.4. Morfológiai változások kötött nitrogén hiányában	53
4.2. Az <i>A. ovalisporum</i> tenyészetek növekedésének nyomon követése	55
4.2.1. Az <i>A. ovalisporum</i> tenyészetek növekedése a kénéhezés körülményei között	55
4.2.2. Az <i>A. ovalisporum</i> tenyészetek növekedése a foszforéhezés körülményei között	59
4.2.3. Az <i>A. ovalisporum</i> tenyészetek növekedése kötött nitrogén hiányában	62
4.2.4. Az <i>A. ovalisporum</i> tenyészetek növekedésének összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között	65
4.3. Enzimológiai vizsgálatok	68
4.3.1. Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának változása	68
4.3.2. Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának változása	70
4.3.3. A nitrogenáz komplex kimutatása a nitrogénéhezés körülményei között	72
4.4. Az intracelluláris cianotoxintartalom változása az <i>A. ovalisporum</i> tenyészetekben	74
4.4.1. A sejtek cianotoxin-tartalmának változása a kénéheztetett <i>A. ovalisporum</i> tenyészetekben	75
4.4.2. A sejtek cianotoxin-tartalmának változása a foszforéheztetett <i>A. ovalisporum</i> tenyészetekben	77
4.4.3. A sejtek cianotoxin-tartalmának változása a kötött nitrogén hiányában nevelt <i>A. ovalisporum</i> tenyészetekben	79
4.4.4. A cianotoxin-tartalom változásának összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között	83
4.5. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tápanyag – ellátottságának és cilindrospermopszin termelésének kapcsolata irodalmi adatok tükrében	85
5. ÖSSZEFOGLALÁS	89
6. SUMMARY	94
7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	99
8. IRODALOMJEGYZÉK	101
9. BÁCSI ISTVÁN TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK JEGYZÉKE	115

1. BEVEZETÉS

Gyakori probléma napjainkban a Föld felszíni vizeinek szennyeződése, és ennek következményei: az élőhelyek drasztikus átalakulása, az élőlények pusztulása, és egyes esetekben a mikrobiális tömegprodukciónak. Az eutrofizációt, mint a környezetszennyezés egyik következményeként számon tartható jelenséget, a 20. század közepén ismerték fel; azóta a jelenség jelentős károkat okozott a vízi környezetben, komoly nehézségek mutatkoztak, és mutatkoznak napjainkban is a vízhasználatban, horgásztavak, természetes fürdőhelyek vizének kezelésében, és sok esetben az ivóvízkezelésben is. A vízhasználatot és -kezelést érintő problémák része az eutrofizáció alkalmával megfigyelhető vízvirágzás, azaz a planktonszervezetek (cianobaktériumok és eukarióta algák) tömeges elszaporodása. A foszfor az egyik legfontosabb elem, amely szerepet játszik a planktonszervezetek tömegprodukciónak szabályozásában, emellett a rendelkezésre álló kötött nitrogén mennyisége mutatkozik meghatározónak. Az eukarióta algákkal szemben a cianobaktériumok több képviselője nitrogénkötő képessége révén független a kötött nitrogén mennyiségétől, ezáltal csökken azon tényezők száma, amelyek együttes megléte szükséges az ilyen fajok tömegprodukciónak kiváltásához.

A közelmúltban terjedt el széles körben az a felismerés, hogy a cianobaktériális toxinok megjelenése a felszíni vizekben humán-egészségügyi problémákat okozhat. A cianobaktériumok számos speciális metabolitot termelnek, amelyeknek természetes funkciója nem világos, jóllehet több közülük kedvezőtlen hatással van más élőlényekre. A cianotoxinok mind kémiai, mind toxikológiai szempontból a természetes toxinok egy igen változatos csoportját képviselik. Az első megismert cianotoxinok sokkal veszélyesebbnek mutatkoztak a szárazföldi gerincesekre, mint a vízi élőlényekre. Néhány cianotoxin erős idegméreg, mások elsősorban a májat károsítják, megint mások gastroenteritis-hez hasonló egészségromlást idéznek elő. A legújabb kutatási eredmények azt bizonyítják, hogy a cianotoxinok hatással lehetnek a fito- és zooplankton képviselőire és a magasabb rendű növényekre is. A cianotoxinok az elpusztuló baktériumsejtekből a vízbe kerülve a vizet fogyasztó vad- és

haszonállatokra, de a vezetékhalózatra kerülve az emberre is potenciális veszélyt jelenthetnek.

Az ezerkilencszáz-nyolcvanas években az ún. egérteszt segítségével vizsgálták a cianotoxinok hatásmechanizmusát, és azt, hogy milyen összefüggés van a cianotoxinok koncentrációja és a felszíni vizek élőlényekre gyakorolt hatása között. A toxinok mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek csak a nyolcvanas évek második felében váltak elérhetővé és a specifikus cianotoxinok tanulmányozása azóta is tart.

A cianobakteriális toxintermelés vizsgálata során kevés környezeti faktorról sikerült bizonyítani, hogy a toxintermelést jelentősen befolyásolja, különösen igaz ez a cilindrospermopszin termelő cianobaktériumokra. Sok tekintetben nyitott a kérdés, hogy vajon bizonyos környezeti tényezők változása hatással van-e az egyes sejtek toxintartalmára? Mivel nem világos a toxinok ökológiai szerepe, a toxicitást növelő vagy csökkentő ökológiai faktorok vizsgálata nem könnyű feladat.

Munkánk célja az, hogy megvizsgáljuk, hatással van-e a szulfát- és a foszfátéhezés, illetve a kötött nitrogén hiánya az *Aphanizomenon ovalisporum* fonalas, nitrogénkötő cianobaktérium faj toxintermelő törzsének cilindrospermopszin termelésére. A kén hiányában bekövetkező változások tanulmányozását az is indokolja, hogy a vizsgált törzs által termelt cilindrospermopszin kéntartalmú cianotoxin. Így a kénéhezés vizsgálata mind a primer anyagcsere folyamatairól, mind a szekunder metabolit termelésről értékes információkat szolgáltat. A foszfát, valamint a kötött nitrogén hiányában bekövetkező változások vizsgálata további új ismereteket adhat egy cilindrospermopszin termelő cianobaktérium törzs toxintermelésével kapcsolatban. Munkánk célja, a cilindrospermopszin termelés illetve a tápanyag-ellátottság összefüggéseinek vizsgálata. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- A különböző éhezési körülmények között milyen fénymikroszkóppal nyomon követhető morfológiai változások figyelhetők meg, a nitrogénéhezés esetén hogyan alakul a heterocisza frekvencia?
- Hogyan alakul az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése megfelelő kén-, foszfor-, illetve nitrogénellátottság esetén,

illetve a kén-, foszfor-, valamint a nitrogénéhezés körülményei között?

- Hogyan változik az egyes tápelemek (kén, foszfor, nitrogén) metabolizmusában kulcsszerepet betöltő enzimek - az ATP-szulfuriláz, a periplazmatikus alkalikus foszfatáz, a nitrogenáz komplex - megjelenése, aktivitása a különböző tápelem-éhezési körülmények között?
- Van-e összefüggés, a cianotoxintermelés és a kén-, foszfor-, illetve nitrogénellátottság között és az hogyan jellemezhető? A nitrogénkötés során képződő heterociszták a vegetatív sejtekhez hasonlóan termelnek-e cilindropermopszint?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A cianobaktériumok

2.1.1. A cianobaktériumokról általában

A cianobaktériumok prokarióta élőlények, vagyis az eukarióta mikroalgákkal ellentétben sejtjeik nem tartalmaznak valódi sejtmagot. A fehérjeszintetizáló apparátus felépítésében 70S riboszómák vesznek részt (Fay és Van Baalen, 1987; Bryant, 1994). A központi helyzetű, színtelen centroplazmát színes kromatoplazma veszi körül. A sejtmembrán a tipikus, kettős foszfolipid réteg alkotta egységmembrán. A citoplazmát lizozim-érzékeny Gram-negatív sejtfa veszi körül. A sejtek meghatározott alakját peptidoglikán réteg biztosítja, a sejtfa szintézis penicillinnel gátolható.

A cianobaktériumok fotoszintetizáló élőlények, a fotoszintetikus pigmentek tilakoid membránrendszerbe szerveződnek, amelyek a protoplazma perifériális részén helyezkednek el (kromatoplazma). A sejtek színe a kékeszöldtől az ibolyás-vörösre változik, a klorofill-a zöld színe általában elfedi a karotinoidok (pl. β -karotin) és a járulékos pigmentek, mint a fikocianin, allofikocianin és a fikoeritrin (fikobiliproteinek) színét. A fikobiliproteinek fikobiliszómákba tömörülnek, amelyek a tilakoidok külső felszínén, sorokban

helyezkednek el (Bryant, 1994). Klorofill-a molekulákat és fikocianinokat minden cianobaktérium tartalmaz. A cianobaktériumok fotoszintetikus apparátusában az oxigéntermelő szervezetekre jellemző mindkét reakciócentrum (PS I és PS II; Ormerod, 1992) megtalálható. A járulékos pigmentek megfelelő arányban való szintézisével rendkívüli mértékben képesek alkalmazkodni környezetük fényviszonyaihoz (kromatikus adaptáció; Bryant, 1994).

A fényellátottsághoz való alkalmazkodásban fontos szerepet töltenek be a sok fajnál megfigyelhető gázvakuólumok. Ezek a gázzal telt hólyagocskák a külső felszínükön hidrofil, a belső felszínükön hidrofób kamrák, a sejtek fajsúlyának szabályozását végzik (Porat *et al.*, 2000). A gázvakuólumok mérete különböző környezeti hatásokra változik, lehetővé téve a baktériumsejt (telep vagy fonal) számára a megfelelő élettér megtalálását.

A cianobaktériumok képesek az alapvető tápanyagok és anyagcsere-termékek raktározására. Elektronmikroszkóppal jól megfigyelhetők a citoplazmatikus zárványok (pl. glikogén szemcsék, zsírcseppek, cianoficin szemcsék, polifoszfát testek, karboxiszómák; Fay és Van Baalen, 1987). Kizárólag a cianobaktériumokra jellemzőek a nitrogén raktárként működő cianoficin szemcsék, amelyek a citoplazmában a tilakoidmembránok között helyezkednek el. A kromatoplazmában tápanyagraktárként glikogén szemcsék és polifoszfát testek fordulhatnak elő. A protoplazma jellemző képletei még a karboxiszómák, melyek a széndioxid felvételében játszanak szerepet, a Calvin-ciklus karboxiláló enzimét, a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenázt tartalmazzák.

A légköri nitrogén megkötésének képessége alapvető anyagcsere-folyamat a cianobaktériumok egy részénél. A nitrogénmolekulát a nitrogenáz enzim működése révén közvetlenül ammóniummá (NH_4^+) alakítják. A nitrogénfixálás képessége általánosan előfordul a fonalas, heterocisztát képző nemzetségekben (*Anabaena*, *Nostoc sp.*). Sok, adatokkal jól alátámasztott példa azonban azt igazolja, hogy a heterocisztát nem képző cianobaktériumok (pl. *Trichodesmium sp.*) is képesek megkötni a molekuláris nitrogént (Chorus és Bartram, 1999). A cianobaktériumok nitrogén-anyagcseréjéről a 2.1.4. pontban szólunk részletesebben.

A heterocisztás Nostocales rend képviselőinek másik jellemző tulajdonsága az akinéta képzés. Az akinéta spóraanalóg, kiszáradás-rezisztens képlet, gazdag glikogénkészlettel és nitrogénraktárral. Az akinéta lehetővé teszi a képzésére képes fajok légkörben való terjedését is. A Stigonematales rend fajai ugyancsak rendelkeznek heterocisztával és akinétával is (Fay és Van Baalen, 1987).

Az Oscillatoriales rendbe tartozó egyes fonalas fajok a fonalak végén ún. hormogóniumot fejlesztenek, amely vékony nyálkaburokkal körülvelt szaporító képlet, fiziológiai egységeket képező sejteket tartalmaz. A hormogóniumok jól elhatárolható reproduktív részei a fonalnak, melyek szabadulásuk után aktív sikló mozgásra képesek, a szülői fonalról leválva az elterjedést szolgálják (Fay és Van Baalen, 1987).

A fenti képletek (heterociszta, akinéta, hormogónium) a multicelluláris, fonalas morfológiájú cianobaktériumok sajátjai. A fonalat alkotó sejtláncolatot trichomának nevezik. A heterociszta, az akinéta és a hormogónium a vegetatív sejtek differenciálódásával jön létre (Chorus és Bartram, 1999).

Az unicelluláris formák sejtjei gömb, henger vagy ovoid alakúak (pl. Chroococcales rend). A sejtek rendezetlen kolóniákba aggregálódhatnak, amelyekben a sejtfalet borító poliszacharid nyálkaburok tartja össze a telepeket. Tok vagy hüvely szekretálásával rendezettebb telepek alakulhatnak ki. A Pleurocapsales rend bizonyos fajainál pszeudoparenchimatikus telepfelepítés figyelhető meg (Chorus és Bartram, 1999).

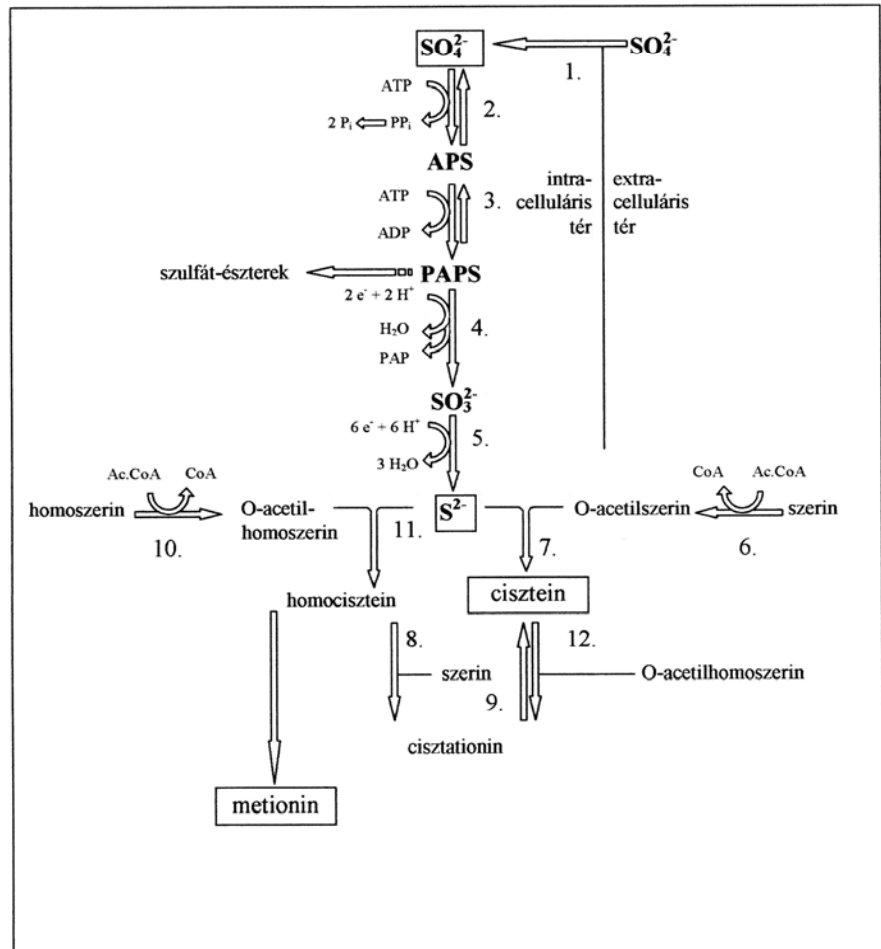
A cianobaktériumok szaporodása aszexuális. Az unicellulárisak sejtjei izopolárisak vagy heteropolárisak lehetnek (ez utóbbi esetben a sejtek megnyúltak, az utódsejtek az anyasejt meghatározott részéről válnak le – pl. az ún. exospórák a Chamaesiphonales rend esetében). Egyes csoportoknál megfigyelhető az anyasejt sok apró leánysejtté való feldarabolódása egymást követő kettéosztódásokkal (baeociták vagy endospórák). A fonalas formák reprodukciója történhet a trichóma fragmentációjával vagy az előbbieken tárgyalt hormogóniumok segítségével. A trichomás szerveződésűek kitartó szaporítóképletei a már ismert akinéták (Chorus és Bartram, 1999).

2.1.2. A cianobaktériumok kénanyagcseréje

A szulfátok képezik a legfontosabb kénforrást az élővilág számára; a mikrobák és a növények által felvett és metabolizált szulfát jelenti az élőlények kénforgalmának alapját. A növényekre, az eukarióta algákra, sőt a prokarióta mikroorganizmusok nagy részére is általánosan jellemző, hogy a ként szulfát formájában, a plazmamembránban lokalizált H^+/SO_4^{2-} kotranszporter segítségével veszik fel. A *Synechococcus sp.* esetében ismert, hogy a szulfát transzportjának lebonyolításában egy extracelluláris fehérje is közreműködik (Laudenbach *et al.*, 1991).

A növényekben és az eukarióta algákban a felvett szulfát a kloroplasztiszba szállítódik, redukciója e sejtorganellumban megy végbe. A szulfát redukciójának egyes lépései a prokarióták citoplazmájában hasonlóan zajlanak, mint az eukarióta plasztiszokban megfigyelhető. A szulfát első lépésben ATP-hez kapcsolódik. A reakciót az ATP-szulfuriláz katalizálja, adenzin-foszfoszulfát (APS) keletkezik. Az APS-ből glutation és ferredoxin redukáló ágensek közreműködésével szulfít, majd szulfid keletkezik, ez utóbbi ciszteinbe épül be. APS-ből kiindulva foszfo-adenozin-foszfo-szulfáton (PAPS) keresztül a kolin szulfatálása is bekövetkezhet (Bogdanova és Hell, 1997; Droux *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999).

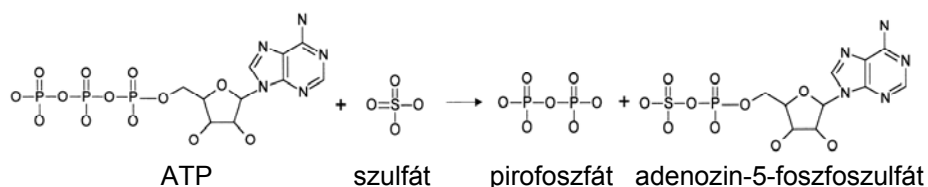
A cianobaktériumok kénanyagcseréjére vonatkozóan a fonalas fajok közül a *Spirulina platensis* és az *Anabaena cylindrica* ATP-szulfuriláz enzimét jellemezték részletesebben (Menon és Varma, 1978; Sawney és Nicholas, 1977). Lényegesen több adat található az irodalomban az unicelluláris cianobaktériumok kénanyagcseréjére vonatkozóan. Részletesen tanulmányozták a *Synechococcus* nemzetség különböző törzseinek kén-metabolizmusát, és a hozzá tartozó enzimeket (Schmidt és Christen, 1978; Mishra és Schmidt, 1992; Collier és Grossman, 1992). A vizsgálatok eredményei szerint a szulfát redukciójának egyes lépései a prokarióták citoplazmájában hasonlóan zajlanak, mint az eukarióta plasztiszokban. A cianobaktériumok szulfátfelvételét és a felvett szulfát redukcióját, valamint szerves vegyületekbe való beépítését foglalja össze az 1. ábra, az ATP-szulfuriláz által katalizált reakció részleteit a 2. ábra mutatja.



1. ábra. A szulfát asszimilációs redukciója, és beépülése a szerves vegyületekbe a cianobaktériumokban. A számok az egyes reakciókat katalizáló enzimeket jelölik:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. szulfát-permeáz | 8. cisztationin- β -szintáz |
| 2. ATP-szulfuriláz | 9. cisztationin- γ -liáz |
| 3. APS-kináz | 10. homoszerin-acetiltranszferáz |
| 4. PAPS-reduktáz | 11. O-acetilhomoszerin-szulfhidriláz
(homocisztein-szintáz) |
| 5. szulfid-reduktáz | 12. cisztationin- γ -szintáz |
| 6. szerin-acetiltranszferáz | |
| 7. cisztein-szintáz | |

Az intermedierek rövidítései: AcCoA: Acetil-koenzim-A; APS: adenzin-5-foszfoszulfát; CoA: Koenzim-A; PAPS: 3'-foszfo-adenozin-5'-foszfoszulfát; PAP: 3'-5'-difoszfo-adenozin. Az ábra a <http://www.genome.jp> internetes oldal alapján készült.



2. ábra. Az ATP-szulfuriláz által katalizált reakció. A reakció során a felvett szulfát ATP-vel kapcsolódik („aktiválódik”), a reakció eredményeként pirofoszfát (difoszfát) és APS (adenozin-5-foszfoszulfát) keletkezik.

Ortega-Calvo és Stal (1994) illetve Ariño és munkatársai (1995) tanulmányozták részletesen egy *Gloeotheca* faj kénanyagcseréjét. Kimutatták, hogy kén hiányában a tenyészetek erőteljesen sárgulnak, a sejtekben dezintegrálódik a fotoszintetikus apparátus, jól nyomon követhető a fikobiliproteinek lebomlása, valamint különböző tartalék tápanyagok (cianoficin szemcsék, glikogén, polihidroxivajsav) felhalmozása figyelhető meg. Szulfát hiányában a *Gloeotheca* kultúrák a 4. nap után sárgulni kezdtek és a növekedés leállt, a tenyészet stacioner fázisba lépett. A vizsgált *Gloeotheca* faj vastag poliszacharid tokot fejleszt, amelyben a sejtek csoportokban helyezkednek el. Szulfátéhezés során a tok jól definiálható szerkezetbeli átalakulását figyelték meg. Leírták, hogy a kén visszaadása után, egy rövid lag periódust követően a tilakoidok gyorsan újrászerveződtek, az éhezés során felhalmozott glikogén granulomok eltűntek, és megfigyelhető volt a tok eredeti szerkezetének visszarendeződése.

Kénéhezés hatására bekövetkező ultrastrukturális változásokról beszámoltak más cianobaktérium fajok esetén is. Egy *Synechococcus* törzs esetén leírták, hogy a kénéhezés alatt gyorsan degradálódott a c-fikocianin, a klorofill-a tartalom drasztikusan csökkent, a tilakoid rendszer redukálódott, a sejtterfogot nagy részét glikogén és polihidroxivajsav granulomok töltötték ki (Schmidt *et al.*, 1982; Wanner *et al.*, 1986). Richaud és munkatársai (2001) egy *Synechocystis* törzsben írták le a fikobiliszómák degradációját. Alacsony szulfát koncentráció mellett a *Synechococcus* sejtek megnövekedett számban

tartalmazznak polifoszfát granulomokat (Lawry és Jensen 1979). A kénéhezés cianoficin akkumulációt indukál a *Plectonema boryanum*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc muscorum* és *Phormidium luridum* (Lawry és Simon, 1982), valamint *Aphanocapsa* fajokban (Allen *et al.*, 1980).

2.1.3. A cianobaktériumok foszforanyagcseréje

A foszfornak mind a heterotróf, mind a fotoautotróf szervezetekben fontos szerepe van, mivel a sejtekben lejátszódó energiaforgalom és a különböző anyagcsere-folyamatok a foszfát és a foszforilált vegyületek jelenlététől függenek.

A cianobaktériumok eddigi ismereteink szerint nem vesznek fel szerves foszforvegyületeket, kivételt képez az *Anabaena flos-aquae* glükóz-6-foszfát felvétele. A cianobaktériumok extracelluláris foszfatazai a sejten kívül hidrolizálják a szerves foszforvegyületeket, így módon a foszfort ortofoszfát formájában veszik fel, a foszforfelvétel mértéke pH 7,5-8,5 között optimális (Healey, 1982). A sejtekben az ortofoszfát foszforilált nukleozidok, és más, a cianobaktériumok anyagcseréjének fenntartásához nélkülözhetetlen foszforilált vegyületek képződése során kerül felhasználásra (pl. cukor-foszfátok, gliceraldehid-foszfát, dihidroxiaceton-foszfát, stb.).

A külső és a belső foszforkoncentrációk alapvetően befolyásolják a cianobaktériumok növekedési rátáját és anyagcseréjét (Lin, 1974). Foszforhiányos körülmények között a belső foszforkoncentráció - számos eukarióta algához és heterotróf baktériumhoz hasonlóan - minimálisra csökken (Chen, 1974; Batterton és Van Baalen, 1968). A foszfor hiányával csökken a fotoszintézis üteme, az ATP, a klorofill-a, a fehérje, az RNS és a DNS mennyisége (Batterton és Van Baalen, 1968; Healey, 1982). Foszforhiány esetén mind a fényben, mind a sötétben nő a foszforfelvétel aránya, és ez emelkedő ATP-szintézist és polifoszfát képződést eredményez (Batterton és Van Baalen, 1968).

A foszforlimitált körülmények közötti növekedésváltozás nemcsak a foszfátfelvételben és kiválasztásban tükröződik, hanem ilyen körülmények között a sejtek arra kényszerülnek, hogy megváltoztassák

anyagcseréjüket, amely enzimrendszereikben is megnyilvánul (Healey, 1982; Block és Grossman, 1988). A foszforhiány hatására a cianobaktériumokban új enzimek szintetizálódnak. Ilyen *de novo* szintetizált enzim az alkalikus foszfatáz, amely a sejtfal periplazmatikus részébe transzportálódik (Ihlenfeldt és Gibson, 1975; Donan és Jensen, 1977). A cianobakteriális anyagcsere vizsgálata bebizonyította, hogy a nitrogénfixáló cianobaktériumok sokkal nagyobb foszforhiányt képesek elviselni, mint a nitrogént nem kötők (Fitzgerald, 1969). Ezekben az élőlényekben a felhasználható külső és belső foszforkoncentráció szabályozza az alkalikus foszfatáz aktivitását (Healey és Hendzel, 1975). A belső foszforkoncentráció csökkenésével nő az enzimaktivitás (Healey, 1982).

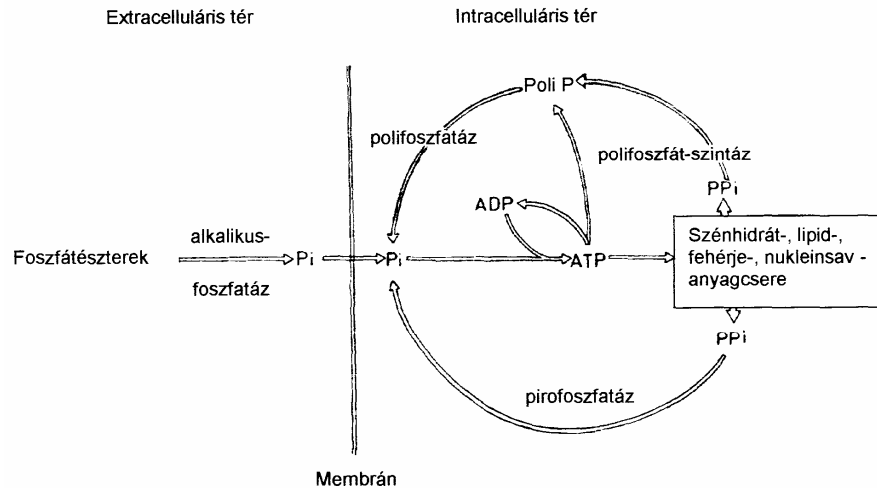
Az alkalikus foszfatáz termelődését, mint a foszfátlimitációra adott választ az *Escherichia coli*-ban és számos prokarióta és eukarióta szervezetben tanulmányozták. A foszfatáz típusú enzimek két pH optimummal jellemezhetők: a savanyú (pH 5,3-5,8) és a lúgos (pH 9,5-10,0) tartományban. A nem specifikus alkalikus foszfatáz enzimek pH optimuma a lúgos tartományba esik, ezért megkülönböztetik a foszfo monoészteráz aktivitástól, amely savas pH optimumot mutat. A foszfatáz enzim aktivitását általában 4-nitro-fenil-foszfat szubsztrátummal határozzák meg. A felszabaduló, alkalikus közegben sárga színű nitro-fenolt spektrofotometriásan mérik (Ihlenfeldt és Gibson, 1975).

A nem specifikus alkalikus foszfatázok génjei a foszfátéhezés során derepresszálódnak. A különböző prokarióta és eukarióta sejteken végzett kutatások bebizonyították, hogy az enzim expressziója különbözik a foszfát tartalom által meghatározott különféle növekedési körülmények között (Fitzgerald, 1969; Ihlenfeldt és Gibson, 1975). Az alkalikus foszfatáz a derepresszió után baktériumokban és az élesztőgombákban a periplazmatikus térben (Wetzel *et al.*, 1970; Reid és Wilson, 1971; Costerton *et al.*, 1974; Bedu *et al.*, 1982), a sejtfalhoz kapcsolódva (Cheng *et al.*, 1971), vagy a külső membránban (MacAlister *et al.*, 1977) található, míg az emlősök alkalikus foszfatáza szorosan a sejtmembránhoz kapcsolódik (Fernley, 1971; Coleman és Gettins, 1983). Az alkalikus foszfatáz enzimek széleskörű szubsztrát-specifitást mutatnak. Katalitikus aktivitása az alkalikus pH tartományban optimális (Reid és Wilson, 1971; Fernley, 1971;

Coleman és Gettins, 1983). Számos baktérium- és emlőssejt alkalikus foszfatázának kutatása azt jelzi, hogy az összes tisztított enzim cinktartalmú metalloenzim, amelyben cink (II) ionok stabilizálják az általános fehérje szerkezetet és funkciót (Coleman és Gettins, 1983).

Az alkalikus foszfatázok a cianobaktériumokban is általánosan előfordulnak, és fontos szerepük van a sejtekben (Fitzgerald, 1969; Healey, 1982). A cianobakteriális sejtekben foszforhiányos körülmények között szintetizálódik az alkalikus foszfatáz enzim (Ihlenfeldt, és Gibson, 1975), amely csakúgy, mint más baktériumokban, a periplazmatikus térben helyezkedik el (Donan és Jensen, 1977). A cianobakteriális alkalikus foszfatázokra irányuló kutatások azt jelzik, hogy néhány fajban (pl. *Anabaena variabilis*, *Pseudoanabaena catenata*) a maximális aktivitáshoz *in vivo* külső kalcium ionokra van szükség (Healey és Hendzel, 1975), míg más fajoknál (pl. *Synechococcus sp.*), a cinkion az enzim potenciális inhibitora (Ihlenfeldt és Gibson, 1975).

Közismert, hogy a heterotróf baktériumok, a fotoszintetizáló baktériumok, sőt az eukarióta algák több képviselője is képes a foszfort nagy mennyiségben raktározni. Sok heterotróf élőlényhez és fotoszintetikus algához hasonlóan a polifoszfát szemcsék általában a cianobaktériumok vegetatív sejtjeiben találhatóak (Stanier és Cohen-Bazire, 1977). Különböző kutatások azt mutatják, hogy foszforhiány esetén a polifoszfát szemcsék foszforforrást jelentenek a nukleinsavak és a foszfolipidek bioszintézise számára. A polifoszfátok energiaháztartásban betöltött szerepét támasztja alá, hogy mind baktériumokban, mind élesztőben kimutattak a polifoszfátokból való ATP szintézist (Clark *et al.*, 1986; Schuddemat *et al.*, 1988). A sejtek anyagcseréje során a különböző reakciókban szervesen pirofoszfát (PP_i) keletkezik; vagy az ATP szintézishez hasonlóan a fotofoszforilációval és/vagy oxidatív foszforilációval jön létre (Stanier és Cohen-Bazire, 1977). A PP_i az anyagcserében sok enzimre „feedback” szabályozást fejt ki. A foszforéhezés körülményei között a sejtekből eltűnő polifoszfát testek miatt megváltozik a sejtek ultrastruktúrája. A jelenség a fonalas cianobaktériumok körében is ismert (Jensen és Sicko, 1974). A cianobaktériumok foszforanyagcseréjét vázlatosan a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra. A cianobaktériumok foszforanyagcsereje foszforlimitált körülmények között. P_i : inorganikus foszfát; PP_i : pirofoszfát (difoszfát); Poli P: polifoszfát (Ninh, 1985)

2.1.4. A cianobaktériumok nitrogén-anyagcsereje

2.1.4.1. Az elemi nitrogén megkötése

A cianobaktériumok jelentős hányada képes a légköri nitrogén megkötésére aerob körülmények között és számos faj képes nitrogénkötésre, ha anaerob körülmények közé kerül.

A molekuláris nitrogén megkötését a nitrogenáz enzimkomplex végzi. A nitrogenáz enzimkomplex felépítése nagyon hasonló a légköri nitrogén megkötésére képes mikroorganizmusok körében, olyannyira, hogy a különböző fajokból származó komplex alegységek bizonyos esetekben képesek egymást helyettesíteni. A komplex két proteiből áll. A dinitrogenáz egy $\alpha_2\beta_2$ tetramer, amely négy 4Fe-4S csoportot és két Mo-Fe kofaktort köt. A dinitrogenáz feladata az elemi nitrogén megkötése és ammóniává való redukciója hat elektron és hat proton felhasználásával, az enzim molibdéntartalmú részének ebben van

szerepe. A dinitrogén reduktáz két alegységből álló dimer. Feladata az elektronok továbbítása a dinitrogenázra. Mindkét reakcióban ferredoxin, vagy flavodoxin az elektrondonor (Dean *et al.*, 1993). A nitrogénből képződő ammónia, illetve ammóniumion a glutaminszintetáz – glutamát szintetáz úton épül be szerves vegyületekbe (Wolk *et al.*, 1976).

A nitrogenáz komplex rendkívül érzékeny az oxigén jelenlétére – az oxigén az enzim irreverzibilis inaktivációját okozza. Mivel a cianobaktériumok oxigéntermelő fotoautotróf élőlények, így nitrogenáz enzimrendszerüket a légköri oxigéntől és a fotoszintézis eredményeként keletkező endogén oxigéntől is meg kell védeniük. A nitrogénkötő sejtek (heterociszták) speciális nyálkaburokkal, tokkal és/vagy speciális sejtfallal rendelkeznek, amely gátolja az O₂ diffúzióját. Néhány cianobaktérium genusz (*Gloeothece*, *Synecococcus*) aerob körülmények között nem mutat nitrogénkötő aktivitást, azonban mesterségesen anaerob környezetben nevelve őket képesnek mutatkoztak a légköri nitrogén megkötésére (Rippka *et al.*, 1979; Rippka és Waterbury, 1977). Ugyanezen unicelluláris cianobaktérium nemzetségek más fajtái képesek a nitrogén „aerob” viszonyok közötti megkötésére – ezeknél a törzseknél a nitrogénkötés és a fotoszintézis (illetve a fotoszintetikus oxigéntermelés) időbeli eltolódását (nappal és éjszaka) figyelték meg. Hasonló jelenség volt megfigyelhető néhány fonalas, de heterocisztát nem képző faj esetében is (pl. *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Phormidium* fajok bizonyos törzsei esetén - Fay, 1992).

A légköri nitrogén megkötésére aerob körülmények között képes fonalas cianobaktériumok jelentős hányadánál a fonalat alkotó vegetatív sejtek egy része speciális morfológiai átalakuláson megy keresztül, amikor a légköri nitrogén az egyedüli nitrogénforrás. A fonal bizonyos sejtjei a nitrogén megkötésére specializálódott heterocisztákká alakulnak. A heterocisztát képző fonalas cianobaktériumok közül az *Anabaena* nemzetség PCC 7120 jelzésű törzse esetén tanulmányozták legrészletesebben a heterociszták differenciálódásának folyamatát, beleértve a folyamat genetikai hátterét is. A vegetatív sejt először proheterocisztává alakul, amelynek hat morfológiai állapota különböztethető meg a heterocisztáváérés során (Wilcox *et al.*, 1973). A differenciálódott sejt jellemzője az igen vastag sejtfal. A tok külső poliszacharid rétege fizikai védelmet biztosít, a

belső glikolipid réteg megakadályozza az oxigén bejutását a sejtbe (Murry és Wolk, 1989). A glikolipidek glükózból vagy ritkábban galaktózból és a hozzájuk észter vagy éterkötéssel kapcsolódó 26-28 szénatomszámú zsírsavból épülnek fel. A poliszacharid réteg oligoszacharid-konkatamerekből áll, az alegységek felépítésében glükózon kívül galaktóz, xilóz, mannóz vagy más szénhidrátok vesznek részt (Cardemil és Wolk 1981).

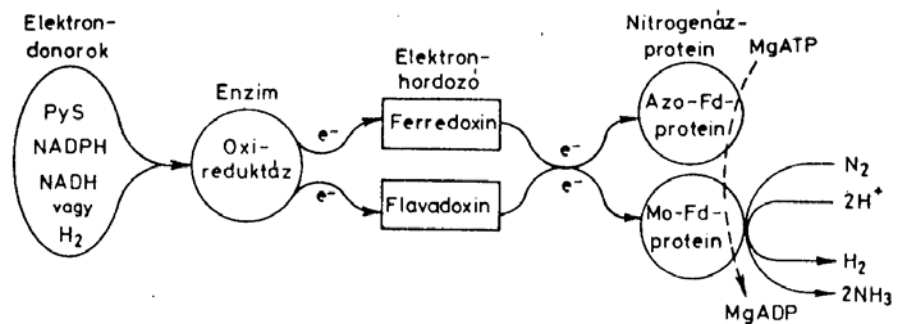
A heterocisztában csak a PS I működik, ez biztosítja a nitrogénkötéshez szükséges ATP-t és a redukáló erőt. A differenciálódás során a PS II működése, így az oxigéntermelő rendszer működése is megszűnik (Wolk, 1982), de megvan a lehetőség a PS II alternatív működésére, amely során képes elektronokat fogadni szerves vagy szervetlen donortól (Bockholt *et al.*, 1991), a PS II tehát jelen van a heterocisztában (Thiel *et al.*, 1990). A heterociszta szénhidrátokat (szacharózt) vesz fel a vegetatív sejtektől, és kötött nitrogént (glutamát, aszpartát, NH_4^+ , glutamin) biztosít a vegetatív sejtek számára. Nem teljesen tisztázott, hogy az NH_4^+ -akceptorként funkcionáló vegyületek (glutamát, α -ketoglutarát, oxálacetát) a heterocisztában szintetizálódnak, vagy a vegetatív sejtekből transzportálódnak át. Sötétben a N_2 és O_2 redukálásához szükséges redukáló ágensek a pentóz-foszfát ciklusban vagy az izocitrát-dehidrogenáz működése során keletkeznek. A NADPH elektronokat biztosít a heterociszta-specifikus ferredoxinok és a légzés számára. A nitrogeáz működéséhez szükséges ATP a légzés során termelődik sötétben, fényben az ATP a PS I-hez kapcsolt elektrontranszport működésének eredménye.

Az érett heterociszta fikobiliprotein tartalmára vonatkozóan többféle adat áll rendelkezésre. Bizonyos esetekben nem mutathatók ki a fehérje természetű pigmentek (Thomas, 1970), máskor a fikobiliprotein-tartalom eléri a vegetatív sejtekben kimutatható mennyiség 40%-át is (Peterson *et al.*, 1981). Az *Anabaena variabilis* esetében fikobiliszómákat is kimutattak a heterocisztákból (Ke *et al.*, 1983). A fikobiliproteinek által begyűjtött nagy mennyiségű energia a PS I-hez transzportálódik, szemben a vegetatív sejtek esetében megfigyeltekkel, ahol a begyűjtött energia elsősorban a PS II-re tevődik (Peterson *et al.*, 1981). Jellemző az érett heterocisztára a szubcelluláris zárványok hiánya. A heterociszta vegetatív sejtekhez kapcsolódó

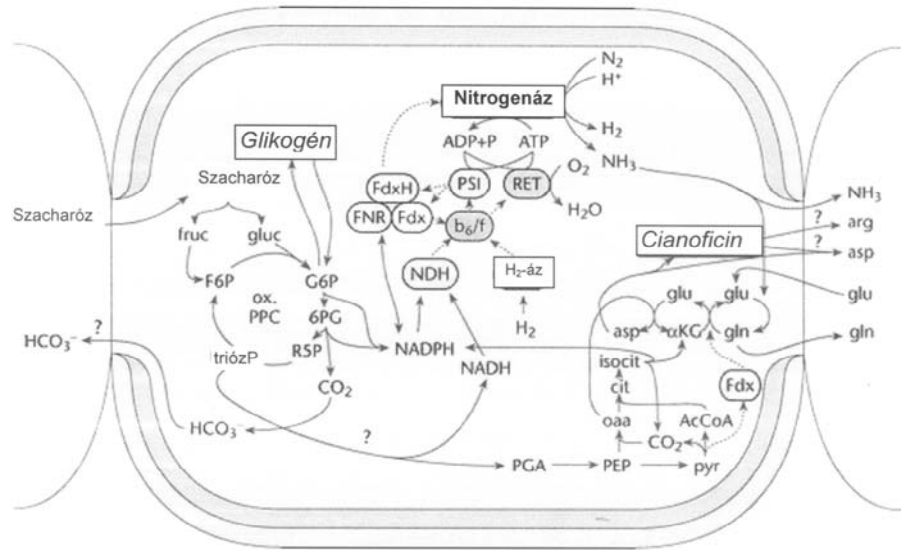
részén található a fénymikroszkóppal is jól tanulmányozható poláris testek, amelyek a sejtek közötti szén- illetve nitrogénforgalomért felelősek. A poláris testek cianoficinből (poliarginil-poliaszpartát) épülnek fel.

A heterociszták többé-kevésbé szabályos térközökkel jelennek meg a fonalon. A leginkább vitatott kérdés, hogy mi határozza meg azt, hogy melyik vegetatív sejt differenciálódjon heterocisztává. A vizsgálatok azt mutatják, hogy meghatározott, minimális számú szomszéd sejtre van szükség ahhoz, hogy a differenciálódás elinduljon, ugyanis a nagyon rövid fonalakon nem képződik heterociszta (Wilcox *et al.*, 1973). Egyes *Anabaena*, *Cylindrospermum* és *Cylindrospermopsis* fajoknál a heterociszta a fonal végén helyezkedik el, bizonyos törzseknél a heterociszták párban állnak a fonal végén. Az is előfordul, hogy a fonal mindkét végén található egy-egy heterociszta. Természetes körülmények között eddig a *Mastigocladus laminosus* esetén figyelték meg, hogy több heterociszta helyezkedik el egymás után láncot alkotva (Nierzwiczki-Bauer *et al.*, 1984; Stevens *et al.*, 1985). A kutatások világossá tették, hogy a heterociszták nem véletlenszerűen helyezkednek el a fonalban, azonban a kérdésre, hogy mi dönti el, hogy melyik vegetatív sejt differenciálódjon heterocisztává, még keresik a választ.

A nitrogenáz működése a 4. ábrán, a heterociszta anyagcseréje vázlatosan az 5. ábrán látható.



4. ábra. A nitrogenáz enzimkomplex működése. Azo-Fd-potein: azo-ferredoxin, Mo-Fd-protein: molibdo-ferredoxin, PyS: piroszőlósav. (Szalai, 1994)



5. ábra. A heterociszta anyagcseréje vázlatosan. A folytonos vonalak a szén és a nitrogén útját mutatják, a szaggatott vonalak a redukáló ágensek közreműködésével lezajló elektronáramlást, a kérdőjelek a nem egyértelműen bizonyított részleteket jelölik. Az enzimek, enzim komplexek és az elektrontranszport-lánc elemei bekeretezve láthatók. Rövidítések: AcCoA – acetil-koenzim-A; arg – arginin; asp – aszpartát, *b₆/f* – citokróm *b₆/f* komplex; cit – citrát; fruc – fruktóz; F6P – fruktóz-6-foszfát; Fdx – vegetatív sejt-típusú ferredoxin; FdxH – heterociszta-specifikus ferredoxin; FNR – ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktáz; G6P – glükóz-6-foszfát, 6PG – 6-foszfoglükonát; gln – glutamin; glu – glutamát; gluc – glükóz; H₂-áz – hidrogenáz, izocit – izocitrát; αKG – α-ketoglutarát; NADH-DH – NADH-dehidrogenáz; oaa – oxálacetát; ox. PPC – oxidatív pentóz foszfát ciklus; P – inorganikus foszfát; PEP – foszfoenolpiruvát; PGA – 3-foszfoglicerát; PS I – I. fotorendszer; pys – piruvát; R5P – ribulóz-5-foszfát; RET – respirációs (légzési) elektron transzport; triózP – trióz-foszfát. Az ábra Haselkorn és Buikema (1992) nyomán készült.

2.1.4.2. A szerves és a szervetlen nitrogénvegyületek asszimilációja

A cianobaktériumok képesek környezetükből az ammóniumion közvetlen felvételére, sőt általánosságban elmondható, hogy az

ammóniumion, mint kizárólagos nitrogénforrás is megfelelő számokra (Healey, 1977; Ohmori *et al.*, 1977; Flores *et al.*, 1980; Boussiba *et al.*, 1984b). Az ammónium-transzportrendszer tanulmányozására ¹⁴C metilammóniumot használnak. A rendelkezésre álló adatok azt mutatják, hogy az ammóniumionok felvétele aktív transzporttal történik, míg az ammónia passzív diffúzió útján jut be a sejtbe, ahol protonálódik, és így ammóniumionként lép be az anyagcsere-folyamatokba (Boussiba *et al.*, 1984a).

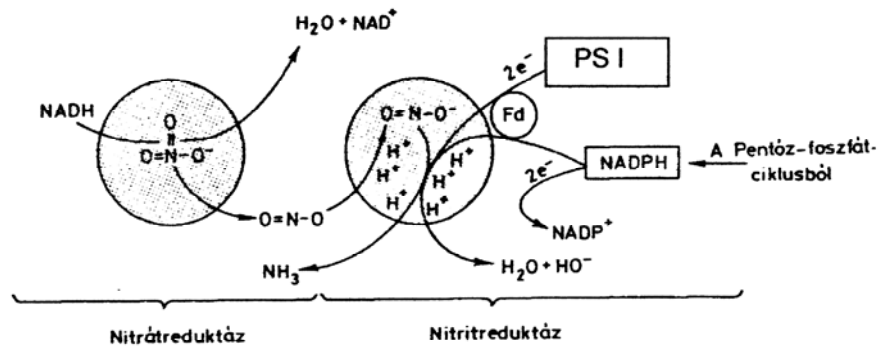
Az ammóniumion közvetlenül reakcióba léphet a glutaminsavval a glutamát-dehidrogenáz enzim katalizálta folyamatban, melynek eredményeként glutamin keletkezik. Az ammóniumionok asszimilációjának fő útja a cianobaktériumokban azonban a glutaminszintáz/glutamin-oxoglutarát-aminotranszferáz (GS/GOGAT) ciklus (Hoare *et al.*, 1967; Neilson és Doudoroff, 1973). Az elsőként keletkező vegyület ebben az esetben is a glutamin, amely a következő lépésben a 2-oxoglutarátot aminálja. A kutatások eredményei azt mutatják, hogy a nitrogénforrástól függetlenül ez az ammóniumion szerves vegyületekbe való beépülésének fő útja a cianobaktériumokban (Wolk *et al.*, 1976; Meeks *et al.*, 1977; Flores *et al.*, 1983). Az *Anabaena cylindrica* fonalas cianobaktérium esetében megfigyelték a piroszölősav közvetlen aminációját (Lawrie *et al.*, 1976), más fajok esetében pedig a 2-oxoglutarát közvetlen aminációját is (Florencio *et al.*, 1987; Martínez-Bilbao *et al.*, 1988; Chávez és Candau, 1992).

A nitrát a legáltalánosabban használt nitrogénforrás a cianobaktériumok körében. A nitrát asszimilációja a nitrát felvételét és nitríténné való redukcióját foglalja magában. A nitrátionok aktív transzport útján jutnak be a sejtbe, bár a magas extracelluláris nitrátkoncentráció esetén passzív diffúziót is megfigyeltek (Omata *et al.*, 1989, 1993). A cianobakteriális nitrát-reduktáz enzim egy konstitutív, egyetlen polipeptid láncból álló fehérje, amely molibdént, nem-hem vasat és savlabilis szulfidot tartalmaz (Candau, 1979; Mikami és Ida, 1984; Martín-Nieto *et al.*, 1990, 1992). Az enzim feladata a nitrát nitríténné való redukálása, amely folyamat két elektront igényel és az elektrondonor a redukált ferredoxin (Arizmendi és Serra, 1990).

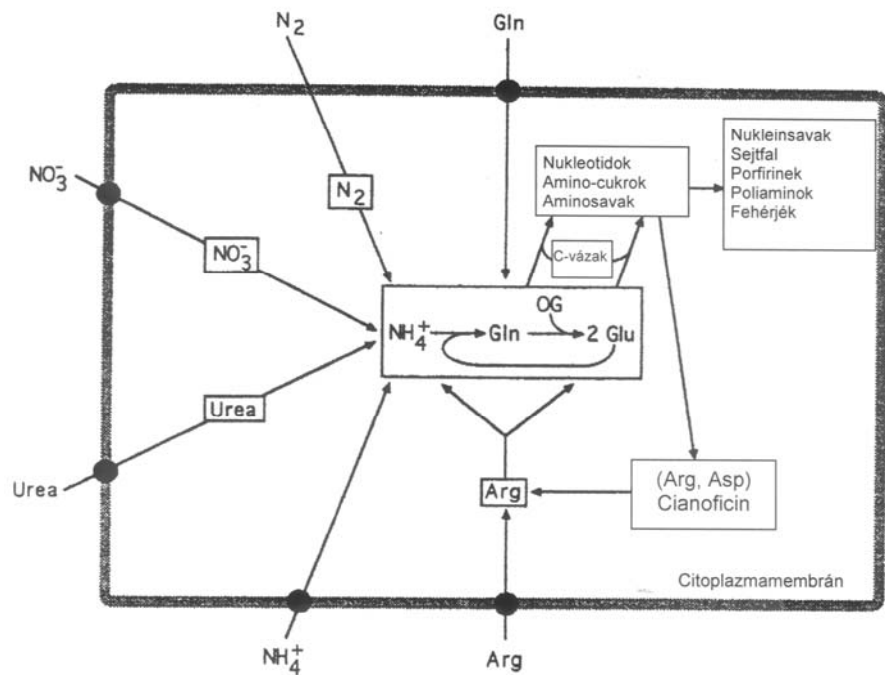
A cianobaktériumok nitritfelvétele két úton valósulhat meg; a nitrition bejuthat a sejtbe aktív transzporttal (Flores *et al.*, 1987; Madueno *et al.*, 1987), illetve passzív diffúzióval (Flores *et al.*, 1987; Martín-Nieto *et al.*, 1989). Az aktív transzport során kompetíció figyelhető meg a nitrit- és nitrátiók között, amiből következik, hogy aktív felvételük ugyanazon transzportrendszerhez köthető (Madueno *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992). A cianobakteriális nitrit-reduktáz enzim egy 52-68 kDa molekulatömegű monomer, vas-kén proteint és hem vasat tartalmaz (Miyaji és Tamura, 1992). Az enzim homológ a magasabbrendű növények kloroplasztiszában található nitrit-reduktázzal. Feladata a nitrit ammóniummá való redukciója, amely reakció hat elektront igényel, az elektrondonor redukált ferredoxin (Arizmendi és Serra, 1990). Az enzim természetesen a nitrátredukcióból származó nitritet és az exogén nitritet is ammóniummá redukálja, amely a fentebb ismertetett módon lép be a felépítő folyamatokba.

Néhány cianobaktérium faj esetében kimutatták, hogy szerves vegyületek is szolgálhatnak nitrogénforrásként. Nielson és Larsson (1980) hét cianobaktérium törzs vizsgálata során azt tapasztalta, hogy a húgysav és sói, a glutamin, aszparagin, arginin, és az ornitin voltak azok a szerves vegyületek, amelyeket a vizsgált törzsek képesek voltak hasznosítani. A *Synechococcus* PCC 7002 törzs esetén jelentősen magasabb számú nitrogéntartalmú szerves vegyületről mutatták ki, hogy nitrogénforrásként szolgálhatnak (Kapp *et al.*, 1975).

A nitrát-, illetve nitritredukció folyamatát, mint a legáltalánosabb szervetlen nitrogénvegyület asszimilációt, a 6. ábra mutatja be. A cianobaktériumok nitrogénanyagcseréjét vázlatosan a 7. ábra foglalja össze.



6. ábra. A nitrát- és a nitritreduktáz működése. Fd: ferredoxin (Szalai, 1994)



7. ábra. A cianobakteriális nitrogén anyagcsere fő útjai. A szubsztrátok és a termékek nem sztöchiometrikus arányban vannak feltüntetve. A fekete körök az egyes szubsztrátokhoz tartozó permeázokat jelölik. Arg: arginin; Asp: aszparaginsav; C-vázak: a biomolekulák szénvázai; Gln: glutamin; Glu: glutaminsav; OG: 2-oxoglutarát. (Flores és Herrero, 1994)

2.2. Az *Aphanizomenon ovalisporum*

Az *Aphanizomenon ovalisporum* az oxigéntermelő, fotoszintetizáló baktériumok (Cyanobacteria) divízióján belül a Nostocales rendbe, a Nostocaceae családba tartozik. Az *Aphanizomenon* nemzetségre jellemző, hogy a fonalak egyenesek, vagy közel egyenesek, többnyire magányosak, ritkán nyalábokat alkothatnak. A fonal végén a sejtek elvékonyodnak (sokáig ez volt az egyik legfontosabb bélyeg az *Aphanizomenon* és az *Anabaena* genuszok megkülönböztetésében – Komárek, 1958). Az *A. ovalisporum* a légköri nitrogén megkötésére képes fonalas faj, azaz nitrát hiányában a kifejlett fonalakon heterociszták differenciálódnak. A fonalat alkotó vegetatív sejtek hosszúságuk, a sejthatárok jól kivehetőek (kismértékű befűződések láthatók a fonalon). A heterociszták gömbölyűek, vagy kissé elliptikusak, mindig egyesével, a vegetatív sejtek között található a fonalban, soha nem képződnek a fonal végén, és nem fordulnak elő csoportosan. Az érett heterociszták a vegetatív sejtektől jól megkülönböztethetők. A Nostocales rend többi nemzetségére jellemző módon az *A. ovalisporum* esetében is megtalálhatók a speciális szaporító- és kitartó képletek, az akinéták. Az akinéták gömb vagy ovális alakúak, szintén a vegetatív sejtek között figyelhetők meg a fonalban (Whitton, 2002). Irodalmi adatok szerint legtöbbször egyesével fordulnak elő, ritkán azonban egymás mellett kettő, vagy több akinéta is kialakulhat.

Az *A. ovalisporum* elsősorban a trópusi, szubtrópusi területeken tömeges, de a mérsékelt övben, így hazánkban is előfordul. A faj a vízvirágzást okozó cianobaktériumok között tartható számon, legismertebb az 1994-ben, az izraeli Kinneret-tóban lezajlott tömeges elszaporodása (Berman, 1997; Pollinger *et al.*, 1998; Hadas *et al.*, 1999). Shaw és munkatársai (1999) leírták a faj virágzását Ausztráliában, a közelmúltban pedig két görögországi tóban való megjelenéséről számoltak be (Gkelis *et al.*, 2005).

Az *A. ovalisporum* toxikus cianobaktérium. A Kinneret-tóból izolált törzs által termelt toxint Banker és munkatársai (1997) jellemezték, a toxin a citotoxikus alkaloidok közé tartozó cilindrospermopszinnek bizonyult (a toxinról részletesebben a 2.5. pontban szólunk). Későbbi vizsgálatok azt mutatják, hogy az eddig

izolált toxikus *A. ovalisporum* törzsek mindegyike cilindrospermopszint termel. (Shaw *et al.*, 1999; Gleiks *et al.*, 2005). A cianotoxin szintézisében résztvevő enzimek, és az enzimeket kódoló gének azonosítása folyamatban van (Shalev-Alon *et al.*, 2002; Kellmann *et al.*, 2006). A Kinneret-tóból származó törzsből egy cilindrospermopszin-származékot, a 7-epicilindrospermopszint is izoláltak (Banker *et al.*, 2000). A toxin szintéziséért felelős enzimeket kódoló gének feltérképezése mellett, illetve annak segítségével Kellmann és munkatársai (2006) a cilindrospermopszint termelő cianobaktériumok filogenetikai kapcsolatait is megpróbálták feltárni.

A korábban, a 16S rDNS szekvenciák felhasználásával készült törzsfák szerint a különböző *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek alkotnak egy csoportot, a másik csoportot – a morfológiai különbségek ellenére – az *Umezakia natans*, az *Aphanizomenon ovalisporum* fajok ismert törzsei, illetve az *Anabaenopsis* és a *Cyanospira* genuszok alkotják. Más *Aphanizomenon* fajok és az *Anabaena* genusz tagjai 93%-os vagy kisebb homológiát mutattak a 16S rDNS szekvenciában, így jól elkülöníthetők a fenti csoportoktól (Neilan *et al.*, 2003). A cilindrospermopszin szintézisében résztvevő enzimeket (poliketid-szintáz, amidino-transzferáz és protein-szintetáz) kódoló gének (*aoaA*, *aoaB* és *aoaC*) mindegyike megtalálható minden, genetikailag már vizsgált cilindrospermopszint termelő cianobaktériumban. A szekvencia adatok alapján a *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek egy csoportot alkotnak, míg a másik csoportba az *Umezakia natans*, és az *Aphanizomenon ovalisporum* izolátumai tartoznak, alátámasztva a 16S rDNS alapján kapott eredményeket. Az *Aphanizomenon ovalisporum* Izraelben izolált törzse (ILC-146) nagyobb homológiát mutat az *Umezakia natans*-szal, mint az Ausztráliában (APH028A) izolált törzs (Kellmann *et al.*, 2006).

Az irodalomban kevés adat található a faj ásványianyag-igényével kapcsolatban. A virágzását befolyásoló tényezőkre vonatkozóan szinte kizárólag a Kinneret-tóban lezajlott tömeges megjelenés kapcsán olvashatók eredmények. Elsődlegesen a N:P arány alakulását tanulmányozták, a tó szervesetlen nitrogéntartalmának fokozatos csökkenése, az oldott szervesetlen foszfor mennyiségének növekedése vezetett a cianobakteriális tömegprodukciónak kialakulásához (Gophen *et al.*, 1999). A tóban lezajlott tömegprodukciónál gyűjtött

adatok további tanulmányozása során felmerült, hogy a víz oldott szerves nitrogéntartalma (DON – Dissolved Organic Nitrogen) jelentős nitrogénforrás lehet és a heterociszták megléte nem feltétlenül jelent aktív nitrogénkötést (Berman, 2001). Az *A. ovalisporum* cilindrospermopszin termelése és a környezeti faktorok közötti összefüggések vizsgálatára vonatkozóan elmondható, hogy e téren hiányosak az irodalmi adatok.

2.3. A vízvirágzások

A vízvirágzás kifejezés alatt a planktonszervezetek tömeges elszaporodását értjük a felszíni vizekben, amely a víz intenzív elszíneződéséhez (zöld, kékeszöld, sárgászöld, sárga, vörös, barna) és zavarosodásához vezet. Jellemző lehet a „virágzó” vizekre a felszínen felgyülemelő élő, vagy elhalt alगतömeg, amely felszíni réteg, hab, hártya illetve darabos massa formát ölthet (Reynolds és Walsby, 1975). Toxikus vízvirágzásról abban az esetben beszélünk, amikor a vízvirágzásban előforduló planktonszervezetek olyan anyagcseretermékeket termelnek, amelyek valamilyen biológiai tesztben toxikusnak minősülnek.

A mérsékelt éghajlati övben az alga- és cianobaktérium-közösségek összetétele jellegzetes mintázatot mutat az évszakok váltakozásával. Télen és kora tavasszal, elsősorban az iszapban nagy mennyiségben jelenlévő, gyors növekedésű, kis méretű ostorosokat a zöldalgák követik a tavasz második felében, és nyár elején. Késő nyáron és ősszel olyan fajok jelennek meg, amelyek nehezen fogyaszthatók a zooplankton számára, mint a páncélos-ostorosok (Dinoflagellata) vagy a sárgászöld algák. Az eutróf és hipertróf vizekben a cianobaktériumok domináló előfordulása a nyári fitoplankton jellegzetessége. A trópusokon a szezonális változások nem elég nagyok ahhoz, hogy önmagukban indukálják a cianobaktériumok tömeges elszaporodását más fajok felett (Chorus és Bartram, 1999).

A cianobakteriális vízvirágzások kialakulásában kitüntetett szerepet játszik a nitrogén és a foszfor. Az eukarióta algák számára optimális N:P arányt (16-23:1/N:P) összehasonlítva a vízvirágzást

előidéző cianobaktériumok számára optimális aránnyal (10-16:1/N:P), látható, hogy ez az arány a cianobaktériumoknál alacsonyabb (Reynolds és Walsby 1975; Chorus és Bartram, 1999). A vízvirágzás nemcsak a modern civilizáció okozta foszfát és nitrát terhelt vizekre jellemző. Már 1188-ból származnak írásos emlékek arra vonatkozóan, hogy felfigyeltek a jelenségre. Hangsúlyozandó azonban, hogy az 1950-es évek előtt meglehetősen ritka volt, a beszámolók különleges és nem szokványos eseményként tárgyalták. A vízvirágzások történetében fontos időszak a műtrágyák illetve a foszforalapú mosószeres használatának világméretű elterjedése. Általánosan elfogadott az a nézet, hogy ezeknek az anyagoknak a felszíni vizekbe való bekerülése idézte elő korunk egyik aktuális problémáját, az egyre fokozottabb mértékű és gyakoribbá váló toxikus vízvirágzásokat. A vegyipar fellendülésével, az ezerkilencszázötvenes, de különösen a hatvanas évektől kezdődően a világ minden tájáról egyre gyakoribbak a toxikus vízvirágzásokról szóló jelentések.

1986-ban és 1987-ben a dél-finnországi Vesijarvi-tóban okozott toxikus vízvirágzást két *Anabaena* törzs. A két törzs együttesen tíz különböző mikrocisztin variánst termelt. A törzseket később alapos vizsgálatnak vetették alá, mely rámutatott, hogy az egyes környezeti faktorok (pl. fény- vagy foszforellátottság) mennyire nem egyértelműen befolyásolják a toxikus vízvirágzásért felelőssé tehető cianobaktérium faj toxicitását. A fenti eset érdekessége, hogy a neurotoxint termelő *Anabaena* törzs toxinszintjére a foszforhiány nem volt hatással, míg a hepatotoxint termelő törzsnél a toxinszint jelentősen csökkent a foszforéhezés körülményei között (Sivonen *et al.*, 1992, 1995). Ausztráliából több faj toxikus vízvirágzását publikáltak. A mérsékelt övi területeken elsősorban a *Microcystis*, *Anabaena* és *Nodularia* genuszok tömeges elszaporodása jellemző, míg a szubtrópusi, a trópusi területeken az *Aphanizomenon* és a *Cylindrospermopsis* fajok a leggyakoribbak. Igen súlyos következményekkel járt a *Cylindrospermopsis raciborskii* virágzása 1979-ben a Solomon-gátnál, Palm Island-en, Észak-Queensland területén. 138 hepatoenteritiszes megbetegedést jelentettek, az áldozatok elsősorban gyerekek voltak. A betegség hasi fájdalommal, a máj megnagyobbodásával járt, amit a vesefunkciók zavara és véres hasmenés követett. 1995 márciusa és júniusa között Brisbane ivóvízellátásában okozott problémát ugyanezen

faj a North Pine Vízározóban való tömeges elszaporodásával. Állatmérgezéseket jelentettek Új-Dél-Wales, Dél-Ausztrália, Victoria, Nyugat-Ausztrália és Queensland területéről. A mérgezések oka az *Anabaena circinalis*, *Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena*, *Cylindrospermopsis raciborskii* vagy az *Aphanizomenon ovalisporum* fajok virágzása volt (Vezeboer *et al.*, 2000). 1994 és 1998 között az izraeli Kinneret-tóban figyelték meg az *Aphanizomenon ovalisporum* faj tömeges elszaporodásait. A virágzás minden év hatodik hónapjában kezdődött, a gyors szaporodást gyors degradáció követte, majd a tizenkettedik hónapra a faj csaknem teljesen eltűnt. Az *A. ovalisporum*-ot 1994-ben találták meg a tóban, és ebben az évben érte el a legnagyobb előfordulást, kb. 6000 fonal/ml értékkel. A faj egértesztben toxikusnak bizonyult, a cianotoxint a korábban más fajokból már izolált cilindrospermopszinként azonosították (Banker *et al.*, 1997).

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).

2.4. A cianotoxinok

A cianotoxinok mind kémiai, mind toxikológiai szempontból a természetes toxinok egy igen változatos csoportját képviselik. Csoportosításuk több szempont szerint történhet, egyik lehetőség az, amikor a magasabb rendű gerincesekre gyakorolt hatásuk alapján rendszerezik őket. Így beszélhetünk idegmérgekről (anatoxin-a, saxitoxinok), hepatotoxinokról (mikrocisztinek, nodularin és cilindrospermopszin) és gastroenteritis-hez hasonló egészségromlást okozó toxinokról (mint például a lipopoliszacharidok; Chorus és Bartram, 1999). Kémiai szerkezetük alapján a cianotoxinok három nagy csoportja különböztethető meg: ciklikus peptidok, alkaloidok és lipopoliszacharidok (Chorus és Bartram, 1999).

2.4.1. A hepatotoxikus ciklikus peptidok – a mikrocisztinek és a nodularinok

A vízvirágzásokból leggyakrabban kimutatott cianotoxinok a ciklikus peptidok köréből, a mikrocisztin és nodularin családból kerülnek ki. Egértesztben ezek a vegyületek a máj „vérzését” okozva néhány órán belül a kísérleti állatok pusztulását idézik elő. Mikrocisztineket termelő szervezetek a planktonikus *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria (Planktothrix)*, *Nostoc*, és *Anabaenopsis* fajok és a szárazföldi *Hapalosiphon* genusz. Nodularin termelést eddig csak a *Nodularia spumigena* fajnál mutattak ki.

A ciklikus peptidok molekulatömege ~800-1100 Da, öt (nodularinok) vagy hét (mikrocisztinek) aminosavból épülnek fel. Felépítésükben az L- és D-aminosavak mellett szokatlan, ritka aminosavszármazékok vesznek részt (Chorus és Bartram, 1999). Vízoldhatók és néhány, számos hidrofób csoportot tartalmazó mikrocisztin kivételével, nem képesek közvetlenül áthatolni az állati, a növényi és a bakteriális sejt membránján. A sejtbe való bejutásukban olyan transzporterek vesznek részt, amelyek egyébként esszenciális vegyületek szállításában játszanak szerepet. A környezetbe ezek a toxinok csak a cianobakteriális sejtek pusztulása után, azok lízise

alkalmával kerülhetnek, kémiai stabilitásuk és vízdoldhatóságuk következtében kiszabadulásuk után hosszabb-rövidebb ideig jelen lehetnek a felszíni vizekben. A mikrocisztinek és nodularinok toxicitásának alapja, hogy erősen képesek kötődni az emlőssejtek kulcsfontosságú enzimeikhez, a protein-foszfatazokhoz. Lineáris formában mindkét vegyületcsoport alacsonyabb toxicitást mutat. (Harada *et al.*, 1999).

A mikrocisztin típusú toxinokat elsőként a *Microcystis aeruginosa* cianobaktérium fajból izolálták, innen ered e toxincsalád elnevezése (Carmichael, 1989). Napjainkra több mint 100 strukturális variánst azonosítottak a különböző cianobaktérium törzsekből. A szerkezeti eltérések a cianotoxinban előforduló hét aminosav bármelyikét érinthetik (Carmichael, 1992, 1994).

A brakkvizekben előforduló cianobaktérium faj, a *Nodularia spumigena*, a mikrocisztinokkal azonos hatású, egyszerű szerkezetű ciklikus pentapeptidet tartalmaz, amelyet az organizmus nevéreől nodularinnak neveztek el. E vegyületnek is több szerkezeti variánsát izolálták. A *Theonella swinhoei* tengeri szivacsban találtak egy nodularin-analógot, a motuporint, amely csak egyetlen aminosavban különbözik a nodularintól. Feltételezhetően cianobakteriális eredetű a toxin, mivel ismert, hogy a szóbanforgó szivacsnak cianobakteriális szimbiontái vannak (Chorus és Bartram, 1999).

2.4.2. A neurotoxikus alkaloidok – az anatoxinok és a saxitoxinok

A neurotoxikus cianobaktériumok megjelenéséről Észak-Amerikában, Európában és Ausztráliában számoltak be, ahol állatmérgezéseket okoztak. Egérteszben a neurotoxinok a légzés gátlása miatt igen gyorsan (2-30 percen belül) a kísérleti állatok pusztulását okozzák. Három cianobakteriális neurotoxin család ismert:

- az anatoxin-a és homoanatoxin-a, amelyek acetilkolin analógnaként viselkednek,
- az anatoxin-a (S), amely egy antikolinészteráz, és

- a saxitoxinok, amelyek blokkolják az idegsejtek nátriumcsatornáit.

Az anatoxin-a egy kis molekulatömegű alkaloid (165 Da), másodlagos amin. Anatoxin-a-t termelnek a következő fajok: *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena* spp. (*flos-aquae* – *lemmermannii* csoport), *Anabaena planktonica*, az *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* és *Cylindrospermum* genuszok fajai. A homoanatoxin-a (179 Da) egy anatoxin-a homológ, amelyet egy *Oscillatoria formosa* (*Phormidium formosum*) törzsből izoláltak (Skulberg *et al.*, 1993).

Az anatoxin-a (S) ciklikus N-hidroxiguanin foszfát észter, amelyet az NRC 525-17 jelű *Anabaena flos-aquae* törzs termel. A vegyületet az *Anabaena lemmermannii*-ből is izolálták (Henriksen *et al.*, 1997). Az anatoxin-a (S)-nek nem találtak strukturális variánsát.

A saxitoxinok a karbamát alkaloid neurotoxinok egy csoportját alkotják, amelyek lehetnek nem szulfatáltak (saxitoxinok – STX), egyszeresen szulfatáltak (gonyautoxinok – GTX) vagy kétszeresen szulfatáltak (C-toxinok). Néhány fajból dekarbamoil változatokat és több új toxint is leírtak. A saxitoxinokat eredetileg kagylókból izolálták, amelyekben táplálékukból, tengeri páncélos ostorosokból dúsultak fel, és emberi haláleseteket is okoztak. Saxitoxinokat az alábbi cianobaktérium fajokban találtak: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei* és *Cylindrospermopsis raciborskii* (Chorus és Bartram, 1999).

2.4.3. A citotoxikus alkaloidok

Az Ausztrália trópusi és szubtrópusi vizeiből izolált szervezetekből kimutatott cilindrospermopszin egészen más mechanizmus szerint okozott egészségügyi problémákat az ivóvízben való megjelenésével. Ez a vegyület egy ciklikus guanidin alkaloid (415 Da), amelyet napjainkra több cianobaktérium fajból izoláltak. Elsőként a *Cylindrospermopsis raciborskii*-ből írták le (Hawkins *et al.*, 1985, 1997), innen ered a vegyület elnevezése. A cilindrospermopszin elsősorban a májra hat, de rendellenes elváltozásokat indukál a vesékben, lépben, timuszban és a szívben is. A cilindrospermopszin

szerkezeti változatait is izolálták: a deoxicilindropermopszint a *C. raciborskii* egyik törzséből (Norris *et al.*, 1999), a 7-epicilindropermopszint az *A. ovalisporum* izraeli (ILC-146) törzséből (Banker *et al.*, 2000). A cilindropermopszinról részletesebben a 2.5. fejezetben szólunk.

2.4.4. A dermatotoxikus alkaloidok – az aplysiatoxinok és a lyngbyatoxinok

Tengeri, bentikus cianobaktériumok, mint pl. *Lyngbya*, *Oscillatoria* és *Schizothrix* fajok termelhetnek olyan toxinokat, amelyek komoly dermatitist okozhatnak. A *Lyngbya* gyulladáskeltő hatásáért az aplysiatoxinok és debromoaplysiatoxinok felelősek, amelyek potenciális tumor promoterek és protein kináz-C aktivátorok. A *Lyngbya majuscula* egy másik törzse dermatitist és súlyos száj és gyomor/bélgyulladást okoz. Ez a faj lyngbyatoxin-a-t tartalmaz (Chorus és Bartram, 1999).

2.4.5. Az irritáló hatású toxinok – a lipopoliszacharidok

Először Weise és munkatársai (1970) izoláltak lipopoliszacharidokat az *Anacystis nidulans* cianobaktérium fajtól. A lipopoliszacharidok általában a Gram-negatív baktériumok sejtfalához tartozó külső membránban találhatók, ahol fehérjékkel és foszfolipidekkel alkotnak komplexet. A lipopoliszacharidok, ahogy a nevük is mutatja egy cukorkomponensből, általában hexózból és egy lipid alkotórészből, leggyakrabban 14-18 szénatomszámú hidroxizsírsavakból állnak. A zsírsav komponens tehető felelőssé az emberben és emlősállatokban kiváltott allergiás tünetekért (Keleti és Sykora, 1982).

2.4.6. Egyéb cianobakteriális bioaktív vegyületek

Ismert, hogy a cianobaktériumok sok más bioaktív vegyületet is termelnek, amelyek közül néhány az orvosi alkalmazás területén is érdeklődésre tarthat számot, mások toxikusak lehetnek cianobaktériumokra, baktériumokra, algákra és a zooplanktonra. A cianobaktériumok által termelt vegyületek között találunk tumorellenes, antivirális, antibiotikus és gombaellenes anyagokat. A cryptophycin nevű depsipeptidet (olyan peptid, amely egy észterkötést tartalmaz) egy *Nostoc* faj GSV 224 jelű törzséből izolálták, ígéretes rákellenes szernek tartják. Napjainkban egyre több új, biológiailag aktív ciklikus, lineáris és depsipeptidet izolálnak különböző cianobaktériumokból (Chorus és Bartram, 1999).

2.4.7. A cianotoxinok szintézisének szabályozása, cianotoxinok a környezetben

A cianotoxinok bioszintézisének felderítése kezdeti stádiumban van, több cianotoxin képződésének tanulmányozására jelzett prekursorokat alkalmaznak. Így pl. radioaktív szénizotóp felhasználásával követhetővé válik a toxin szénvázának kialakulása.

A toxinok kimutatására, mennyiségi meghatározására az egér- és újabban a csíranövény-teszt mellett modern műszeres analitikai módszereket, mint pl. magasnyomású folyadék kromatográfiát, kapilláris elektroforézist, vagy immunológiai módszereket alkalmaznak. Tiszta cianobaktérium törzsekkel végzett laboratóriumi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a környezeti faktorok változásokat indukálhatnak a toxicitás mértékében, a toxin koncentrációban. A leginkább vizsgált környezeti tényezők a következők: fény, hőmérséklet, ásványi anyagok koncentrációja (makro- és mikroelemek), pH. E tényezők nagyon sokféleképpen hathatnak a különböző fajok toxintermelésére, de ugyanazon faj eltérő toxint termelő törzseire is. A mikrocisztinek és az anatoxin-a a kedvező növekedési körülmények között, a növekedés logaritmikus fázisában érik el a legmagasabb koncentrációt. Ugyanakkor ismeretesek olyan

mikrocisztint termelő törzsek is, amelyekben a toxinkoncentráció a növekedés teljes időtartama alatt közel konstans marad. A vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a cianobaktériumok több toxint termelnek kedvezőbb növekedési körülmények között. Így pl. a 10°C alatti és 30°C feletti hőmérsékleten jelentősen csökken a sejtek toxintartalma (Chorus és Bartram, 1999). Az ellenkező esetre is van példa: Van der Westhuizen és Eloff (1983) tanulmánya szerint a sejtek túl magas vagy alacsony pH mellett toxikusabbnak mutatkoztak. Az ásványi anyagok koncentrációjának hatása is nagy változatosságot mutat: alacsonyabb foszforkoncentrációnál bizonyos toxinok (pl. mikrocisztinek) mennyisége kisebb, míg más toxinokra (pl. anatoxin-a) a foszforkoncentráció nincs hatással. (Chorus és Bartram, 1999).

A cianotoxinok elsősorban a sejtek pusztulása után, a sejtfal és a membrán degradációját, lízisét követően kerülnek a környezetbe, aktív kiválasztásuk az élő sejt által csak ritkán fordul elő. Egészséges, a növekedés logaritmikus fázisában lévő kultúrában a teljes toxinmennyiségnek mindössze 10-20%-a extracelluláris (Sivonen és Jones, 1999). A környezetben, a vízvirágzás kibontakozásának kezdeti szakaszában az extracelluláris toxinkoncentráció csupán 0,1-10 µg/l. Ez az érték a virágzás összeomlásakor 3000-25000 µg/l is lehet (Lindholm és Meriluoto, 1991; Jones és Orr, 1994). Ez igen fontos adat a vízkezelés szempontjából: a vízvirágzások réz-alapú vagy szerves herbicidekkel való kezelése a környező vizek toxintartalmának óriási mértékű növekedéséhez vezethet. A toxinok négy nagy csoportja, kiszabadulva a sejtől különböző kémiai stabilitást mutat a vízben.

A mikrocisztinek, lévén ciklikus peptidek, extrém módon képesek ellenállni a hidrolízisnek vagy az oxidációnak a semleges pH-tartomány közelében. A mikrocisztinek és a nodularinok aktívak maradnak még forralás után is. A természetes vizekben hónapokig vagy évekig is jelen lehetnek. Magas hőmérsékleten (40°C) és alacsony pH-n lassú hidrolízis zajlik, a jelen lévő toxinmennyiség pH=1 esetén 10 hét alatt 90%-ban bomlik le. Gyors lebontásukra csak laboratóriumi körülmények között van lehetőség, pl. 6M HCl jelenlétében magas hőmérsékleten, erős oxidáló ágensek segítségével (pl. ózon) vagy UV sugárzás alkalmazásával. Erős napfényben a mikrocisztinek lassú fotokémiai bomláson és izomerizáción mennek keresztül. A fotodegradáció lejátszódásához vízoldható sejtpigmentek,

fikobiliproteinek jelenlétére van szükség. Ilyen körülmények között 2-6 hét alatt 90%-os bomlás megy végbe. Gyorsabban zajlik a folyamat humuszanyagok jelenlétében (Chorus és Bartram, 1999).

Az anatoxin-a viszonylag stabil sötétben, de napfényben enyhén lúgos körülmények között gyorsan elbomlik. Természetes fényviszonyok és pH=8-10 mellett a toxin féléletideje 14 nap (alacsony, 10 µg/l kezdeti koncentráció esetén). Az anatoxin-a (S) semleges és savas körülmények között viszonylag stabil (Chorus és Bartram, 1999). A saxitoxinok szobahőmérsékleten sötétben egy sor lassú hidrolitikus reakción mehetnek át. Fotolízisük ez idáig nem bizonyított.

A toxinok kiülepedése, az iszapban való felhalmozódása nem jellemző folyamat, mivel az ott élő baktériumok által gyorsan lebontásra kerülnek. A ciklikus peptidek biodegradációjára vonatkozóan ismert a legtöbb adat, a folyamat a gyűrű felnyitására, egyes szubsztituensek lehasítására képes baktériumok tevékenységéhez köthető (*Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Proteobacteria* fajok; Jones *et al.*, 1994). Egyes *Pseudomonas* törzsek képesek az anatoxin-a lebontására is.

A cianotoxinok bioakkumulációjára sok példát láthatunk. A mikrocisztinek felhalmozódhatnak vízi gerincesekben és gerinctelenekben (halakban, puhatestűekben és a zooplanktonban). A puhatestűekben a legnagyobb mikrocisztin koncentráció a hepatopankréaszban található, gerincesekben a cianotoxin a májban halmozódik fel. A saxitoxinok a tengeri páncélos ostorosokat (*Dinoflagellata*) fogyasztó gerincesekben és gerinctelenekben akkumulálódnak (Chorus és Bartram, 1999).

A cianotoxinok baktériumokra gyakorolt hatása nem egyértelmű. Laboratóriumi körülmények között bizonyos törzsek növekedését gátolni képesek, de ez a hatásuk a természetben nem bizonyított. A cianotoxinok a zooplankton képviselőire sokféle hatással vannak, melyek még nem egyértelműen tisztázottak. A halak hasonló módon reagálnak a toxinokra, mint az emlősök a laborkísérletekben. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a táplálkozás során a szervezetbe kerülő toxikus cianobaktériumok, vagy cianotoxinok a májsejtek nekrozisát okozzák, amit a halak pusztulása követ. Az érzékenységben nagy eltérések mutatkoznak a különböző fajok között. A cianotoxinok

károsíthatják a májon kívül a szívet, a vesét, a kopoltyút, a bőrt és a lépet. Ilyen károsodásokat az európai ponty (*Cyprinus carpio*) esetében is leírtak (Chorus és Bartram, 1999).

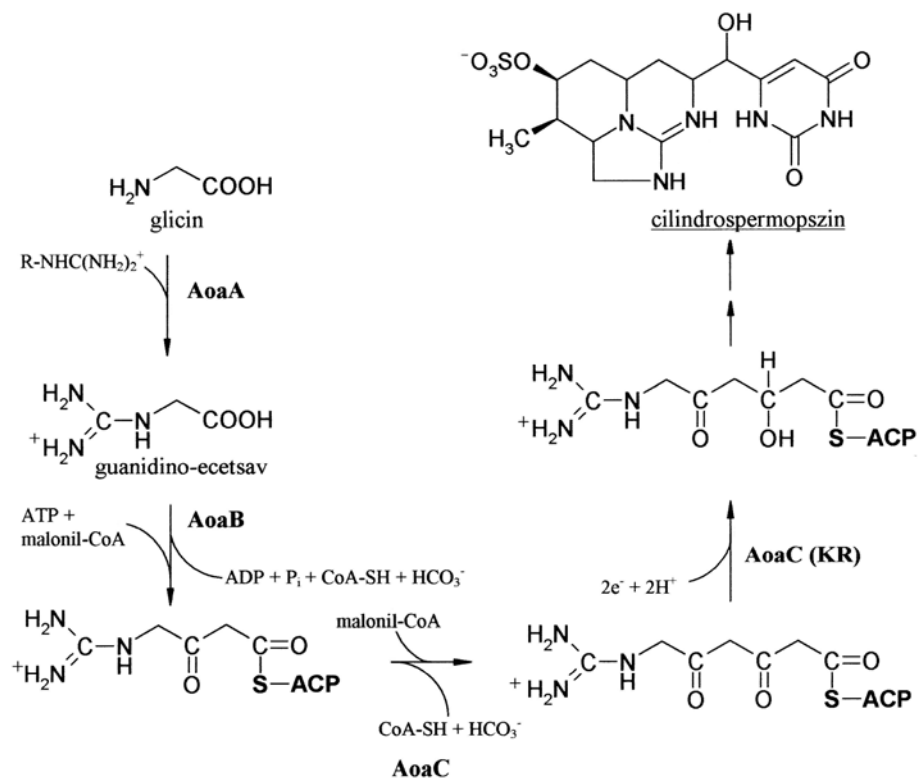
2.5. A cilindrospermopszin

A cilindrospermopszin, mint az előzőekben láthattuk, a citotoxikus alkaloidok közé tartozó cianotoxin. Ciklikus guanidin alkaloid, melynek molakulatömege 415 Da. A *Cylindrospermopsis raciborskii*, (Hawkins *et al.*, 1985, 1997), az *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1994), az *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker *et al.*, 1997), a *Raphidiopsis curvata* (Li *et al.*, 2001), az *Anabaena bergii* (Schembri *et al.*, 2001; Fergusson és Saint, 2003), az *Aphanizomenon flos-aquae* (Preussel *et al.*, 2006), az *Anabaena lapponica* (Spoon *et al.*, 2006) és a *Lyngbya wollei* (Seifert *et al.*, 2007) cianobaktérium fajok esetében nyert bizonyítást, hogy cilindrospermopszint termelnek. Tiszta formában a toxin elsősorban a májra hat, de káros hatást gyakorol a vesére, lépére, timuszra és a szívre is (Runnegar *et al.*, 1994, 1995; Runnegar és Lu, 1994; Falconer *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2002). Újabban a cianotoxin neuronokra való hatását is kimutatták (Kiss *et al.*, 2002), sőt genotoxikus volta is felmerült (Shen *et al.*, 2002). A cilindrospermopszin pontos hatásmechanizmusa még nem tisztázott. Az irodalomban találunk adatokat arra vonatkozóan, hogy gátolja a fehérjeszintézist állati (Froschio *et al.*, 2003) és növényi sejtekben is (Metcalf *et al.*, 2004). Reisner és munkatársai (2004) eredményei szerint a toxin a pirimidinszintézist gátolja. A cilindrospermopszin széleskörű hatásainak hátterében álló pontos molekuláris mechanizmusok feltárása további kutatások tárgyát képezi.

Az 1994-es Kinneret-tavi (Izrael) vízvirágból származó *Aphanizomenon ovalisporum* törzsből izolált biológiailag hatásos vegyület optikai aktivitást mutat, a látható fényt + 10,2° mértékben elforgatja. A forgatás mértéke és iránya bázikus (pH=9,0 NH₄OH-al beállítva), semleges (pH=7,0) valamint savas (pH=5,0 CH₃COOH-al beállítva) közegben sem változik. Az *Umezakia natans*-ből izolált vegyület ugyanilyen optikai tulajdonságokkal jellemezhető, míg a

Cylindrospermopsis raciborskii terméke ellentétes értéket mutat (Ohtani *et al.*, 1992).

Burgoyne és munkatársai (2000) közöltek először adatokat a cianotoxin bioszintéziséről. Radioaktív izotópokkal jelölt feltételezett prekursor molekulák felhasználásával tárták fel a cilindrospermopszin képződésének lépéseit *Cylindrospermopsis raciborskii*-ban. Kimutatták, hogy a molekula alapja a guanidino-ecetsav, amely öt acetát egységből épül fel. Az acetát egységek adják a CYN 4. – 13. szénatomjait, a 14. és 15. szénatom, a 16-os számú nitrogén glicinből származik. Az acetát egységek és a glicin összekapcsolását a poliketid-szintetáz enzim végzi, a ciklizáció feltételezhetően autokatalitikus úton megy végbe. A 16-os számú nitrogén nem a glicin ismert aminációjával épül be a molekulába és a NH-CO-NH szegment eredete is ismeretlen. Feltételezik, hogy a guanidino-ecetsav létrejöttében egy amidino-transzferáz enzim is részt vesz. Ezt a feltevést látszanak alátámasztani Shalev-Alon és munkatársainak (2002) eredményei is. Kutatócsoportjuk egy amidino-transzferázt kódoló gént azonosított az *Aphanizomenon ovalisporum*-ban. A gén a szekvenciaadatok alapján a *Streptomyces griseus*-ból leírt prokarióta típusú amidino-transzferáz enzimet kódolja. A gén egy poliketid szintetázt és egy peptid-szintetázt kódoló gén között helyezkedik el - „szomszédjai” kulcsfontosságúak a cilindrospermopszin szintézisében. A hasonló élettani folyamatokban vagy biomolekulák szintézisében résztvevő enzimeket kódoló gének a prokariótákban, az esetek túlnyomó többségében, klaszterekben, szabályozási egységekbe tömörülnek. Mindez azt sugallja, hogy az amidino-transzferáz enzimnek szerepe van a cianotoxin létrejöttében. A cilindrospermopszin bioszintézisének vázlata a 8. ábrán látható.



8. ábra. A cylindrospermopszin szintézis első lépései során lejátszódó biokémiai reakciók, amelyeket három géntermék, az AoaA, AoaB, és az AoaC katalizál az *A. ovalisporum*-ban. ACP: Acil karrier protein; KR: ketoreduktáz. Az ábra Kellmann és munkatársai (2006) nyomán készült.

A cylindrospermopszin sötétben viszonylag stabil, magas hőmérsékleten (50°C) lassú bomlása figyelhető meg (Chiswell *et al.*, 1999). Napfényben, pigmentek (fikobiliproteinek) jelenlétében relatíve gyorsan bomlik, 2-3 nap alatt a kiindulási mennyiség 90%-a degradálódik. A tiszta toxin napfényben is stabilnak mondható (Chiswell *et al.*, 1999).

A cylindrospermopszin kiülepedése, az iszapban való felhalmozódása nem jellemző folyamat, bioakkumulációjára már több példát láthatunk (elsősorban rákok, kagylók esetében - Saker és Eaglesham, 1999; Saker *et al.*, 2004; Kankaanpaa *et al.*, 2005). A cianotoxinok a zooplankton képviselőire sokféle hatással vannak,

melyek még nem egyértelműen tisztázottak (Fabbro *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2004). A cilindrospermopsin vízi gerincesekre kifejtett hatásáról lényegesen kevesebb adat található az irodalomban, a vizsgálatok azt mutatják, hogy a mérgezési tünetek hasonlóak, mint az emlősök esetében a laborkísérletekben. A táplálkozás során a szervezetbe kerülő, cilindrospermopszint termelő cianobaktériumok, vagy maga a toxin a májsejtek nekrozisát okozza, amit a halak pusztulása követ. Az érzékenységben nagy eltérések mutatkoznak a különböző fajok között. A cilindrospermopszin károsíthatja a májon kívül a szívet, a vesét, a kopolyút (Chorus és Bartram, 1999). Mint fentebb már szóltunk róla, a cianotoxin hatásának pontos mechanizmusa még nem tisztázott.

Az 1990-es évek óta több kutatócsoport foglalkozott a cilindrospermopszin szerves kémiai szintézisével. 1995-ben Snider és Harvey egy biciklikus modell szintézisét valósították meg. 1996-ban Heintzelman és munkatársai a piperidin A-gyűrűt, 1998-ban Snider és Xie a biciklikus guanidint és a hidroximetiluracil oldalláncot hozták létre szerves kémiai szintézissel. Később a molekula szintézisét többen megvalósították (Xie *et al.*, 2000; White és Hansen, 2000), sőt, a 7-epicilindrospermopszin totálszintézise is megvalósult (Heintzelman *et al.*, 2001, 2002; Looper és Williams, 2004; White és Hansen 2005). A kémiai szintézis hozzásegít a molekula szerkezetének pontosabb megismeréséhez, a szerkezet és a hatásmechanizmus összefüggéseinek alaposabb megértéséhez. Ezek a vizsgálatok egészen a közelmúltig folytak és minden bizonnyal tovább folynak a jövőben is.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyésztése

Munkánk során 2.2. pontban részletesen bemutatott, az izraeli Kinneret-tóból izolált toxikus *Aphanizomenon ovalisporum* törzssel dolgoztunk (ILC-164). Az izolátum a Debreceni Egyetem Növényzeti Tanszékének törzsgyűjteményében BGSD-423 jelöléssel szerepel.

A cianobaktériumok tenyésztése során a BG-11 és az Allen tápoldatok használata általánosan bevált. Az *Aphanizomenon ovalisporum* törzs fenntartására, illetve tenyésztésére egyszeres ásványianyag tartalmú Allen médiumot használtunk (Allen, 1968).

A vizsgálatainkhoz szükséges tenyészetek létrehozásához exponenciális növekedési fázisban lévő, steril levegővel buborékolgatott *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetből a sejteket laboratóriumi hőmérsékleten (20-25°C) centrifugáltuk (6000×g, 10 perc Beckman Avanti J-25), majd szulfátot, foszfátot, illetve nitrátot nem tartalmazó tápoldatban reszuszpendáltuk. Ezt követően a sejtszuszpénziót 400 ml Allen tápoldatot tartalmazó, 500 ml-es Erlenmayer lombikokba oltottuk szét. A növekedésváltozásokat, az enzimológiai folyamatokat és a toxintartalom alakulását kéthetes periódusban követtük nyomon, a következő tenyészetekben:

- Kontroll: teljes ásványianyag tartalmú Allen médiumban növekvő tenyészet.
- -S: szulfátot nem tartalmazó Allen médiumban növekvő tenyészet. Az Allen tápoldat magnézium-szulfát ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) és vas-szulfát ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) formájában tartalmaz ként, valamint a mikroelemek közül a réz és a cink is szulfát-sóként van jelen. A szulfátmentes tápoldatban a magnézium-szulfátot ekvivalens mennyiségű magnézium-nitráttal ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), a vas-szulfátot vas-kloriddal ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) helyettesítettük, a réz- és cinktartalmat réz-klorid (CuCl_2) és cink-klorid (ZnCl_2) formájában biztosítottuk.
- +-S: a tenyésztés első 48 órájában teljes ásványianyag tartalmú Allen médiumban növekvő tenyészet, majd a 48. óra után a sejteket centrifugáltuk (6000×g, 10 perc Beckman Avanti J-25),

szulfátmentes médiumban reszuszpendáltuk, ezt követően az eredeti térfogatnak megfelelő szulfátot nem tartalmazó Allen médiumban vettük fel.

- -+S: a tenyésztés első 48 órájában szulfátmentes Allen médiumban nevelt tenyészet, amelyhez a tenyésztés 48. órája után a térfogatnak megfelelő mennyiségű szulfátot adtunk (MgSO_4 formájában, hogy ne növeljük meg a tápoldat nehézfém-tartalmát – a cianobaktériumok a nehézfémekre, különösen a rézre nagyon érzékenyek).
- -P: foszfátot nem tartalmazó Allen médiumban növekvő tenyészet. A tápoldat K_2HPO_4 formájában tartalmazza a foszfátot, a foszfátmentes tápoldatban a káliumot KCl-dal pótoltuk.
- +-P: a tenyésztés első felében (168 órán át) teljes ásványianyag-tartalmú Allen médiumban növekvő tenyészet, majd a tenyésztés hetedik napján a sejteket centrifugáltuk ($6000\times g$, 10 perc Beckman Avanti J-25), foszfátmentes médiumban reszuszpendáltuk, majd az eredeti térfogatnak megfelelő foszfátot nem tartalmazó Allen médiumban vettük fel.
- -+P: a tenyésztés első felében (168 órán át) foszfátmentes Allen médiumban nevelt tenyészet, majd a tenyésztés hetedik napján a térfogatnak megfelelő mennyiségű foszfátot adtunk a tenyészethez K_2HPO_4 formájában.
- -N: A kontroll körülmények között nevelt tenyészet a teljesen nitrogénmentes táptalajba való áttöltést nem viseli el, ezért a kötött nitrogénéhezetéshez az inokulumot centrifugáltuk ($6000\times g$, 10 perc Beckman Avanti J-25), a sejteket 0,18 mM nitrogéntartalmú médiumban (a nitrogéntartalom az eredeti -kontroll - Allen médium nitrogéntartalmának 2%-a) reszuszpendáltuk. A tápoldatban a nitrogén NH_4NO_3 formájában volt jelen. Az így indított tenyészetet tekintjük -N tenyészetnek.
- +-N: a tenyésztés első felében (168 órán át) teljes ásványianyag-tartalmú Allen médiumban növekvő tenyészet, majd a tenyésztés hetedik napján a sejteket centrifugáltuk ($6000\times g$, 10 perc Beckman Avanti J-25), 2% N-tartalmú médiumban

reszuszpendáltuk, majd az eredeti térfogatnak megfelelő, 2% nitrogént tartalmazó Allen médiumban vettük fel.

- +N: a tenyésztés első felében (168 órán át) 2% nitrogéntartalmú Allen médiumban nevelt tenyészet, majd a tenyésztés hetedik napján a térfogatnak megfelelő mennyiségű nitrátot adtunk a tenyészethez NaNO_3 formájában.

A tenyészetek nevelése, illetve a törzs fenntartása állandó fényen (max. $30 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ fényerő, PolyLux XL_R fénycsövek) 28°C-on, steril levegővel buborékolatott 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban történt.

3.2. A fénymikroszkópos morfológiai vizsgálatok

A különböző éhezési körülmények között végbemenő morfológiai változásokat OLYMPUS PROVIS AX 70 típusú mikroszkóp segítségével követtük nyomon. Naponta 5 μl mintát vettünk a tenyészetekből, a fotózás 18×18 mm-es fedőlemez alatt, OLYMPUS CAMEDIA típusú digitális kamerával történt. A képek 1000-szeres nagyítással, a digitális feltét kétszeres zoom funkciójának felhasználásával készültek, világos látóterű (Bright Field – BF) és polarizált (PO) megvilágítási módban (ez utóbbi esetben a polarizátornak köszönhetően tört fény éri a mintát, aminek eredményeként „felületi” kép keletkezik).

3.3. A tenyészetek növekedésének nyomon követése

A tenyészetek növekedése alatt a klorofill-a és a fehérjetartalom, a száraz tömeg illetve a sejtszám változását értjük, a kísérletek során e paraméterek változását követtük nyomon. A továbbiakban tehát növekedésen a klorofill-a és a fehérje mennyiségének növekedését, a száraz tömeg illetve a sejtek számának emelkedését értjük, növekedésváltozáson az ezek mennyiségében bekövetkező változást.

3.3.1. A Klorofill-a tartalom meghatározása

A klorofill-a tartalom meghatározása során a 663 nm-en 80%-os acetonban mért fényabszorpció alapján számítottuk a pigmenttartalmat ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, Bendall *et al.*, 1988). A meghatározáshoz minden nap 200 μl mintát vettünk a tenyészetekből. A növekedésváltozásokat 14 napos időszak alatt követtük nyomon, az ennél idősebb tenyészetek már stacioner kultúrának számítanak.

3.3.2. A száraz tömeg meghatározása

A szárazanyag-tartalom meghatározásához minden nap 3 ml mintát vettünk, a mintákat centrifugáltuk ($6000\times g$, 3 perc, Fisher Model 59A), majd mosás után liofilizáltuk (fagyasztva szárítottuk). Az eredmények egyrészt a tenyészetek növekedéséről tájékoztattak, másrészt ezekből a mintákból mértük az intracelluláris toxintartalmat is, amelyet a száraz tömegre vonatkoztatva is megadtunk.

3.3.3 A fehérjetartalom mérése

A sejtek fehérjetartalmának ismerete az ATP-szulfuriláz és alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának meghatározásához, illetve a nitrogenáz enzim vizsgálatához elengedhetetlenül szükséges, és további információt szolgáltat a tenyészetek növekedéséről. A fehérjetartalom meghatározásához 8 óránként 2 ml mintát vettünk a tenyészetekből (ebből a mintából határoztuk meg az ATP-szulfuriláz enzim aktivitását is).

A fehérjekivonást jégen végeztük, a sejtek feltárását háromszori fagyasztással értük el. A kivonatok fehérjetartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford, 1976).

3.3.4. A sejtszám meghatározása

A sejtszámolást JENAVAL mikroszkóppal, 18×18 mm-es fedőlemez alatt végeztük. A sejtszám meghatározásához 5 µl mintát vettünk a tenyészetekből, melyben 300-szoros nagyítás mellett a fonalakat, 1000-szeres nagyítással a sejteket számláltuk meg. A mintákat légmentesen szigeteltük, hogy a párolgást megakadályozzuk. A sejtszámot $\text{sejt} \times \text{ml}^{-1}$ egységben adtuk meg.

3.4. A heterociszták izolálása

A heterociszták izolálásához a Smith és munkatársai (1988) által kidolgozott módszert alkalmaztuk, kis módosításokkal. A módszer lényege, hogy a centrifugálással töményített sejt (fonal) szuszpenziót lizozimos emésztésnek vetjük alá. A lizozim a setfalat elbontja, a heterociszták speciális burka azonban hosszabb ideig ellenáll az emésztésnek, mint a vegetatív sejtek „hagyományos” Gram-negatív sejtfa. A széteső fonalak illetve vegetatív sejtek közül a más ülepedési sajátságokkal bíró heterociszták differenciál-centrifugálással elválaszthatók.

Nagy mennyiségű heterociszta előállításához 8 l nitrátmentes Allen tápoldatot oltottunk be 400 ml egy hetes nitrátéheztetett (aktív heterocisztákkal rendelkező) inokulummal. A tenyészetet az exponenciális növekedési fázis végéig (9-10 nap) neveltük. A 10. napon a tenyészetet centrifugáltuk (6000×g, 10 perc Beckman Avanti J-25), majd a sejteket 60 mM pH 7,5 Tris-HCl, 50 mM mannitol, 1 mM EDTA és 1,0 mg × ml⁻¹ lizozim tartalmú szuszpenziós közegben vettük fel. A szuszpenziót 2 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőn tartottuk, majd desztillált vízzel a kiindulási térfogat tízszeresére hígítottuk. A lizozimmal való emésztés, majd a hígítás okozta ozmotikus sokk következtében a vegetatív sejtek elroncsolódtak. A heterocisztákat differenciál-centrifugálással választottuk el a sejtörmeléktől. A centrifugálást Janetzki K23 típusú, kilengőfejes centrifugával végeztük (350-1400×g, 5 perc). Minden centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót és a heterociszták állapotát mikroszkóppal

(JENAVAL) ellenőriztük. A következő centrifugálás előtt a csapadékot lizozim-mentes szuszpenziós közegben vettük fel. A centrifugálás után a sejttömeget UG-160 típusú szonikátorral háromszor 15 s időtartamban szonikáltuk. A szonikált sejttömeget szuszpenziós közegben mostuk, majd centrifugáltuk (6000×g, 10 perc Beckman Avanti J-25). A üledéket – ép heterociszták tömegét – 5 mM pH 7,5 Tris-HCl pufferben vettük fel (a heterociszták épségét elsősorban a poláris testek megfelelő helyzete alapján állapítottuk meg). A heterociszták feltárása többszöri fagyasztás-olvasztással, illetve szükség esetén szonikálással történt. A feltárás, majd centrifugálás után nyert felülúszót alkalmaztunk a tisztított heterociszták enzimológiai (Western-blot) és toxikológiai (CE) vizsgálatához.

3.5. Enzimológiai vizsgálatok

3.5.1. Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának mérése

Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitását a Lappartient és Touraine (1996) által leírt módszer módosításával mértük. Az enzimreakció első lépésében a reakcióelegyet 37 °C-on egy órán át inkubáltuk, majd a reakciót 100 µl 20%-os SDS hozzáadásával állítottuk le (500 µl reakcióelegy tartalma: 80 mM Tris-HCl puffer pH 8,0; 7 mM MgCl₂; 0,2 mM Na₂ATP; 1 egység *E. coli* inorganikus pirofoszfátáz és 12 µl nyerskivonat). A második lépésben az első reakció során felszabadult szerves foszfát (P_i) mennyiségét ammónium-molibdenátot tartalmazó komplexképző segítségével spektrofotometriásan határoztuk meg (Cooper, 1977). A szerves foszfát mennyiségének ismeretében specifikus enzimaktivitást számoltunk ($\mu\text{M P}_i \times \text{mg fehérje}^{-1} \times \text{óra}^{-1}$).

3.5.2. Az alkalikus foszfátáz enzim aktivitásának mérése

Az alkalikus foszfátáz enzim aktivitását Ihlenfeldt és Gibson (1975) módszere szerint *in situ* mértük. A tenyészetekből Eppendorf

csövekbe 100 µl-t mértünk és 500 µl 0,4 M Tris-HCl (pH 9,0) oldatot adtunk hozzá. Ezt követően 500 µl 8 mM pNPP-t (para-nitro-fenil-foszfát) adtunk a rendszerhez és 10 percig inkubáltuk. Az inkubálást 25°C-on, sötétben végeztük. Az enzimreakció a pNPP hozzáadásával kezdődött, a reakciót 500 µl „stop oldat” reakcióelegyhez pipettázásával állítottuk le, amely oldat 0,2 M Na₂HPO₄-ot tartalmazott 1 M NaOH-ban oldva. A reakcióelegyet fél percig 1000×g-vel centrifugáltuk (Fisher Model 59A) és a pNPP-ből átalakított pNP mennyiségét 400 nm-en, a felülúszóból spektrofotometriásan határoztuk meg a sejteket nem tartalmazó eleggyel szemben. A fényabszorpció alapján optikai denzitás különbséget, majd a fehérjetartalom ismeretében specifikus enzimaktivitást számoltunk (átalakított mM pNPP × mg fehérje⁻¹ × óra⁻¹, ε = 1,83 × 10⁴).

3.5.3. A nitrogenáz enzimkomplex kimutatása a nitrogénéhezés (molekuláris nitrogén kötés) körülményei között

A nitrogenáz enzimkomplex kimutatásához minden nap 2 ml mintát gyűjtöttünk a kötött nitrogént nem tartalmazó tenyészetekből. Első lépésben a fehérjék szétválasztása történt meg gélelektroforézis segítségével (Laemmli, 1970). A futtatás SDS tartalmú (denaturáló), 7,5 %-os akrilamid gélen, 25 mA áramerősség mellett, Mighty minigél rendszerben zajlott 1,5 órás futtatási idővel.

A szétválasztott fehérjék transzferálásához a a Gershoni és munkatársai (1985) által kidolgozott blottolási eljárást alkalmaztuk néhány módosítással. Az elektroblot során a gélen szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Schleicher Schuell Protron BA85 cellulóz nitrát, 0,45 µm) vittük át. Az eljárás alatt a gél és a membrán is 190 mM glicint és 20% metanolt tartalmazó 25 mM-os Tris-HCl pufferbe merül, pH = 8,3 (tank blotting). A gélen szétválasztott fehérjék membránra transzferálása 3 órán át, 300 mA áramerősséggel, Hoefér típusú blottoló készülékben zajlott.

A nitrogenáz enzimkomplex specifikus kimutatásához a Towbin és Gordon (1984), Govezensky és munkatársai (1991), illetve a Jeong

és Jouanneau (2000) által leírt immunológiai módszereket dolgoztuk át a munkánk támasztotta követelményeknek megfelelően. A blotolási eljárást a nitrocellulóz membrán specifikus kötőhelyeinek telítése követte (blokkolás). A blokkoló oldat 2% BSA és 0,1 Tween 20 tartalmú egyszeres PBS, az inkubálási idő 1 óra. A nem specifikus kötőhelyek telítése után az elsődleges ellenanyaggal (AgriSera anti-nitrogenáz (NifH) való kezelés következett. Az ellenanyagot háromezerszeres hígításban alkalmaztuk (a hígítást a blokkolóoldattal végeztük), a membránt 7 órán át inkubáltuk. A másodlagos ellenanyaggal való jelöléshez a Sigma által gyártott alkalikus foszfáttal kapcsolt másodlagos ellenanyagot (anti-chicken IGG alkaline phosphatase conjugate) használtuk.

A nitrogenáz enzimfehérje (antigén) és az ellenanyagok között kialakított komplex kimutatására (előhívás) a Sigma szubsztrát oldatát használtuk (BCIP-NBT; 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát – nitro-blue-tetrazoliumklorid). A szubsztrátoldatot 0,05 mM MgCl₂ tartalmú 0,1 M-os Tris-HCl pufferben (pH 9,5) vettük fel. A szubsztrát oldattal való reakció eredményeként színes (ibolyásvörös) folt jelent meg a nitrocellulóz membránon ott, ahol az ellenanyagok az antigénhez kötődtek.

3.6. A toxintartalom meghatározása

A sejtek tényleges cilindrospermopszin tartalmát a kapilláris elektroforézis módszerével határoztuk meg (Vasas *et al.*, 2002). A meghatározáshoz minden nap 3 ml mintát vettünk a tenyészetekből, a mintákat a 3.2.2. pontban leírtaknak megfelelően készítettük elő. A heterocisztákat a 3.4. pontban leírtak szerint izoláltuk, illetve tártuk fel. A feldolgozást a minták liofilizálása és a száraz tömeg mérése előzte meg.

Az elektroforetikus módszerek közül a cilindrospermopszin molekula fizikai-kémiai sajátosságai miatt a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiás (MEKC) módszert választottuk a meghatározáshoz. A legfontosabb paraméterek optimalizálásával a kidolgozott eljárás alkalmas a cilindrospermopszin elválasztására és

kvantitatív meghatározására. Az alábbi mérési paramétereket alkalmaztuk:

kapilláris:	kvarc (non-coated), L_{eff} : 60 cm, id: 50 μm
injektálás:	hidrodinamikus, anódos végen, 50 mbar 2 s
feszültség:	25 kV, normál polaritás (anód végű injektálás, katód végű detektálás),
hőmérséklet:	25°C, termosztált
detektálás:	diódasoros spektrofotometriás, 280 nm
pufferelektrolit:	25 mM borát, 40 mM SDS, pH: 9.1
prekondicionálás:	5 perc mosás a pufferelektrolittal
poszt kondicionálás:	10 perc mosás 0,5 M NaOH-dal

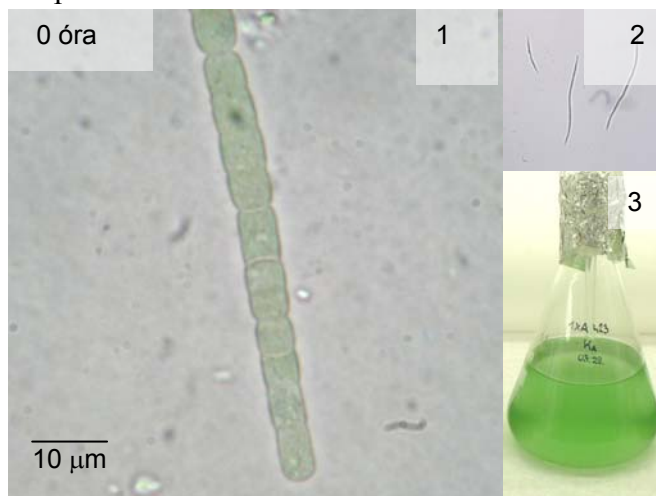
A pufferelektrolittal beállított lúgos közegben a 280 nm-en való detektálást találtuk a leghatékosabbnak. A hidroxidos poszt kondicionálásra a kapilláris belső felületének biológiai mátrix utáni minél tökéletesebb regenerálása, mosása miatt volt szükség.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. Az *A. ovalisporum* fénymikroszkóppal megfigyelhető morfológiai változásai

Az *Aphanizomenon* nemzetségre jellemző, hogy a fonalak közel egyenesek, nem helikálisak, nem képeznek hurkokat, mint az az *Anabaena*, *Anabaenopsis* vagy a *Cylindrospermopsis* nemzetségekben megfigyelhető (Whitton, 2002). A fonalak a végükön elvékonyodnak, a fonalak végén a sejtek megnyúltabbak – sokáig ez volt a legfontosabb megkülönböztető bélyeg az *Aphanizomenon* és az *Anabaena* nemzetségek között, ez utóbbi genuszra ugyanis mindez nem jellemző (Komárek, 1958). Az *Aphanizomenon* nemzetség megkülönböztető bélyegeit Hindák (2000) foglalta össze a fonalmorfológián túl sok más kritériumot használva. Az *Aphanizomenon* fajok elkülönítése nem egyszerű feladat, az akinéták morfológiája kulcsfontosságú a fajok elkülönítésében.

Az általunk vizsgált *Aphanizomenon ovalisporum* ILC-164 törzs a nemzetségre általánosan jellemző morfológiai sajátosságokkal írható le. Az átoltást követően a fiatal fonalak csaknem „gyöngyfüzér”-szerűek, a sejtek belső tere homogénnek látszik. A fonalak hossza az átoltást követően 80-100 sejt az általunk alkalmazott buborékoltatott tenyészetekben. Az átoltást követően, a „0” időpontban megfigyelhető állapot a 9. ábrán látható.

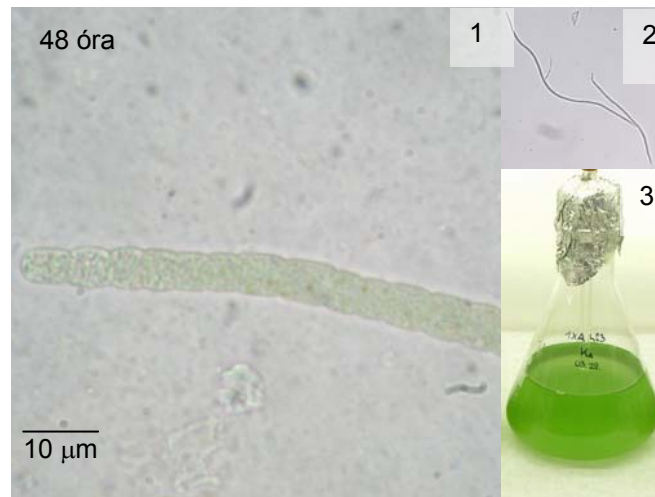


9. ábra. Az *A. ovalisporum* fonalak morfológiája a kísérletek indításakor (0 időpontban). Az 1 jelű képen a sejtek állapota látható, a 2 jelű kép a fonalak hosszát, a 3 jelű kép a tenyészet állapotát mutatja be.

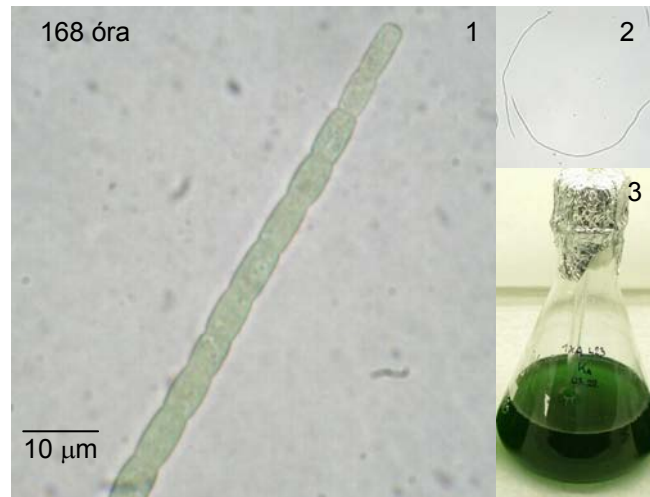
4.1.1. Morfológiai változások kontroll körülmények között

Kontroll körülmények között a sejtek a nemzettségre jellemzőbben nyújtottakká váltak (10. ábra), a fonalak hossza az általunk alkalmazott buborékoltatott tenyészetekben átlagosan 150-200 sejt, de nemritkán a 300 sejtjes hosszúságot is elérték. A kontroll tenyészetben a tenyésztés végére sem következett be jelentős morfológiai változás. A tenyésztés második felében az *Aphanizomenon* nemzettségre általánosan jellemző fonalmorfológiát figyelhettünk meg: a fonalak a végükön jellegzetesen elvékonyodnak, a sejtek hosszúkásak, a nyolcadik naptól kezdődően granulomok jelennek meg a sejtekben, ez 332 óra után (a 14. napon) a legkifejezettebb (10. ábra). A jelenség a tartalék tápanyagok felhalmozásának eredménye, amely öregedő, a növekedés ütemét változtató tenyészetekben gyakran megfigyelhető.

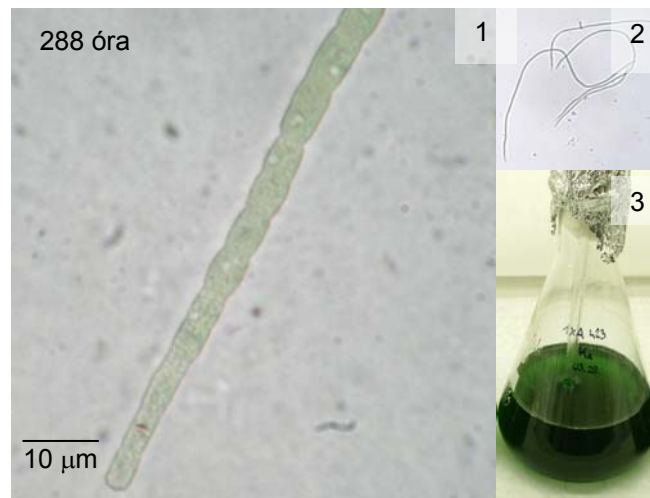
a)



b)



c)



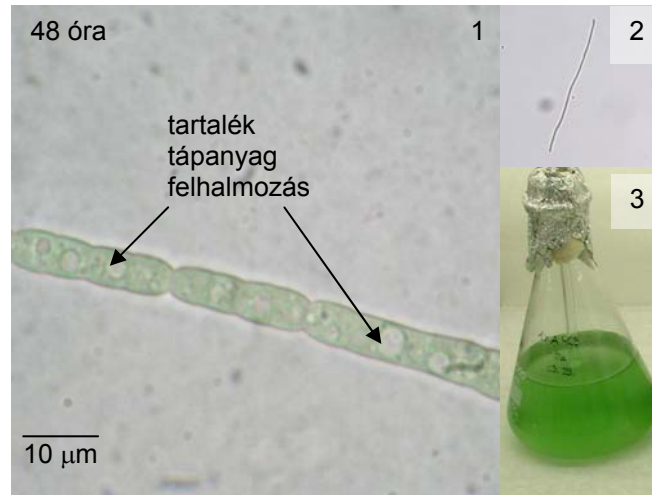
10. ábra. Morfológiai változások a tenyésztés teljes időtartama alatt kontroll körülmények között nevelt *A. ovalisporum* tenyészetben. Az 1 jelű képeken a sejtek állapota követhető nyomon, a 2 jelű képek a fonalak hosszának változását, a 3 jelű képek a tenyészet állapotát mutatják be.

4.1.2. Morfológiai változások a kénéhezés során

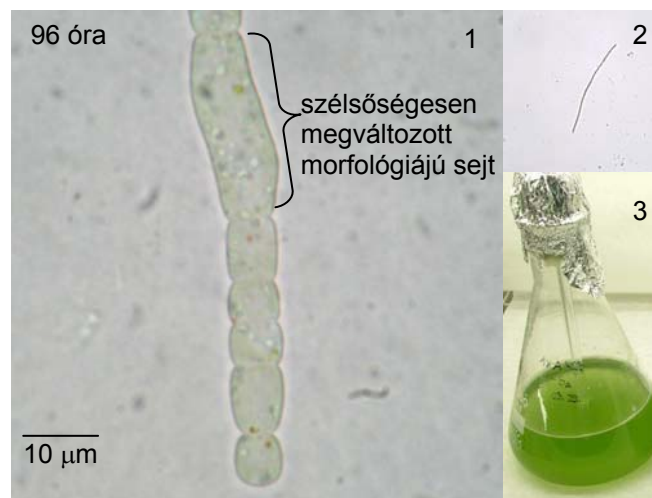
Kén hiányában már 48 óra (2 nap) elteltével jelentős változások következtek be az *A. ovalisporum* sejtek morfológiájában. Legszembetűnőbb változás, hogy a sejtek granuláltsága már 48 óra elteltével (a 2. napra) jelentős mértékben megnőtt (11. a ábra). A 96.-144. órára (4.-6. napra) a sejtek tovább fokozódó granuláltsága mellett jellegzetes, nagy méretű, amorf alakú sejtek voltak megfigyelhetők (11. b ábra). A kénéhezés során a fénymikroszkoppal megfigyelhető változások már igen korán, a tenyésztés első néhány napjában lezajlanak. A tenyésztés végére a fonalak feldarabolódása és kiülepedése volt megfigyelhető, a 150-200 sejtés fonalak néhány (3-8) megváltozott morfológiájú, torz sejtből álló fragmentre estek szét (11. c ábra). Megfigyeléseink összhangban állnak a más, unicelluláris vagy fonalas cianobaktériumokra vonatkozó irodalmi adatokkal. Kén hiányában a tenyészetek erőteljesen sárgulnak (11. c ábra), ami a fotoszintetikus apparátus dezintegrálódására utal. Az enzimérésre használt nyerskivonatok kék színének eltűnése (a megfigyelést nem mutatjuk be) a fikobiliszómák, fikobiliproteinek és a hozzájuk kapcsolódó pigmentek (fikocianin, fikoeritrin) degradációjára, lebomlására utal (Richaud *et al.*, 2001). A sejtek fokozódó granuláltsága a különböző tartalék tápanyagok (cianoficin szemcsék, glikogén, polihidroxivajsav) felhalmozásának eredménye lehet (Ortega-Calvo és Stal, 1994; Ariño *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1982; Wanner *et al.*, 1986). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az esetünkben megfigyelhető granulumok mibenlétének pontos azonosításához további vizsgálatok szükségesek, amely jelen munkánknak nem volt célja.

A kén visszaadása után, egy rövid lag periódust követően (kb. 48 óra) az éhezés során felhalmozott granulumok eltűntek, a fonalak visszanyerték a kontrollban megfigyelhető állapotukat (a megfigyeléseket nem mutatjuk be). Elmondhatjuk tehát, hogy a kénéhezés olyan általánosnak mondható morfológiai változásokat indukál (fotoszintetikus apparátus degradációja, tartalék tápanyag felhalmozás), amelyek mind az unicelluláris, mind a fonalas cianobaktérium fajok esetében megfigyelhetők.

a)



b)





11. ábra. Morfológiai változások a tenyésztés teljes ideje alatt szulfátmentes médiumban nevelt *A. ovalisporum* tenyészetben. Az 1 jelű képeken a sejtek állapota követhető nyomon, a 2 jelű képek a fonalak hosszának változását, a 3 jelű képek a tenyészet állapotát mutatják be.

4.1.3. Morfológiai változások a foszforéhezés során

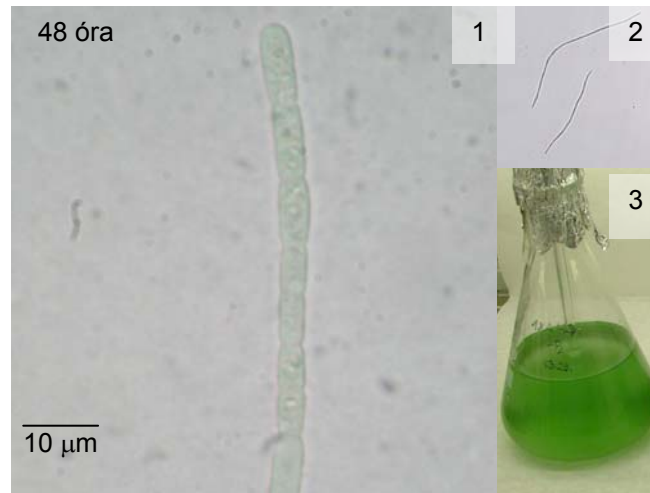
A foszforéhezés során a vegetatív sejtek jelentős része kismértékű, változáson ment át. Foszfor hiányában a sejtek megnyúltabbak, a fonalak vékonyabbak, mint a kontroll esetében (12. a ábra), a tenyésztés végére a sejtek belső struktúrája „eltűnt”, a vegetatív sejtek homogénné váltak (12. c ábra). Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a foszfátéheztetett sejtekben a polifoszfát granulumok lebomlanak. Ez a jelenség az irodalomból is ismert változás (Jensen és Sicko, 1974).

A heterocisztás Nostocales rend képviselőinek általános tulajdonsága az akinéta képzés. Az akinéta spóraanalóg, kiszáradás-rezisztens képlet, gazdag glikogénkészlettel és nitrogénraktárral. Az akinéta képzés lehetővé teszi a faj légkörben való terjedését is. Az akinéták valamely környezeti tényező kedvezőtlené válása esetén jelennek meg. Differenciálódásukról még hiányosak az ismereteink, az eddigi megfigyelések szerint kitüntetett szerepe van a hőmérsékletnek

(különösen a hőmérséklet ingadozásának – Moore *et al.*, 2005), és a tápanyag-ellátottságnak. A legtöbb esetben a nitrogén illetve a foszfor hiánya volt az, amely elindította a vegetatív sejtek akinétává alakulását. Moore és munkatársai (2003) a *Cylindrospermopsis raciborskii*, Sarma és munkatársai az *Anabaena torulosa* (Sarma és Khattar, 1992; Sarma *et al.*, 2004), Olli és munkatársai (2005) az *Anabaena lemmermannii* esetében figyelték meg, hogy a foszfor, illetve a nitrogén hiánya akinéta differenciálódáshoz vezethetnek. Az általunk vizsgált *A. ovalisporum* törzs foszforéheztetett tenyészetében is megjelentek akinéták (12 c ábra), azonban csak igen kis számban és nem minden esetben. Az akinéták megjelenése a fonalakon az *A. ovalisporum* ILC-164 törzsnél a foszforéhezés során inkább véletlenszerű, mint jellemző jelenségnek tekinthető az általunk beállított tenyésztési körülmények között.

A foszfor visszaadását követően a fonalak gyorsan (24-48 óra alatt) visszanyerték a kontroll tenyészetre jellemző morfológiai állapotot (a megfigyelést nem mutatjuk be).

a)





12. ábra. Morfológiai változások a tenyésztés teljes időtartama alatt foszfátmentes médiumban nevelt *A. ovalisporum* tenyészetben. Az 1 jelű képeken a sejtek állapota követhető nyomon, a 2 jelű képek a fonalak hosszának változását, a 3 jelű képek a tenyészet állapotát mutatják be.

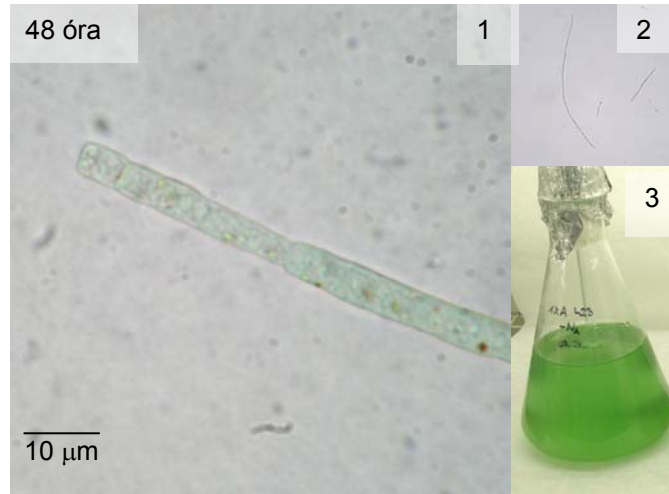
4.1.4. Morfológiai változások kötött nitrogén hiányában

Kötött nitrogén hiányában a Nostocales rendre jellemző morfológiai átalakuláson megy át a vegetatív sejtek egy része: a légköri nitrogén megkötésére képes heterociszták jönnek létre. A nitrátéheztetett tenyészet 72 óra után (a 3. napra) sárgásbarna színűvé vált, ami kb. a 120. óráig (az 5. napig) megmaradt. Ez az átmeneti nitrogénhiány kialakulása miatt bekövetkező, elsősorban fikocianin degradáció következménye. A proheterociszták a harmadik napon jelentek meg a fonalakon (13. b ábra). A proheterociszta fala még nem vastagabb a vegetatív sejténél, és nem láthatók a jellegzetes poláris testek sem. 120-144 óra elteltével (az 5.-6. napra) jönnek létre a poláris testek, azaz megtörténik a heterociszta vegetatív sejtektől való izolációja (13. c ábra). A nitrogenáz enzim működésének beindulása után stabilizálódik a tenyészet növekedése, 336 óra után (a 14. napra) a vegetatív sejtekben tartaléktápanyag-felhalmozás is megfigyelhető. A nitrogén hiánya a heterociszták kialakulása előtt sincs jelentős hatással a fonalak hosszára, bár a nitrátéheztetett tenyészetben a fonalak rövidebbek, mint a kontrollban. Hosszuk 100-150 sejt, melyeken 240 óra elteltével (a 10. napra) 8-10 heterociszta is lehet.

Megfigyeléseink összhangban állnak az irodalomban más fajokkal kapcsolatban leírtakkal. A heterociszták többé-kevésbé szabályos térközökkel jelennek meg a fonalon. A korábbi vizsgálatok (Wilcox *et al.*, 1973) és saját megfigyeléseink is azt mutatják, hogy meghatározott, minimális számú szomszéd sejtre van szükség ahhoz, hogy a differenciálódás beinduljon, ugyanis a nagyon rövid fonalakon nem képződik heterociszta (az adatokat nem mutatjuk be).

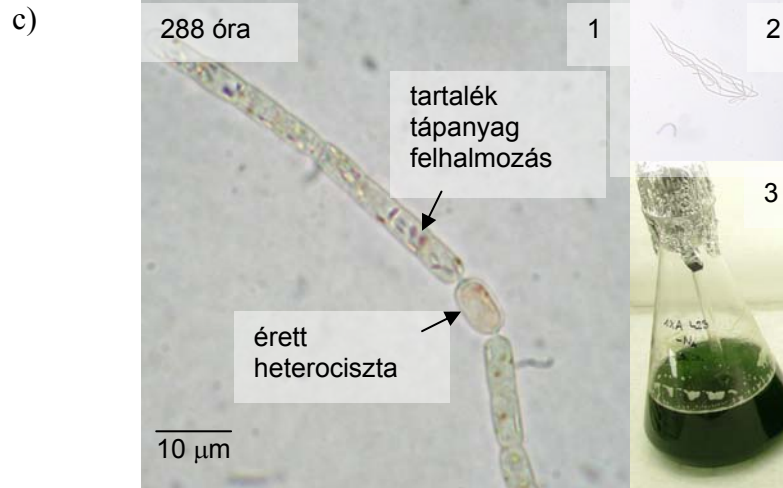
A nitrát visszaadása nem jelent drámai változást a sejtek morfológiájában. Az érett heterociszták lassan iktatódnak ki az anyagcseréből, a heterociszták száma csak lassan csökken a tenyészetben (a fonalról való letörés után kiülednek), bár azt mondhatjuk, hogy a nitrát 168. órában (7. napon) való visszaadását követően új heterociszták differenciálódása valószínűleg már nem indul meg.

a)



b)





13. ábra. Morfológiai változások a tenyésztés teljes időtartama alatt nitrátmentes médiumban nevelt *A. ovalisporum* tenyészetben. Az 1 jelű képeken a sejtek állapota követhető nyomon, a 2 jelű képek a fonalak hosszának változását, a 3 jelű képek a tenyészet állapotát mutatják be.

4.2. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedésének nyomon követése

Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedésének nyomon követésére alkalmas módszer a klorofill-a-, a fehérje- és a száraz tömeg vizsgálata, illetve a sejtszám meghatározása. A vizsgálatok során a különböző tápelemelés (szulfát, foszfát, nitrát) valamint az éhezéskből az adott tápelem visszaadását követően regenerálódó tenyészetek növekedését vizsgáltuk.

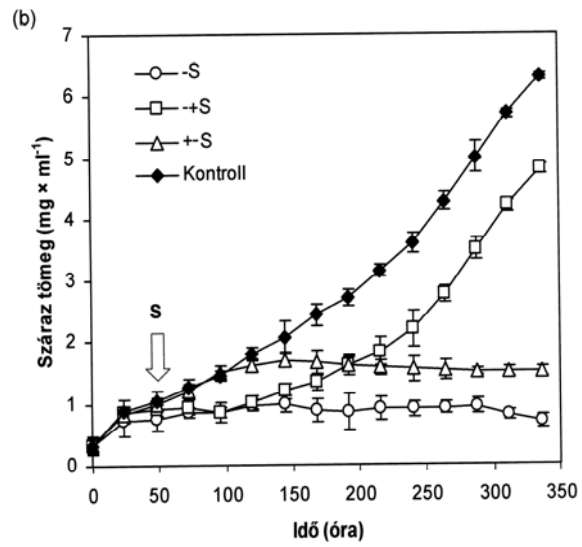
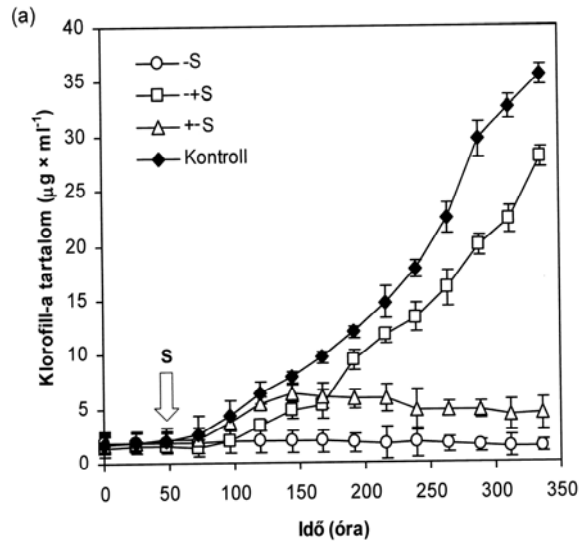
4.2.1. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése a kénéhezés körülményei között

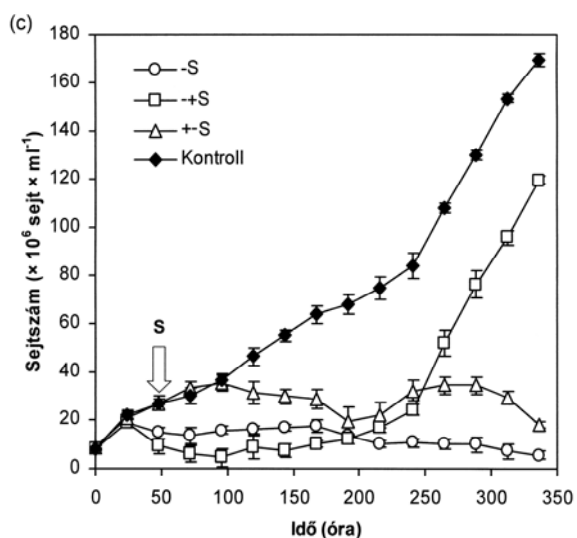
A szulfátéheztetett *A. ovalisporum* tenyészet növekedése rögtön megállt, függetlenül attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-S), vagy

a 48. órában kezdődött (+S, 14. a, c ábra). A tápelem (S) éheztesítés során a klorofill-tartalom csökkenése általánosan megfigyelt jelenség a cianobaktériumok körében. A tilakoidok dezorganizálódásának oka, hogy a szervezet a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc kéntartalmú elemeiből próbálja fedezni a fehérjeszintézis kénhiányát (Ariño *et al.*, 1995). A száraz tömeg a 144. óráig (a 6. napig) nem jelentős, de egyértelmű növekedést mutatott a kénéheztesített tenyészetben (a kiindulási érték háromszorosára nőtt 6 nap alatt; 14. b; üres körök), szemben a klorofill-a tartalommal illetve a sejtszámmal. Ennek oka az a cianobaktériumoknál megfigyelhető jelenség, hogy a kénéhezés során a sejttér fogat nagy részét glikogén és polihidroxivajsav granulumok (Schmidt *et al.*, 1982; Wanner *et al.*, 1986), illetve polifoszfát testek (Lawry és Jensen 1979) töltik ki. A kénéhezés cianoficin akkumulációt is indukál a fonalas fajok esetében (Allen *et al.*, 1980; Lawry és Simon, 1980). A sejtszám és a száraz tömeg vizsgálatok eredményei, valamint mikroszkópos megfigyeléseink alapján azt mondhatjuk, hogy ezek a jelenségek az általunk vizsgált törzs esetében is megfigyelhetők. A sejtszám és a száraz tömeg változása a kontroll, illetve a kénéheztesített tenyészetekben a 15. ábrán látható.

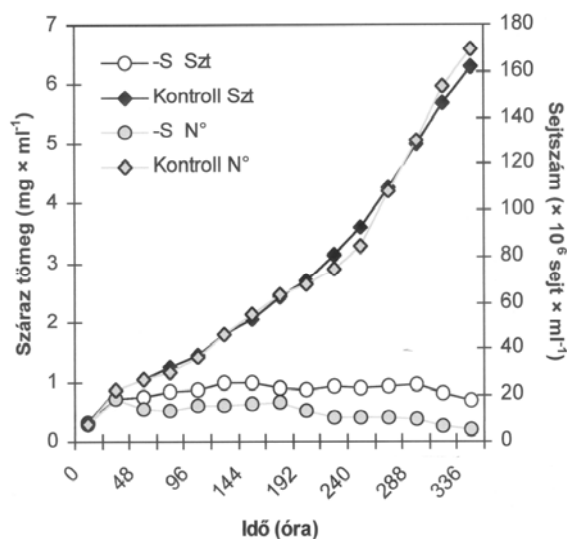
A 48 órán át éheztesített tenyészetben a szulfát 48. órában való visszaadását követően a 96.-120. órától (a 4.-5. naptól, azaz 48-50 órás lag periódus után) jelentős növekedés indult meg mindhárom vizsgált növekedési paraméter tekintetében (14. a-c ábra, üres négyzetek). Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a 48 óránál hosszabb ideig kénéheztesített tenyészetben a szulfát visszaadása már nem eredményezi a tenyészet regenerálódását (az adatokat nem mutatjuk be). Ebből arra következtethetünk, hogy a cianobaktériumoknál általánosan megfigyelhető módon, az általunk vizsgált *Aphanizomenon ovalisporum* törzs sem rendelkezik olyan kéntartalékokkal, amelyek a sejtek osztódását – a tenyészet növekedését – hosszabb időn keresztül (néhány napon túl) lehetővé tennék.

A 48. óra elteltével a szulfátmentes médiumba átvitt tenyészet növekedése leállt, ahogyan azt a tenyésztés kezdetétől kénéheztesített tenyészet esetében megfigyelhettük (14. a-c ábra, üres háromszögek).





14. ábra. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése a kénéhezés során. A tenyészetek növekedését a) a klorofill-a tartalom, b) a száraz tömeg és c) a sejtszám meghatározásával követték nyomon. A nyíl a szulfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet szulfátmentes médiumba való áttöltésének időpontját jelöli.

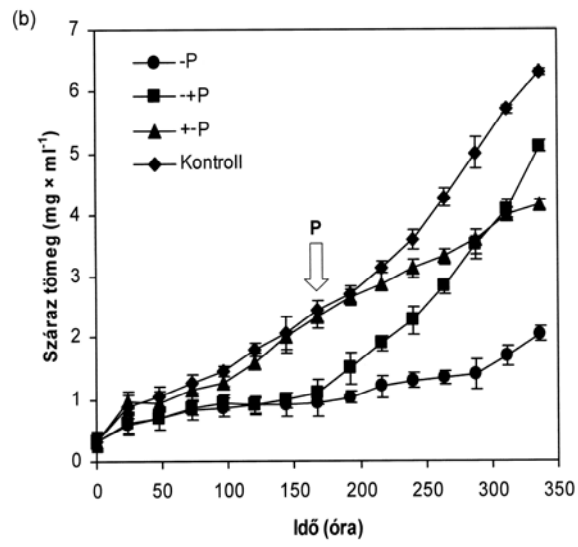
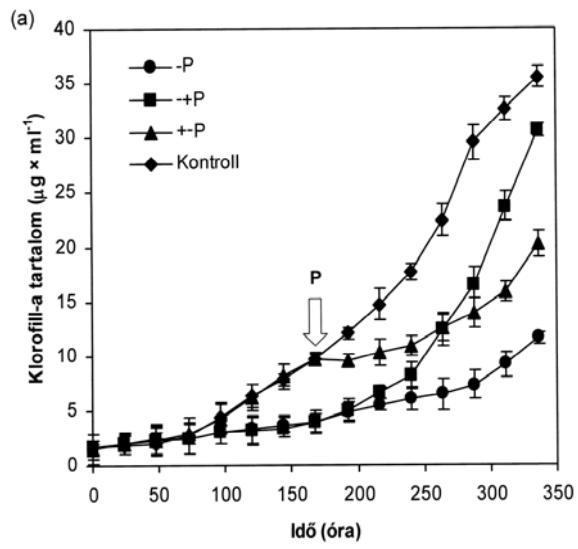


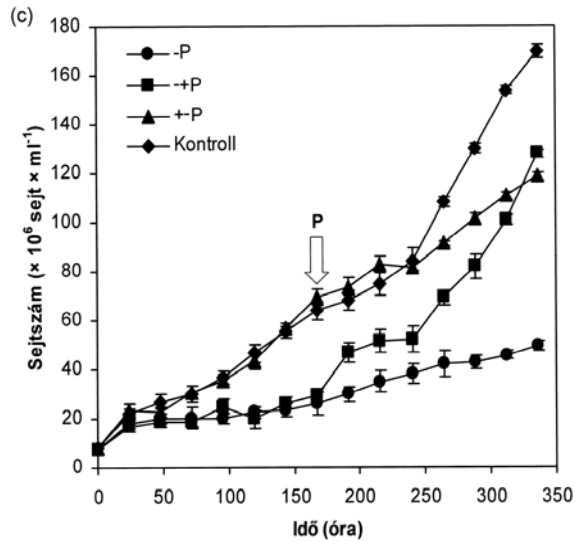
15. ábra. A száraz tömeg (Sz) és a sejtszám (N°) összevetése a kontroll (Kontroll, -♦-, -◆-) és a szulfátéheztetett (-S, -○-, -●-) tenyészetekben.

4.2.2. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése a foszforéhezés körülményei között

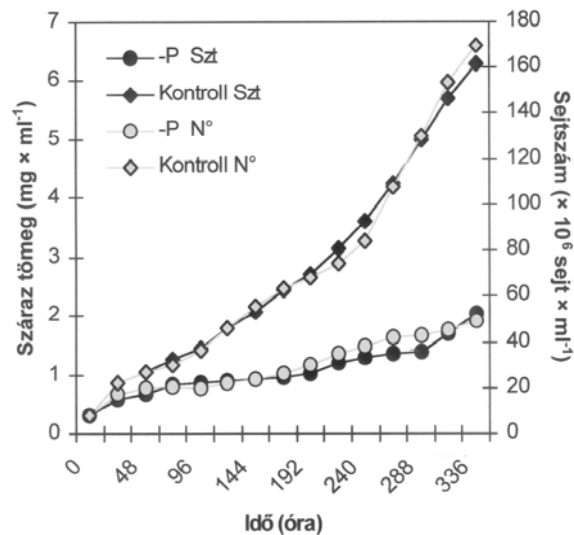
A foszfátéheztetett tenyészet (-P) növekedése lelassult, azonban a tenyészet több mint hatszoros növekedést ért el 336 óra (14 nap) alatt a kiindulási állapothoz képest (16. a-c ábra, fekete körök). Ez – figyelembe véve a P_i teljes hiányát a médiumban – arra enged következtetni, hogy a sejtek jelentős foszforraktárral rendelkeznek, amely lehetővé teszi a sejtek osztódását, a tenyészet jelentősebb növekedését. Foszforéhezés során a sejtszám és a száraz tömeg változása nem mutat olyan különbséget, mint az a kénéhezés során megfigyelhető volt (17. ábra). A foszforéhezés körülményei között a sejtekből eltűnő polifoszfát testek miatt nem változik jelentősen a száraz tömeg, megváltozik viszont a sejtek ultrastruktúrája, amit a mikroszkópos képek is alátámasztanak. Ez a fonalas cianobaktériumok körében ismert jelenség (Jensen és Sicko, 1974) az általunk vizsgált törzs esetében is megfigyelhető.

A foszfátot a 168. órában visszacapott (-+P) tenyészetben a klorofill-a tartalom, a száraz tömeg és a sejtszám tekintetében is szinte „azonnal” (már a 192. óra után – a 8. naptól) jelentős növekedés indult meg, amely elsősorban a sejtszámban, de a klorofill-a tartalomban és a száraz tömegben is megmutatkozott (16. a-c ábra, fekete négyzetek). A növekedési vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a sejtek rövid időn belül rendkívül nagy mennyiségű foszfátot képesek felvenni és azt az anyagcserében hasznosítani. Kísérleteink szerint a 192 órás (8 napos), sőt a 216 órás (9 napos) foszforéheztetett tenyészetek is képesek a foszfát visszaadását követően regenerálódni (az adatokat nem mutatjuk be). A +-P tenyészet növekedése a 168. órában foszfátmentes médiumba való átváltást követően a foszforéheztetett (-P) tenyészetben tapasztalható módon változott meg, mind a klorofill-a tartalom, mind a sejtszám, mind pedig a száraz tömeg alapján (16. a-c ábra, fekete háromszögek). A foszfátéhezés az előbbi körülmények között növekedésgátlást eredményezett.





16. ábra. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése a foszforéhezés során. A tenyészetek növekedését a) a klorofill tartalom, b) a száraz tömeg és c) a sejtszám meghatározásával követték nyomon. A nyíl a foszfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet foszfátmentes médiumba való átoltásának időpontját jelöli.

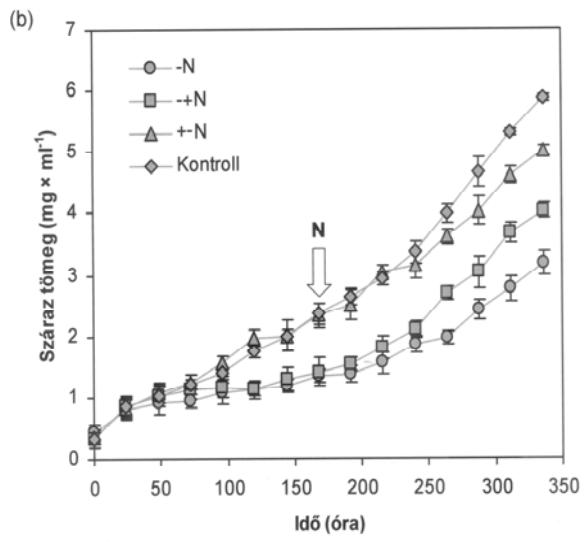
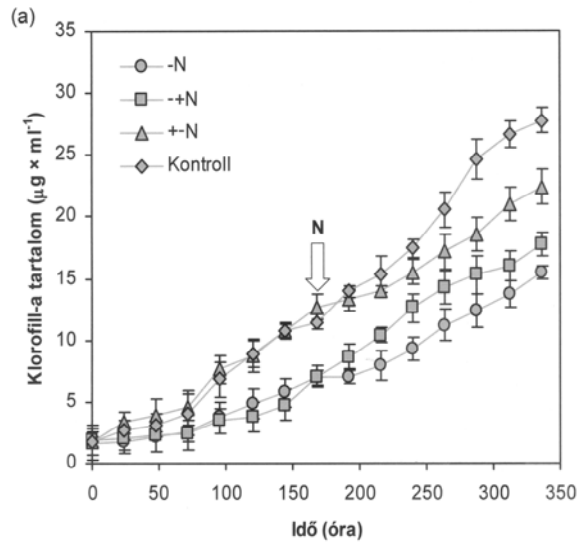


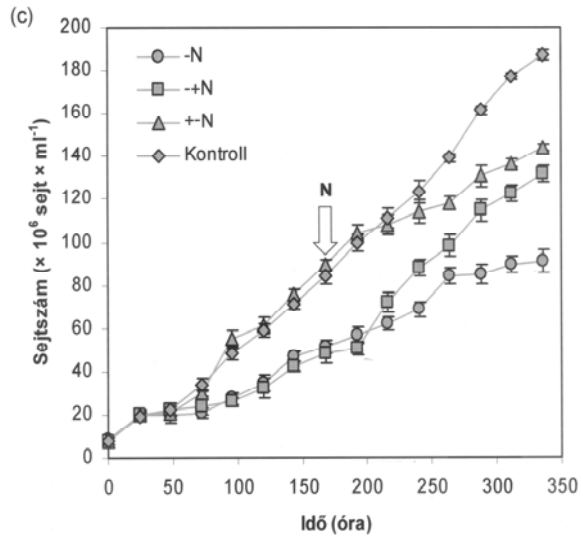
17. ábra. A száraz tömeg (Sz) és a sejtszám (N°) összevetése a kontroll (Kontroll, -♦-, -♦-) és a foszfátéheztetett (-P, -•-, -•-) tenyészetekben.

4.2.3. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése kötött nitrogén hiányában

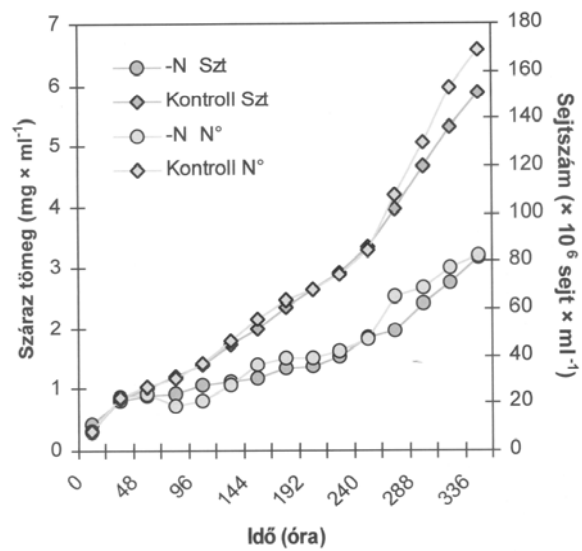
A kötött nitrogén éhezettett tenyészetek növekedését a 18. ábra mutatja be. A nitrogénéhezés speciális esetet képvisel, mivel az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium képes a légköri nitrogén megkötésére. Ennek ellenére a nitrátmentes médiumba átoltott tenyészet 96-120 órán belül (4-5 nap alatt) elpusztult (az adatokat nem mutatjuk be). Ahhoz, hogy a heterociszták kialakuljanak és meginduljon a légköri nitrogén megkötése, biztosítani kellett, hogy a médium kötött nitrogéntartalma „fokozatosan”, és ne „egyszerre” fogyjon el. Ezért a nitrogénéhezéshez olyan Allen médiumot alkalmaztunk, amely 0,18 mM nitrogént tartalmazott NH_4NO_3 formájában (ez a teljes tápoldat kötött nitrogéntartalmának 2%-a). Ilyen körülmények között a -N tenyészet az első 96 órában (4 napban) lassan, majd a heterociszták kialakulását- és működésbe lépését követően egyre fokozottabban, de a kontroll tenyészetnél mindig alacsonyabb rátával növekedett mindhárom növekedési paraméter alapján (18. a-c ábra, szürke körök). A kötött nitrogén éhezés hasonló módon játszódik le a 168. órában nitrátmentes médiumba átoltott (+N) tenyészet esetében is (18. a-c ábra, szürke háromszögek). Megállapítható, hogy a tenyészet 4-5 napra elegendő nitrogén raktárral rendelkezik, amely nem elegendő a heterociszták differenciálódásához. Ehhez a táptalajban minimális mennyiségű kötött nitrogénre van szükség, amelynek elfogyása során jönnek létre, és lépnek működésbe a heterociszták és teszik lehetővé a tenyészet további növekedését. A száraz tömeg és a sejtszám összefüggését vizsgálva megállapítható, hogy a sejtek tömege és száma közel azonos mértékben változik a tenyésztés során (19. ábra).

A 168. órában a nitrátot visszakapott (-+N) tenyészetben a növekedés csak jelentős lag periódus után indult meg fokozottabban (18. a-c ábra, szürke négyzetek). Nem figyeltük meg a foszfát visszaadásánál látottakhoz hasonlóan a tenyészetek gyors regenerálódását, gyors növekedést. Ennek valószínű oka az, hogy a sejtek többek között a fikobiliproteinek szintézisére, regenerációjára fordítják a felvett kötött nitrogént.





18. ábra. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése kötött nitrogén hiányában. A tenyészetek növekedését a) a klorofill tartalom, b) a száraz tömeg, és c) a sejtszám meghatározásával követtük nyomon. A nyíl a nitrát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet nitrátmentes médiumba való áttöltésének időpontját jelöli.



19. ábra. A száraz tömeg (Sz) és a sejtszám (N°) összevetése a kontroll (Kontroll, -♦-, -♦-) és a nitrátéheztetett (-N-, -•-, -•-) tenyészetekben.

4.2.4. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedésének összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között

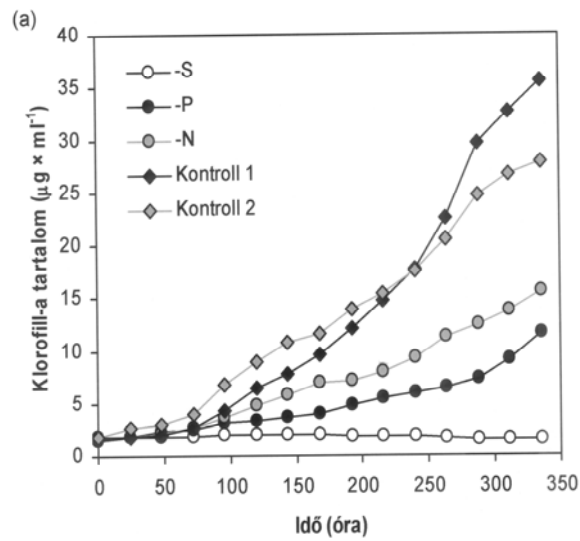
A kontroll, azaz szulfátot, foszfátot illetve nitrátot optimális mennyiségben tartalmazó tenyészethez képest mind a kénéheztetett, mind a foszforéheztetett, mind pedig a kötött nitrogénre éheztetett tenyészetben a növekedés gátlása figyelhető meg. Ahogy azonban az a 20. ábrán látható, mindhárom növekedési paraméter esetén különböző mértékű a gátlás a különböző éhezési körülmények között. Legnagyobb mértékű a növekedés gátlása a kénéheztetett tenyészetben (20. ábra, üres körök). A foszforéheztetett tenyészetek növekedése ennél jóval jelentősebb, mindhárom növekedési paraméter alapján 6-8-szoros növekedés tapasztalható 336 óra után (a 14. napra), a kiindulási állapothoz képest. Megállapítható, hogy a foszforéheztetett tenyészet növekedése nem áll le, mint az a kénéhezés során tapasztalható, hanem 336 órán keresztül (a 14. napig) fennmarad (20. ábra fekete körök).

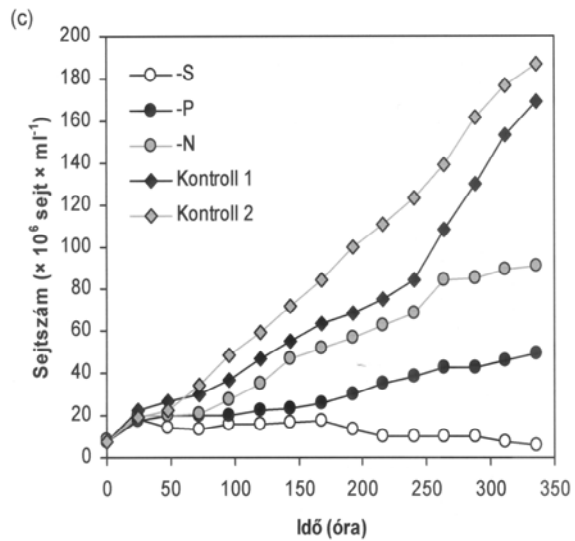
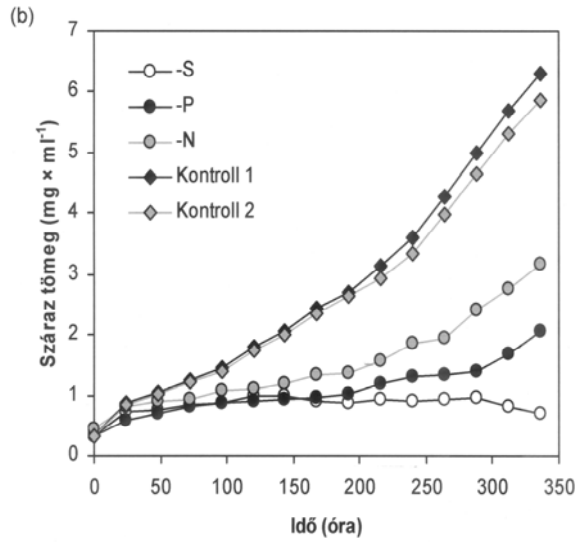
A jelenség magyarázatára a következőket mondhatjuk: szulfát hiányában a tenyészet 72-96 óra (3-4 nap) alatt olyan mértékű károsodást szenved, hogy ekkor már a szulfát visszaadása után sem képes regenerálódni. A más cianobaktériumoknál is megfigyelt változások (Ortega-Calvo és Stal, 1994; Ariño *et al.*, 1995) zajlanak le: a fikobiliprotein-tartalom drasztikusan csökken, a sejttér fogat nagy részét granulumok töltik ki. 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 polifoszfat 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 (Allen és Smith, 1969; Cohen-Bazire és Bryant, 1982; Boussiba és Richmond, 1980). Megfigyeléseink részben összhangban állnak az irodalmi

adatokkal: kötött nitrogén hiányában a tenyészetek sárgulásának oka a fikobiliproteinek lebomlása. Ahhoz azonban, hogy a kötött nitrogén teljes hiányában a tenyészet életben maradjon, a heterociszták kialakuljanak, az így nyerhető nitrogénmennyiség nem elegendő, mivel kötött nitrogént nem tartalmazó tápoldatban a tenyészet 120 órán (5 napon) belül elpusztult (az adatokat nem mutatjuk be). Feltételezhetjük azt is, hogy a fikobiliproteinek lebomlása olyan mértékben befolyásolja a fotoszintetikus apparátust, hogy az a sejtek pusztulásához vezet. Ahhoz, hogy meginduljon a légköri nitrogén megkötése, biztosítani kellett egy minimális kötött nitrogéntartalmat (a teljes ásványianyag-tartalmú Allen tápoldat nitrogéntartalmának 2%-át). A heterociszták kialakulása után azonban a tenyészet teljesen nitrátmentes tápoldatban fenntartható, növekedése a kontrollnál alacsonyabb rátával stabilizálódik.





20. ábra. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedésének összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között. A szulfát- és foszfátéhezés vizsgálatára, illetve a nitrátéhezés vizsgálatára eltérő időpontokban került sor, ezért különböző a kísérletek kontrollja. Ezért jelöltük a nitrátéhezéshez tartozó kontroll tenyészet adatait szürke rombuszokkal, a szulfát- illetve foszfátéhezéshez tartozó kontroll adatoktól eltérően. Az összehasonlító ábrákon a nitrátéhezéshez tartozó kontroll tenyészet adatai Kontroll 2 néven szerepelnek.

4.3. Enzimológiai vizsgálatok

4.3.1. Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának változása

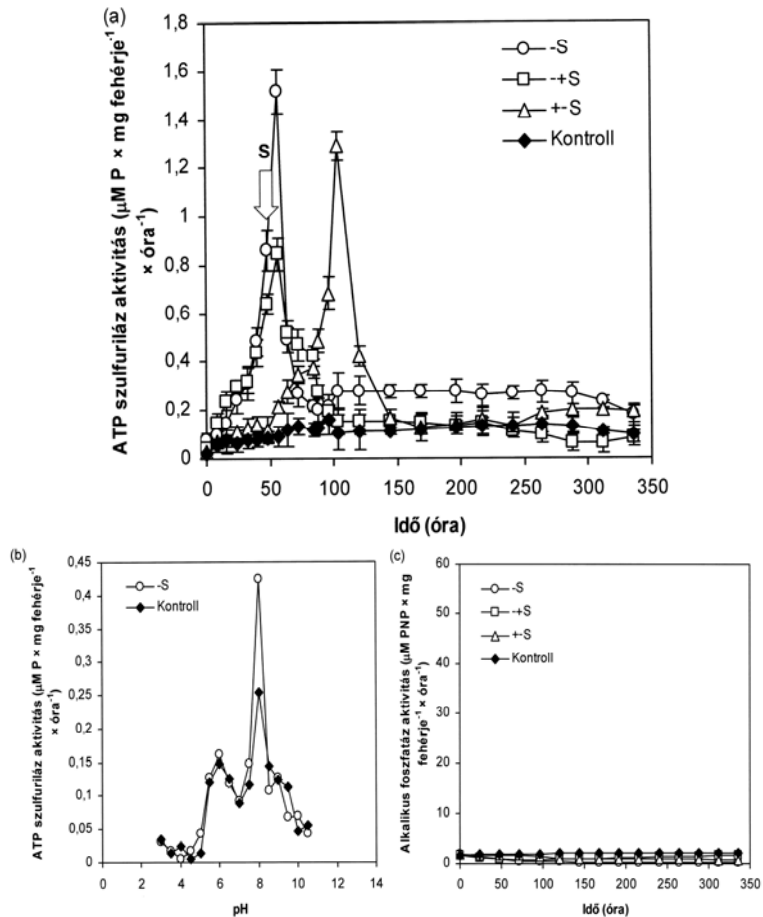
A szulfát redukciójának egyik kulcsenzime az ATP-szulfuriláz. A szulfát első lépésben ATP-hez kapcsolódik, ezt a reakciót az ATP-szulfuriláz katalizálja, a reakció eredményeként adenzin-foszfoszulfát (APS) keletkezik.

A szulfátmentes médiumban nevelt *A. ovalisporum* sejtekben a szulfátéhezés az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának növekedését indukálja. A nyerskivonatok ATP-szulfuriláz aktivitása pH 6,0-nál és pH 8,0-nál mutatott maximumot (21. b ábra). A pH 8,0 értékkel jellemezhető aktivitás körülbelül kétszerese annak, ami pH 6,0-nál mérhető. A szulfátéhezés hatására a pH 8,0-nál mérhető aktivitás emelkedett, igazolva, hogy az indukálható enzim pH-optimuma 8,0 (21. b ábra). Hangsúlyoznunk kell, hogy az enzimaktivitás vizsgálata során nem törekedtünk az enzim, illetve az általa katalizált reakció részletes enzimológiai jellemzésére; célunk „belső kontrollként” az éhezés hatására bekövetkező fiziológiai változások vizsgálata, bemutatása volt.

A tenyésztés kezdetétől szulfátéheztetett tenyészetben (-S) az ATP-szulfuriláz enzim aktivitása növekedett, az enzim maximális aktivitását (a kiindulási értékhez képest csaknem 20-szoros aktivitás-emelkedés) a tenyésztés 56. órájában érte el. Ezt követően az enzim aktivitása lecsökkent, de a tenyésztés végéig a kontrollban mérhető értéknél magasabb szinten maradt (21. a ábra, üres körök). A 48 órán át kénéheztetett tenyészetben (-+S) a szulfát 48. órában történő visszaadása után az ATP-szulfuriláz enzim aktivitása az 56. óráig emelkedett, de a -S tenyészetben mért értéket nem érte el. Az 56. óra után az enzim aktivitása folyamatosan csökkent, 50 órán belül a kontrollban mérhető szintet érte el, és a tenyésztés végéig ezen a szinten maradt (21. a ábra, üres négyzetek). Az ATP-szulfuriláz enzim indukálódása, az aktivitás emelkedése hasonló módon játszódott le a 48. órában szulfátmentes médiumba áttolt tenyészetben (+-S; 21. a ábra, üres háromszögek), mint az a tenyésztés kezdetétől kénéheztetett tenyészetben tapasztalható volt.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a szulfát hiánya az *A. ovalisporum* ATP-szulfuriláz enzimének aktivitásában jelentős (20-

szoros) növekedést indukál. A fonalas cianobaktériumok esetében kevés adat található az irodalomban az ATP-szulfuriláz enzim jellemzésére vonatkozóan (*Spirulina platensis* – Menon és Varma, 1978; *Anabaena cylindrica* – Sawney és Nicholas; 1977). A dolgozatban bemutatott, az ATP-szulfuriláz indukciójára vonatkozó adatok az első eredmények az *A. ovalisporum* esetén. Megvizsgáltuk az ATP-szulfuriláz enzim aktivitását a foszforéhezés körülményei között is, és azt tapasztaltuk, hogy a foszforéhezés nincs hatással az enzim aktivitására (21. c ábra).



21. ábra. (a) A szulfátéhezés hatása az *A. ovalisporum* tenyészetek ATP-szulfuriláz aktivitására. A nyíl a szulfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet szulfátmentes médiumba való átváltásának

időpontját jelöli. (b) Az ATP-szulfuriláz enzim pH optimuma a kontroll (-♦-), és a szulfátéheztetett (-○-) tenyészetben, (c) az ATP-szulfuriláz enzim aktivitása a foszforéhezés körülményei között.

4.3.2. Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának változása

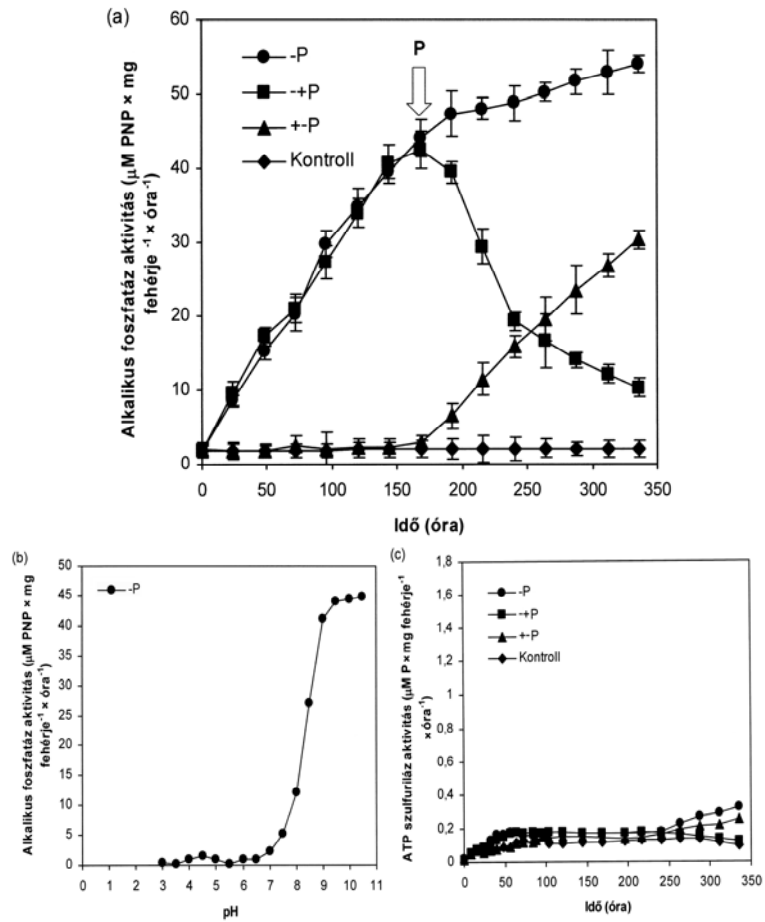
Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitását azért mértük a cianotoxin-tartalom változásával párhuzamosan, hogy a foszforéhezés során bekövetkező biokémiai változásokat is nyomon kövessük. A periplazmatikus alkalikus foszfatáz enzim expresszióját a foszforlimitált körülmények indukálják, a cianobakteriális sejtekben foszforhiányos körülmények között szintetizálódik az alkalikus foszfatáz enzim (Ihlenfeldt, és Gibson, 1975). Az enzim pH optimuma a lúgos tartományba esik, ez különbözteti meg az alacsony pH-n működő savas foszfatázoktól (22. b ábra).

A foszfátéhezés (-P) körülményei között az alkalikus foszfatáz enzim aktivitása a tenyésztés teljes ideje alatt emelkedett, a tenyésztés végére a kiindulási érték harmincszorosára nőtt (22. a ábra, fekete körök). Bizonyítottuk, hogy az enzim aktivitásának növekedése kloramfenikollal (specifikus prokarióta fehérjeszintézis inhibitor) gátolható, mindez a foszforlimitált körülmények között indukálódó, *de novo* enzimszintézisre utal (az adatokat nem mutatjuk be).

A 168 óra után foszfátmentes médiumba átváltott tenyészetben (+-P) az átváltást követő 24 óra elteltével (a tenyésztés 192. órájában, a 8. napon) már aktivitásnövekedést figyelhattunk meg, ez az emelkedés folyamatos volt egészen a 336. óráig (a 14. napig; kb. 15-szörös aktivitásnövekedés; 22. a ábra, fekete háromszögek). A 168 órán át foszforéheztetett tenyészetben (-+P) a foszfát visszaadását követően az enzimaktivitás először gyorsan (7-9 nap), majd lassuló tendenciával csökkent a tenyésztés végéig (22. a ábra, fekete négyzetek).

Eredményeink összhangban állnak az irodalmi adatokkal, melyek szerint a cianobaktériumokban az alkalikus foszfatáz rendszer indukálódik foszfát hiányában (Healey, 1982; DeMarsac és Houmard, 1993). Megvizsgáltuk a periplazmatikus alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának változását a kénéhezés körülményei között is.

Vizsgálataink során azonban megállapíthattuk, hogy a kénékezés nincs jelentős hatással az alkalikus foszfatáz enzim aktivitására (22. c ábra).



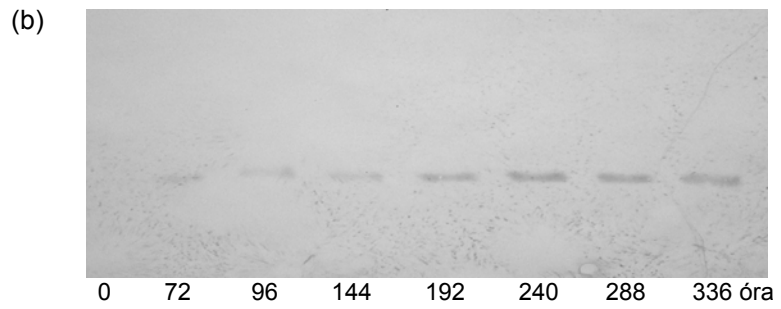
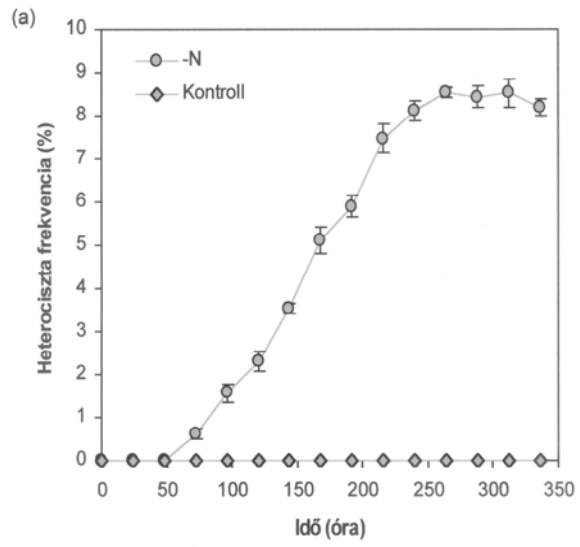
22. ábra. (a) A foszforékezés hatása az *A. ovalisporum* tenyészetek alkalikus foszfatáz aktivitására. A nyíl a foszfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet foszfátmentes médiumba való átváltásának időpontját jelöli. (b) Az alkalikus foszfatáz enzim pH optimuma a foszfátéheztetett tenyészetben, (c) az alkalikus foszfatáz enzim aktivitása a kénékezés körülményei között.

4.3.3. A nitrogénáz komplex kimutatása a nitrogénéhezés körülményei között

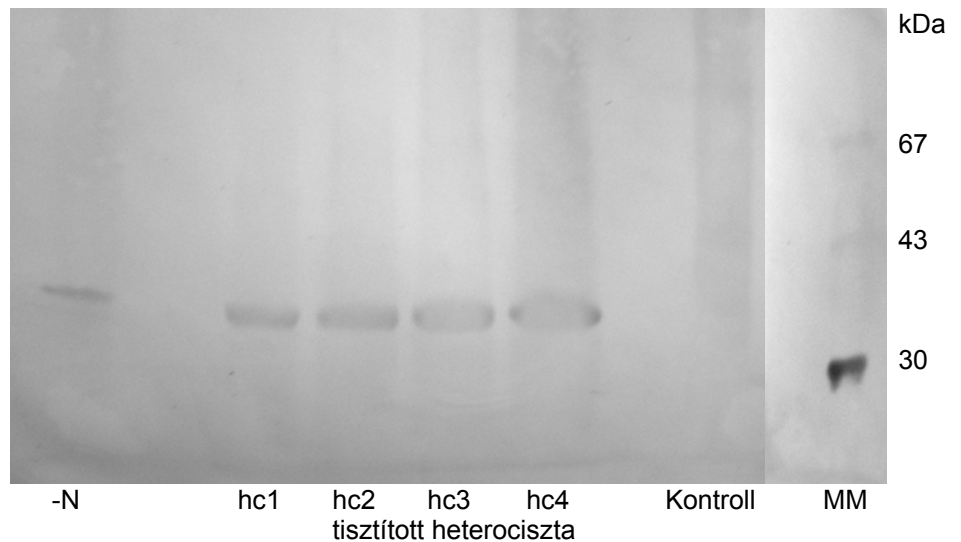
A nitrogénáz enzimkomplex kimutatását nitrátéheztetett és kontroll tenyészetekben, valamint izolált heterocisztákon végeztük el.

A heterociszták 72 óra után (a 3. napon) jelentek meg a tenyészetben (ekkor még proheterocisztákról beszélhetünk - 4.1.4. pont - azonban a heterociszta frekvencia számolásánál a proheterociszták és az érett heterociszták között nem tettünk különbséget). A heterociszták mennyisége 264 óra után (a tenyésztés 11. napjára) az összsejtszám 8,5%-át érte el, ezt követően számuk nem változott jelentősen a tenyésztés végéig (23. a ábra). A heterociszták számának növekedésével párhuzamosan nőtt a nitrogénáz mennyisége (23. b ábra, az idő előrehaladtával nőtt a nitrocellulóz membránon a nitrogénáz jelölő fehérje sávok mérete, intenzitása). A 24. ábrán látható, hogy a nitrátéheztetett tenyészetben (-N) valamint a tisztított heterocisztákban (hc1-hc4, amely minták egyre nagyobb koncentrációban tartalmaztak heterocisztákat) is sikerült az enzimkomplex jelenlétét bizonyítani. A kimutatás során a dinitrogénáz redukáz egyik alegysége, a *nifH* gén terméke válik láthatóvá, amely irodalmi adatok, és saját vizsgálataink eredményei szerint is 33 kDa molekulatömegű fehérje (24. ábra). Az ábrán az is látható, hogy a fehérje kontroll körülmények között nem képződik.

Eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy a kötött nitrogénformák csökkent mennyisége, majd hiánya a tápoldatban a vegetatív sejtek egy részének (a 11. napra 8.5%-ának) heterocisztává való differenciálódásához, a nitrogénáz enzim indukciójához vezetett az általunk vizsgált *A. ovalisporum* törzs esetében. Az irodalomban találunk példát arra vonatkozóan, hogy proheterociszták megjelennek, de aktív nitrogénáz nem mutatható ki (Elhai és Wolk, 1990; Ernst *et al.*, 1992). Elhai és Wolk igazolták, hogy a nitrogénkötés és a heterociszta differenciálódás genetikai programja elválasztható egymástól. A fenti adatok alapján egyértelműen megállapítható, hogy a vizsgált szervezet, az *A. ovalisporum* a nitrogénkötő cianobaktériumokra általánosan elfogadott módon válaszol a kötött nitrogén hiányára.



23. ábra. A heterociszta frekvencia változása (a), illetve a nitrogénáz enzimkomplex mennyiségének változása az idő függvényében (b) a nitrátékezés során.



24. ábra. A nitrogenáz enzimkomplex kimutatása nitrátéheztetett tenyészetben (-N), a tisztított heterocisztákban (hc1-hc4) és a kontroll tenyészetben. MM: molekulatömeg-marker, a számok a marker összetevőinek molekulatömegét jelölik kDa egységben.

4.4. Az intracelluláris cianotoxin-tartalom változása az *A. ovalisporum* tenyészetekben

A sejtek tényleges cianotoxintartalmát kapilláris elektroforézis (CE) műszeres analitikai módszer alkalmazásával határoztuk meg (3.6.). A sejtek toxintartalmát mg száraz tömegre, illetve sejtre vonatkoztatva, %-ban adtuk meg. 100%-nak a kiinduláskor a kontrollban mért értéket ($\mu\text{g toxin} \times \text{mg száraz tömeg}^{-1}$ illetve $10^{-7} \mu\text{g toxin} \times \text{sejt}^{-1}$ mennyiséget) tekintettük.

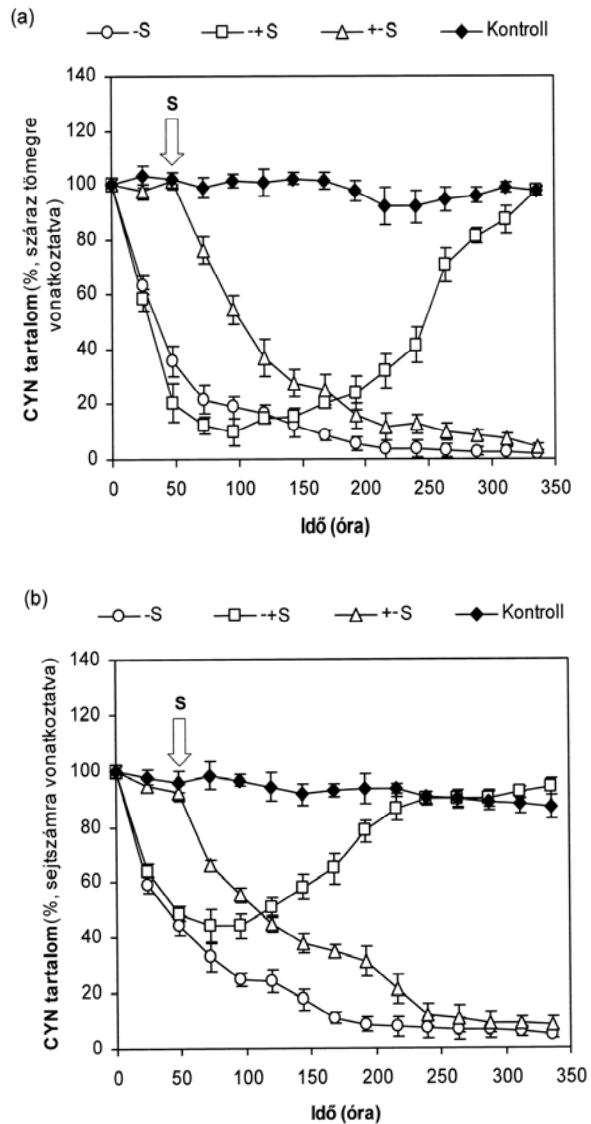
4.4.1. A sejtek cianotoxintartalmának változása a kénéheztetett *A. ovalisporum* tenyészetekben

A kontroll tenyészetben a cianotoxin-tartalom a tenyésztés teljes ideje alatt közel állandó értéket mutatott, sem száraz tömegre, sem sejtszámra vonatkoztatva nem változott jelentősen az *A. ovalisporum* sejtekben (25. ábra, fekete rombuszok).

A kénéhezés körülményei között a tenyésztés előrehaladtával a tenyészet sejtjeinek száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatott cilindrospermopszin tartalma folyamatosan csökkent. A csökkenés üteme független attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-S; 25. a-b ábra, üres körök), vagy 48 óra (2 nap) elteltével kezdődött (+S; 25. a-b ábra, üres háromszögek). A toxintartalom csökkenésének mértéke jelentősen különbözik attól függően, hogy a toxintartalmat száraz tömegre vagy sejtszámra vonatkoztatva adjuk meg (25. a-b ábra). Száraz tömegre vonatkoztatva a kiindulási cilindrospermopszin tartalom 35%-ra esik vissza 48 óra alatt, míg sejtszám alapján számítva a toxintartalmat, a 48 óra elteltével mérhető mennyiség több, mint a kiindulási érték 40 %-a (44%). Erre a jelenségre magyarázatul szolgálnak a növekedés vizsgálata során tapasztaltak. Ahogy az a 4.2.1. pontban olvasható, kénéhezés során igen gyorsan megáll a sejtszám növekedése (14. ábra), ezzel szemben a száraz tömeg hosszabb időn keresztül (kb. a 150. óráig, 6. napig) emelkedik, azaz, egy sejt száraz tömege nagyobb lesz az éhezés előrehaladtával (15. ábra) a felhalmozódó granulomoknak köszönhetően. Így érthetővé válik, hogy miért tűnik száraz tömegre vonatkoztatva ugyanaz a cilindrospermopszin mennyiség „kevesebbnek”. Mindez azt sugallja, hogy az adott kísérlet céljától függően körültekintően kell megválasztani azt a paramétert, amelyre a toxintartalmat vonatkoztatni kívánjuk.

A 48 órán át szulfát hiányában nevelt, majd a szulfátot visszacapott tenyészetben (-+S; 25. a-b ábra, üres négyzetek) a cilindrospermopszin tartalom egy 45-50 órás (körülbelül két napos) lag periódus után emelkedni kezd, a tenyésztés utolsó harmadában eléri a kontrollban mérhető értéket. Amennyiben tehát a szulfátot az éhezés olyan időpontjában adjuk vissza, amikor a tenyészet még regenerálódni

képes, azaz a növekedés helyreáll, akkor a toxintermelés is visszaáll az eredeti szintre.



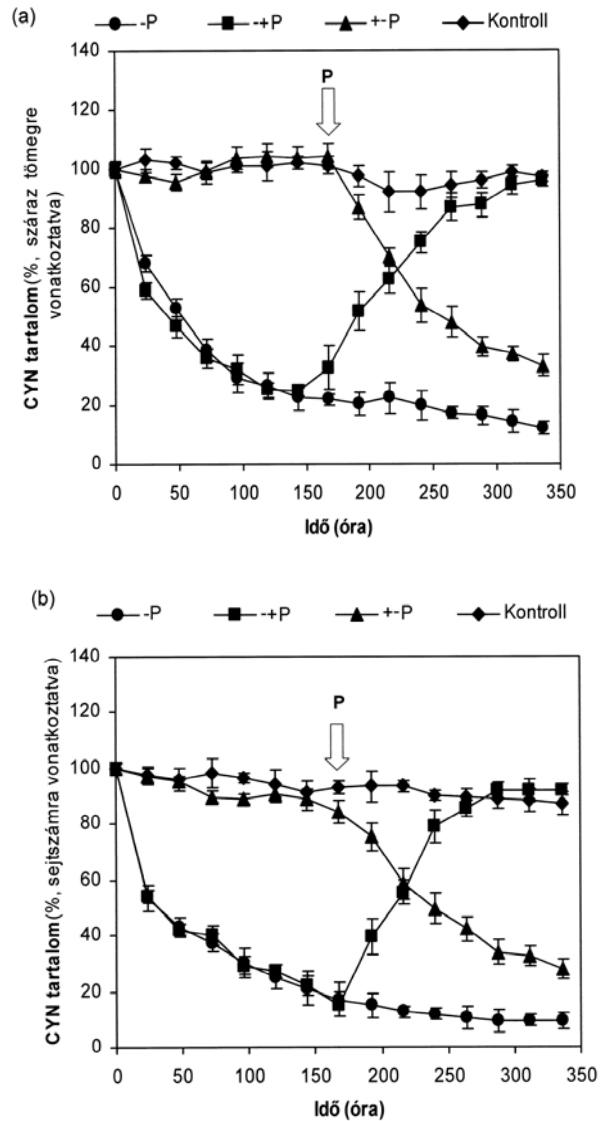
25. ábra. A cilindropermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejtszáma vonatkoztatva az *A. ovalisporum* tenyészetekben a szulfátékezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindropermopszin mennyisége $5,21 \mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$ száraz tömeg (a), illetve $2,17 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ per sejt (b). Ezeket a

mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindropermopszin tartalmát. A nyíl a szulfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet szulfátmentes médiumba való átoltásának időpontját jelöli.

4.4.2. A sejtek cianotoxin-tartalmának változása a foszforéheztetett *A. ovalisporum* tenyészetekben

A foszforéhezés körülményei között a tenyésztés előrehaladtával a tenyészet cilindropermopszin tartalma folyamatosan csökkent, függetlenül attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-P), vagy 168 óra (7 nap) elteltével (+-P) kezdődött (26. a-b ábra, fekete körök, illetve fekete háromszögek), ahogyan azt a kénéhezés esetében is megfigyelhettük. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy a foszforéhezés során nem tapasztalható lényeges különbség a cianotoxin-tartalom csökkenésében a száraz tömegre vonatkoztatott, illetve a sejtszámra vonatkoztatott adatok között (mindkét esetben a kiindulási érték 42-46 %-ára csökken a cilindropermopszin tartalom 48 óra (2 nap) alatt; 26. a-b ábra, fekete körök). Ennek magyarázata a növekedésváltozások eredményeiben keresendő. A foszforéhezés során nem tapasztaltunk számottevő különbséget a sejtszám, illetve a száraz tömeg változása között (17. ábra), vagyis a sejtek tömege közel azonos mértékben változott, mint a számuk, ezért nincs jelentős különbség a száraz tömegre vonatkoztatott, illetve a sejtszámra vonatkoztatott adatok között.

A 168 órán (7 napon) át tartó éhezés után a foszfátot visszakapott tenyészetben (-+P) a cilindropermopszin tartalom 24 óránál rövidebb lag periódus után növekedni kezdett (26. a-b ábra, fekete négyzetek). Ez is azt bizonyítja, hogy az *A. ovalisporum* sejtek rövid idő alatt, nagy mennyiségű foszfát felvételére és annak az anyagcserében való gyors hasznosítására képesek.



26. ábra. A cilindropermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatva az *A. ovalisporum* tenyészetekben a foszfátéhezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindropermopszin mennyisége $5,12 \mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$ száraz tömeg (a), illetve $2,12 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ per sejt (b). Ezeket a mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindropermopszin tartalmat. A nyíl a foszfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet foszfátmentes médiumba való átoltásának időpontját jelöli.

4.4.3. A sejtek cianotoxin-tartalmának változása a kötött nitrogén hiányában nevelt *A. ovalisporum* tenyészetekben

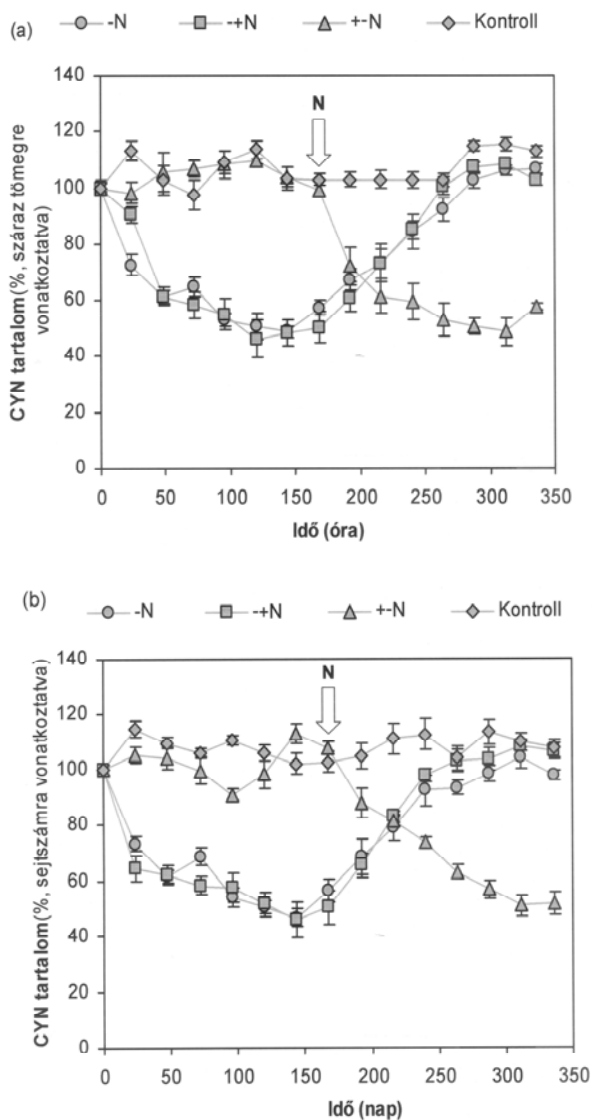
Kötött nitrogén hiányában a tenyészet cilindrospermopszin tartalma sajátos dinamika szerint változik a tenyésztés előrehaladtával. Abban az esetben, amikor az éhezés a tenyésztés elején kezdődik (-N, 27. a-b ábra, szürke körök), a tenyésztés első 144 órájában (6 napján) a cianotoxin-tartalom csökken, 48 óra (2 nap) alatt a kiindulási érték 61 %-ára, a 6. napra 46,5 %-ra. A 7. naptól kezdődően azonban emelkedni kezd a toxintartalom, a tenyésztés utolsó harmadában a kontrollban mérhető értéknél 5-8%-kal alacsonyabb szinten stabilizálódik. Amennyiben 168 óra (1 hét) elteltével (+-N, 27. a-b ábra, szürke háromszögek) kezdődött az éheztetés, hasonló tendenciát figyelhettünk meg a sejtek cilindrospermopszin tartalmának változásában, mint a -N tenyészet esetében az első 6 napban. Azaz a +-N tenyészetben a cianotoxin-tartalom csökkent a kötött nitrogén megvonását követően (majd a heterociszták megjelenése után emelkedik a sejtek cilindrospermopszin tartalma - az adatokat nem mutatjuk be).

A tenyésztés első felében kötött nitrogén hiányában nevelt, majd nitrátot visszakapott tenyészet (-+N, 27. a-b ábra, szürke négyzetek) esetében a sejtek cilindrospermopszin tartalma hasonló dinamika szerint változott, mint a tenyésztés végéig kötött nitrogén hiányában nevelt (-N) tenyészet esetében. A cianotoxin-tartalom a tenyésztés első felében csökkent, majd a nitrát visszaadását követően emelkedett, és a 14. napra a kontrollban mérhető szinten stabilizálódott.

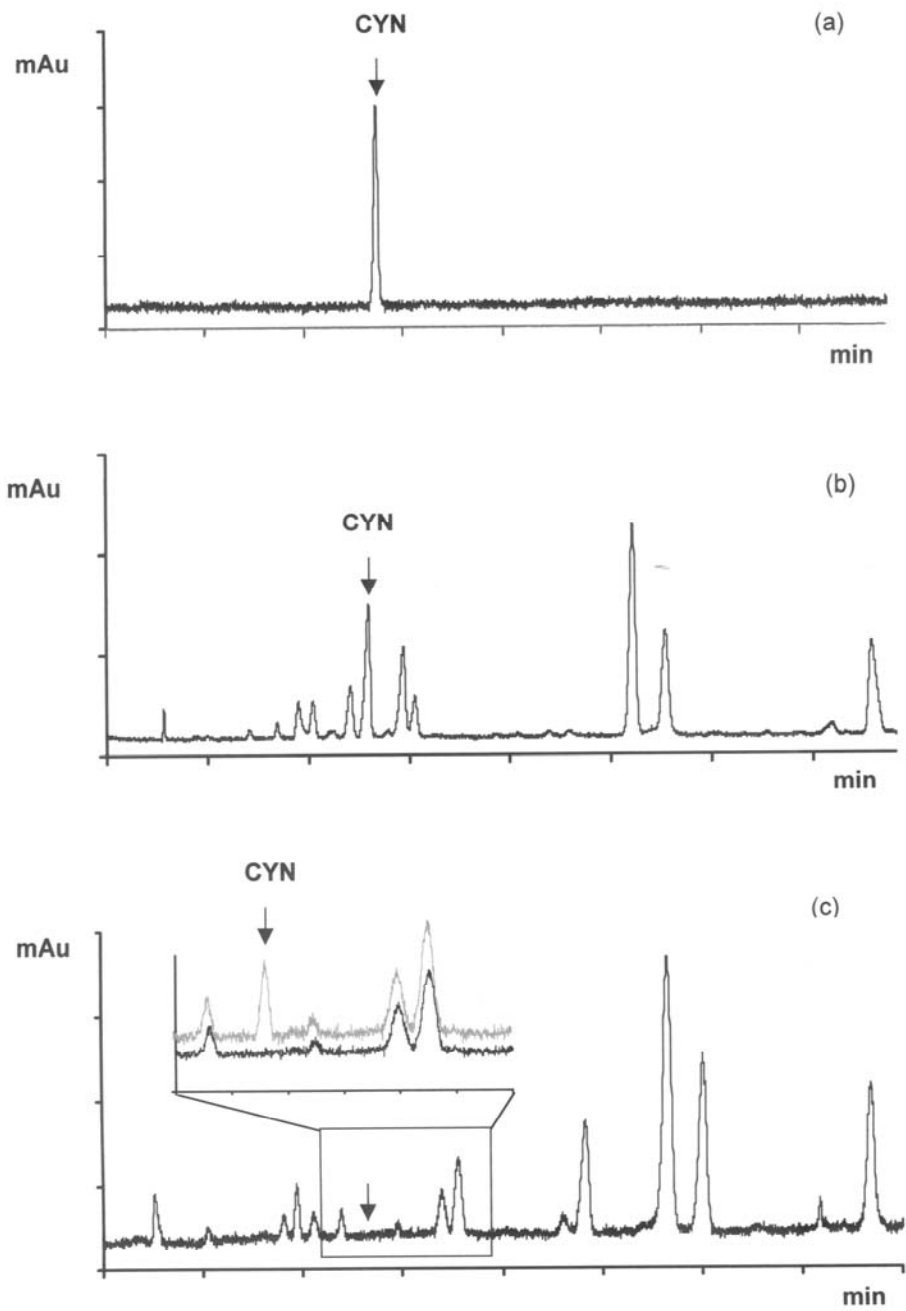
Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a nitrogénéhezés következtében csökken az *A. ovalisporum* sejtek cilindrospermopszin tartalma. A cianotoxin-tartalom csökkenése addig tart, amíg helyre nem áll a sejtek nitrogénellátottsága. Ez a tenyésztés teljes ideje alatt kötött nitrogén hiányában nevelt tenyészet (-N) esetében az érett heterociszták kialakulása, az aktív nitrogénkötés megindulása után következik be, azaz a sejtekben a cianotoxin-tartalom újra növekedésnek indul és a tenyésztés végére a kontrollnál alacsonyabb szinten stabilizálódik. A nitrátot visszakapott tenyészetben (-+N) hasonló módon változik cilindrospermopszin mennyisége. Azt mondhatjuk tehát, hogy a cianotoxin termelés szempontjából nem tudunk jelentős különbséget

kimutatni a nitrogénkötésre „berendezkedett” és a nitrátot visszkapott tenyészetek között. A nitrogénellátottság, azaz a növekedés helyreállása – annak mikéntjétől függetlenül - a cianotoxin termelés helyreállítását eredményezi.

A heterociszták toxintartalmának vizsgálata során kapott eredményeket a 28. ábra mutatja be. A vegetatív sejtek kivonatának elektroferogramján jól látható a cilindropermopszin csúcs (28. b ábra), míg a heterociszták kivonatának elektroferogramján ilyen csúcs nem jelenik meg (28. c ábra). Vizsgálataink során tehát kimutattuk, hogy a heterociszták cilindropermopszint nem tartalmaznak, a tiszta cilindropermopszinnal kiegészített („spike-olt”) heterociszta-kivonat elektroferogramja (28. c ábra, szürkével jelölve) is ezt bizonyítja. Kötött nitrogén hiányában tehát a vegetatív sejtek cianotoxintartalma csökken, majd a megfelelő nitrogénellátás kialakulása után a kontroll sejtekre jellemző értékre áll vissza. A heterociszták cilindropermopszint nem tartalmaznak, így a stabil, működő heterocisztákat tartalmazó nitrátéheztetett tenyészetben az összes toxintartalom kevéssel a kontrollban mérhető érték alatt marad. Az a tény, hogy a heterocisztákban nem tudunk kimutatni cilindropermopszint, felveti, hogy a CYN szintéziséért felelős gének kikapcsolnak a heterocisztában. Ez nem meglepő, hiszen a heterociszta anyagcseréje alapvetően átalakul (Wolk, 1982), ráadásul a nitrogenáz enzimrendszer működése rendkívül energia és redukáló erő igényes.



27. ábra. A cilindropermopszin tartalom változása száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatva az *A. ovalisporum* tenyészetekben a nitrátékezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindropermopszin mennyisége $4,84 \mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$ száraz tömeg (a), illetve $1,89 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ per sejt (b). Ezeket a mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindropermopszin tartalmat. A nyíl a nitrát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet 2% kötött nitrogént tartalmazó médiumba való átoltásának időpontját jelöli.



28. ábra. A heterociszták cilindrospermopszin tartalmának vizsgálata kapilláris

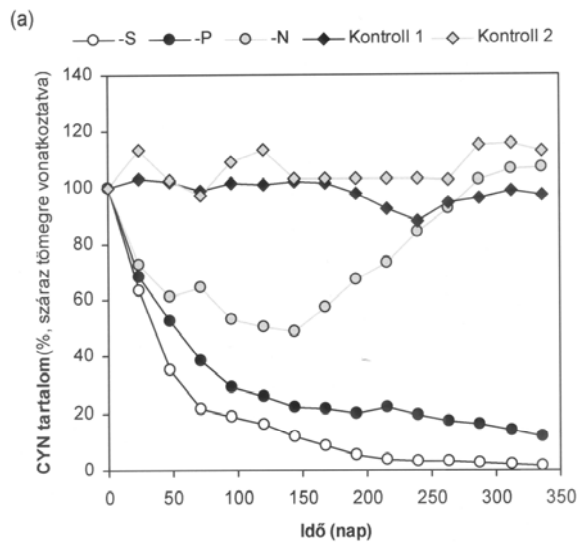
elektroforézis (CE) módszerrel. (a) A tiszta cilindropermopszin (CYN) elektroferogramja. (b) A vegetatív sejtek elektroferogramja, a nyíl a cilindropermopszin csúcsot jelöli. (c) Az izolált heterociszták elektroferogramja. A bekeretezett részben a nyíl a cilindropermopszin csúcs helyét jelöli. A kinagyított részben feketével jelöltük a tisztított heterociszták kivonatának elektroferogramját, szürkével a tiszta cilindropermopszinnal kiegészített heterociszta-kivonat elektroferogramját.

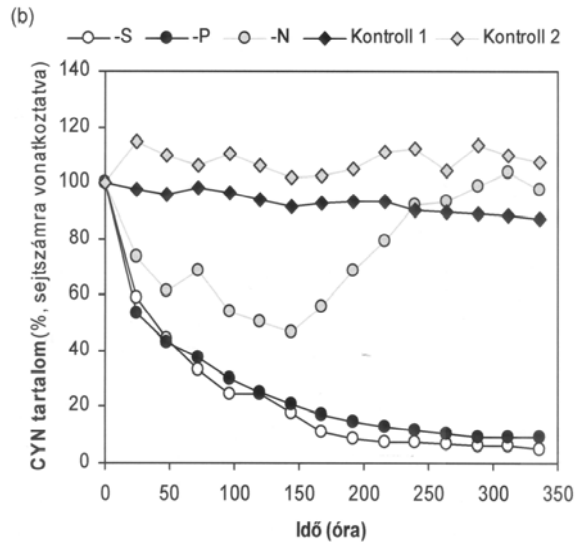
4.4.4. A cianotoxintartalom változásának összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között

Mint az előbbiek alapján látható, az *A. ovalisporum* sejtekben a szulfát, a foszfát és a nitrát megvonása is a cilindropermopszin tartalom csökkenéséhez vezet. Ha a cianotoxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatjuk, a következőket állapíthatjuk meg: legnagyobb mértékben a kénéheztetett tenyészetben csökken a toxintartalom (a kiindulási érték 35%-ra csökkent 2 nap alatt; 29. a ábra, üres körök). A foszfát hiányában mérsékeltbb csökkenést tapasztaltunk (a kiindulási érték 43-46%-ra csökkent 2 nap alatt; 29. a ábra, fekete körök), míg nitrát hiányában volt a legkisebb mértékű a toxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 61-62%-ra csökkent 2 nap alatt, 29. a ábra, szürke körök). Kötött nitrogén hiányában a 6. naptól a cilindropermopszin mennyisége újra megnövekedett, ami a törzs nitrogénkötő képességével, és így a nitrogénellátás, az új típusú anyagcsere beindulásával, a növekedés újraindulásával magyarázható. Mint azt az előzőekben láthattuk az anyagcsere „mesterséges” helyreállításával, azaz a hiányzó tápelem visszaadásával is helyreáll a cilindropermopszin termelés.

Amennyiben a toxintartalmat sejtszámra vonatkoztatva számítjuk, nincs számottevő különbség a kénéhezés és a foszforéhezés között; a cilindropermopszin mennyisége mindkét esetben a kiindulási érték 43-44%-ára csökken 2 napon belül (29. b ábra, üres, illetve fekete körök). A kötött nitrogén hiányában nevelt tenyészet esetében sejtszámra vonatkoztatva is kisebb mértékű a cianotoxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 61-62%-ra csökkent 2 nap alatt, 29. b ábra, szürke körök), mint szulfát illetve foszfát hiányában.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* ILC-164 fonalas cianobaktérium cilindrospermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtek cilindrospermopszin tartalmában bekövetkező konkrét csökkenés. A cianotoxin-tartalom csökkenésének mértékében a kénéheztesített tenyészetben különbséget detektáltunk annak függvényében, hogy a cilindrospermopszin tartalmat száraz tömegre, vagy sejtszámra vonatkoztattuk. Ennek lehetséges magyarázata a kénéheztesített sejtek megváltozott anyagcseréje lehet (glikogén, polihidroxi-vajsav és egyéb tartalék tápanyagok felhalmozása, amely a száraz tömeget jelentősen befolyásolja (4.2.1.). Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcsere-folyamatok szabályozásán túl szoros összefüggésben van a sejtek cilindrospermopszin termelésével is. A bemutatott eredmények alapján hangsúlyozzuk, hogy az egyes tápelemek tartalékai alapvetően befolyásolják az *A. ovalisporum* a cilindrospermopszin termelését.





29. ábra. A cilindropermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejszámra vonatkoztatva az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben a különböző éhezések során. A beoltáskor (nulla időpontban) mért cilindropermopszin mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindropermopszin tartalmat. A szulfát- és foszfátéhezéses kísérleteinket a nitrátéhezéses kísérletektől eltérő időben végeztük, ezért különböző a kísérletek kontrollja, következésképp jelöltük a nitrátéhezéshez tartozó kontroll tenyészet adatait is (szürke rombuszok) Az összehasonlító ábrán a nitrátéhezéshez tartozó kontroll tenyészet adatai Kontroll 2 néven szerepelnek.

4.5. Az *A. ovalisporum* tápanyag – ellátottságának és cilindropermopszin termelésének kapcsolata irodalmi adatok tükrében

Az *Aphanizomenon ovalisporum* ILC-164 fonalas, nitrogénkötő cianobaktérium tápeleméhezésének és cilindropermopszin termelésének összefüggéseit vizsgálva a következőket mondhatjuk:

A különböző tápelemek hiányában megfigyelhető növekedési sajátságok összhangban állnak az irodalomból ismert adatokkal: A szulfátéhezés során, a más cianobaktériumoknál is megfigyelt változások zajlanak le, azaz a fikobiliprotein-tartalom drasztikusan

csökken, a sejttérfogat nagy részét granulomok töltik ki (Ortega-Calvo és Stal, 1994; Ariño *et al.*, 1995). Az *A. ovalisporum* sejtek – az irodalmi adatok alapján a cianobaktériumokra általánosan jellemzőnek tekinthető módon – nem képesek nagy mennyiségű kén felhalmozására és annak valamilyen formában történő raktározására.

Foszforéhezés során az irodalomban más cianobaktériumokkal kapcsolatban már ismert jelenségek figyelhetők meg az *A. ovalisporum* esetében is: a tenyészetek sárgulni kezdenek, csökken a növekedés üteme, de nem olyan mértékben, mint a szulfátéhezés során. Ezeket a jelenséget korábban unicelluláris cianobaktériumoknál is megfigyelték (Collier és Grossman, 1992). A fonalas fajok esetén többek között az *Anabaena variabilis* egyik törzsét tanulmányozták részletesen (Healey, 1982), amely a foszfát teljes hiányában még egy hét után is növekedést mutatott. A növekedési adatok alapján elmondható, hogy a sejtek képesek nagy mennyiségű foszfor felhalmozására és annak az anyagcserében, így a növekedési folyamatokban való felhasználására. (Stanier és Cohen-Bazire, 1977).

Az irodalom szerint a cianobaktériumokban a fikobiliproteinek nitrogénraktárként szerepelhetnek kötött nitrogén hiányában (Allen és Smith, 1969; Cohen-Bazire és Bryant, 1982; Boussiba és Richmond, 1980). Megfigyeléseink összhangban állnak az irodalmi adatokkal: kötött nitrogén hiányában a tenyészetek sárgulásának fő oka a fikobiliproteinek lebomlása lehet. A heterociszták kialakulása, a nitrogén-kötés megindulása után a tenyészet teljesen nitrátmentes tápoldatban fenntartható, növekedése a kontrollnál alacsonyabb rátával stabilizálódik, ahogyan az más, fonalas nitrogénkötő cianobaktériumnál is megfigyelhető (Wolk, 1982; Haselkorn and Buikema, 1992).

A tápelemek hiánya nemcsak a tenyészetek növekedésének dinamikájában okoz változásokat, de az adott tápelem metabolizmusában kulcsfontosságú enzimek expressziójában is. A szulfát hiánya az *A. ovalisporum* ATP-szulfuriláz enzimének aktivitásában jelentős (20-szoros) növekedést indukál. A fonalas cianobaktériumok esetében kevés adat található az irodalomban az ATP-szulfuriláz enzim jellemzésére vonatkozóan, egy *Spirulina platensis*, valamint egy *Anabaena cylindrica* törzs esetében az enzimaktivitás növekedéséről számoltak be (Menon és Varma, 1978; Sawney és Nicholas; 1977). A dolgozatban bemutatott, az ATP-

szulfuriláz indukciójára vonatkozó adatok az első eredmények az *A. ovalisporum* esetén.

A foszforéhezés során végzett enzimológiai vizsgálataink eredményei összhangban állnak az irodalmi adatokkal, melyek szerint a cianobaktériumokban az alkalikus foszfatáz rendszer indukálódik foszfát hiányában (Healey, 1982; DeMarsac és Houmard, 1993).

A kötött nitrogénformák csökkent mennyisége, majd hiánya a tápoldatban a vegetatív sejtek egy részének (kb. 8,5%-ának) heterocisztává való differenciálódásához, a nitrogénáz enzim indukciójához vezetett az általunk vizsgált *Aphanizomenon ovalisporum* törzs esetében. Az irodalomban találunk példát arra vonatkozóan, hogy proheterociszták megjelennek, de aktív nitrogénáz nem mutatható ki (Elhai és Wolk, 1990; Ernst *et al.*, 1992), vagyis a heterociszta differenciálódás és a nitrogénkötés genetikai programja elválasztható egymástól. A kötött nitrogén hiányában mutatott növekedési paraméterek alapján, valamint a nitrogénáz enzimkomplex kimutatása során született adatok alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált *A. ovalisporum* törzsnél ez a jelenség nem áll fenn, törzs a nitrogénkötő cianobaktériumoknál általánosan elfogadott módon reagál a kötött nitrogén hiányára. A heterociszták megjelenése, a légköri nitrogén megkötésének elindulása megfigyeléseink alapján összhangban áll az *Anabaena* PCC 7120 törzssel kapcsolatban olvasható irodalmi adatokkal (Wilcox *et al.*, 1973).

A különböző toxikus cianobaktérium törzsekkel végzett laboratóriumi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a környezeti tényezők sokféleképpen hathatnak az egyes fajok, sőt még ugyanazon faj eltérő toxint termelő, vagy ugyanazon faj ugyanazon cianotoxint termelő, de más élőhelyen előforduló törzseire is. A vizsgálatok egy része azt bizonyítja, hogy a cianobaktériumok több toxint termelnek kedvezőbb növekedési körülmények között (Chorus és Bartram, 1999). Az ellenkező esetre is van példa: Van der Westhuizen és Eloff (1983) tanulmánya szerint az általuk vizsgált *Microcystis aeruginosa* törzsnél a sejtek túl magas vagy túl alacsony pH mellett toxikusabbnak mutatkoztak. Az ásványi anyagok koncentrációjának hatása is nagy változatosságot mutat: Sivonen és munkatársai (1992, 1995) azt tapasztalták, hogy egy anatoxint termelő *Anabaena* törzs toxinszintjére a foszforhiány nem volt hatással, míg a hepatotoxint termelő törzsnél a

toxinszint jelentősen csökkent a foszforéhezés körülményei között. Orr és Jones (1998) egy *Microcystis aeruginosa* törzs mikrocisztin termelését vizsgálva arra a megállapításra jutott, hogy a toxintartalom a növekedési rátával egyenes arányban változik foszfor hiányában. Stolte és munkatársai (2002) egy másik hepatotoxin, a nodularin mennyiségét vizsgálta egy *Nodularia spumigena* törzs foszforlimitált tenyészetében, eredményeik alapján a toxintermelés és a növekedési ráta között nem volt kimutatható ilyen összefüggés.

Az előzőekben bemutatott vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a cianobakteriális toxinok termelésére vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak. A cianobaktériumok tápelem éhezése és cianotoxin termelése közötti összefüggések megértése a felszíni vizekben található, vízvirágzást okozó cianobaktériumok funkciója szempontjából alapvetően fontos. Kísérleteinket az előbbi cél alapján terveztük meg.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* ILC-164 fonalas cianobaktérium cilindropermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtek cilindropermopszin tartalma csökken le – azaz a cilindropermopszin termelésében részt vevő enzimek represszálódnak, vagy a cianotoxin lebontása fokozódik. A cianotoxin-tartalom csökkenésének mértékében a kénéheztetett tenyészetben különbséget detektáltunk annak függvényében, hogy a cilindropermopszin tartalmat száraz tömegre, vagy sejtszámra vonatkoztattuk. Ennek magyarázata a kénéheztetett sejtek megváltozott anyagcsereje lehet (glikogén, polihidroxi-vajsav és egyéb tartalék tápanyagok felhalmozása), amely a száraz tömeget jelentősen befolyásolja. Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcserefolyamatok szabályozásán túl hatással van a sejtek cilindropermopszin termelésének szabályozására is.

Hangsúlyoznunk kell, hogy az eddigi irodalmi adatok és jelen eredmények ismeretében nem beszélhetünk a cianobakteriális toxintermelés szabályozásában általános érvényű törvényszerűségekről. Az eddigi ismeretek azt sugallják, hogy adott törzs toxintermelése adott élőhelyen, illetve a törzsre jellemző sajátos szabályozási törvényszerűségekkkel jellemezhető.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az eutrofizáció a 20. század közepe óta széles körben elterjedt, jelentős károkat okozott a vízi környezetben, komoly nehézségeket váltott ki a vízhasználatban (Chorus and Bartram, 1999). Az eutrofizáció alkalmával sok esetben megfigyelhető „kísérő” jelenség a vízvirágzás, a planktonszervezetek (cianobaktériumok és eukarióta algák) tömeges elszaporodása. A vízvirágzások kialakulásában a felvehető foszfor mennyisége az egyik legfontosabb tényező, emellett a kötött – a fitoplankton szempontjából elsősorban a szervesen kötésben lévő – nitrogén mennyisége mutatkozik meghatározónak (Chorus and Bartram, 1999). A közelmúltban széles körben elfogadottá vált, hogy az eutrofizáció következményeként a vizekben megjelenő cianobakteriális toxinok humán-egészségügyi problémát okozhatnak (Falconer, 1993; Bell és Codd, 1994). Mind környezetvédelmi, mind toxikológiai szempontból fontos és érdekes kérdés a különböző tápelemekkel való ellátottság és a cianobakteriális toxintermelés közötti összefüggések vizsgálata, különösen annak figyelembe vételével, hogy a cilindrospermopszin termelő szervezetekkel kapcsolatban kevés ilyen irányú ismeret és adat található az irodalomban.

Munkánk során a kén, a foszfor, illetve a kötött nitrogén hiányának toxintermelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk az ILC-164 *Aphanizomenon ovalisporum* toxikus cianobaktérium törzs esetében. A kénéhezés vizsgálatát indokolja, hogy az ILC-164 *Aphanizomenon ovalisporum* törzs által termelt cilindrospermopszin kéntartalmú cianotoxin. A foszforlimitált körülmények hatásának megfigyelése értékes információkkal szolgál, hiszen a foszfor központi szerepet játszik a vízvirágzások kialakulásában. A vízhasználat szempontjait figyelembe véve tanulságos lehet a cianobakteriális foszforforgalom és a toxintermelés kapcsolatának megértése. A nitrátéhezés speciális esetet képvisel, hiszen az általunk vizsgált törzs a légköri nitrogén megkötésére képes. Ebben az esetben arra kerestük a választ, hogy a heterociszták kialakulásáig fellépő nitrogénéhezés hogyan befolyásolja a vegetatív sejtek cilindrospermopszin termelését, illetve, a specializált morfológiai és fiziológiai sajátságokkal jellemezhető heterociszták részt vesznek-e a toxintermelésben.

Eredményeink alapján a következőket mondhatjuk el:

- Mind szulfát, mind foszfát, mind pedig nitrát hiányában jelentős változások következnek be az *A. ovalisporum* sejtek morfológiájában.
 - o A fénymikroszkóppal megfigyelhető változások már igen korán, a tenyésztés első néhány napjában lezajlanak kénéhezés során. Kén hiányában a sejtek granuláltsága már a második napra jelentős mértékben megváltozott, a 4.-6. napra a sejtek tovább fokozódó granuláltsága mellett jellegzetes, nagyméretű, amorf sejtek voltak megfigyelhetők. A tenyésztés végére a fonalak feldarabolódása és kiüledése jellemző.
 - o Foszfor hiányában a sejtek megnyúltabbak, a fonalak vékonyabbak, mint a kontroll esetében, a tenyésztés végére a vegetatív sejtek homogénné váltak. A vegetatív sejtek egy kis hányada akinétává differenciálódott a foszforéheztetett tenyészetekben, azonban nem beszélhetünk a foszforéhezés során statisztikusan értékelhető jelenségről az általunk vizsgált törzs esetében.
 - o Nitrát hiányában a Nostocales rendre jellemző morfológiai átalakuláson megy át a vegetatív sejtek egy része: a légköri nitrogén megkötésére képes heterociszták jönnek létre. A proheterociszták a harmadik napon jelentek meg a fonalakban, a tenyésztés végére a heterociszta frekvencia meghaladta a 8%-ot.
- 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.
 - o 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. Szulfát hiányában a tenyészet 72-96 óra alatt olyan mértékű károsodást szenved, hogy ekkor már a szulfát visszaadása után sem képes regenerálódni. 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 raktározására. Ezzel szemben 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 (Boussiba és Richmond, 1980). Megfigyeléseink 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.
- Az enzimológiai vizsgálatok során kimutattuk az adott tápelem metabolizmusában szereplő kulcsenzimek indukcióját.
 - Meghatároztuk az *A. ovalisporum* ATP-szulfuriláz enzimének pH optimumát, valamint megállapítottuk, hogy a szulfát hiánya az enzim aktivitásában kb. hússzoros növekedést indukál.
 - A foszfátéhezés körülményei között az alkalikus foszfátáz 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.
- A sejtek cianotoxin-tartalmára vonatkozó vizsgálataink eredményei szerint a szulfát, a foszfát és a nitrát hiánya is a cilindrospermopszin tartalom csökkenéséhez vezet az *A. ovalisporum* sejtekben.
 - Ha a toxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg, legnagyobb mértékben a kénéhezettett tenyészetben csökken a toxintartalom (a kiindulási érték 35%-ra csökkent 2 nap alatt). A foszfát hiányában mérsékeltebb csökkenést tapasztalhattunk (a kiindulási érték 43-46%-ra csökkent 2 nap alatt), míg nitrát hiányában volt a legkisebb mértékű a toxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 61-62%-ra 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. Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a nitrát hiányában differenciálódó heterociszták nem tartalmaznak cilindrospermopszint, azaz anyagcseréjük a

másodlagos anyagcseretermékek termelése tekintetében is átalakul, a cilindropermopszin termelés represszálódik.

Az irodalomban sokféle adatot találhatunk arra vonatkozóan, hogy az egyes környezeti tényezők milyen sokféleképpen befolyásolhatják a különböző cianobaktérium fajok toxintermelését, sőt, ugyanazon faj különböző törzseinek toxintermelését is. A cilindropermopszint termelő cianobaktériumokra vonatkozóan lényegesen kevesebb ismerettel rendelkezünk.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium cilindropermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, vagyis attól nem egyenes arányban függ, hanem az egyes sejtekben csökken a cilindropermopszin mennyisége. A kénéheztetett tenyészetekben a száraz tömegre, illetve a sejtszámra vonatkoztatott toxintartalom-csökkenés jelentős eltéréseket mutatott. Erre a kénéheztetett sejtek metabolizmusának átalakulása, a sejtekben felhalmozódó granulomok okozta száraz tömeg/sejtszám arány megváltozása adhat magyarázatot. Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcserefolyamatok, valamint a sejtszétválás szabályozásán túl összefüggésben van a törzs cilindropermopszin termelésének szabályozásával is.

A dolgozatban bemutatott eredmények az elsők az *A. ovalisporum* cilindropermopszin termelése és tápelemellátottsága közötti összefüggésekkel kapcsolatban. Eredményeink nem tekinthetők általános érvényűnek, azt mondhatjuk, hogy adott törzs toxintermelése adott élőhelyen, illetve a törzsre jellemző sajátos szabályozási törvényszerűségekkel jellemezhető. A felmerülő kérdések megválaszolása, a cilindropermopszin termelés szabályozásának pontosabb megismerése további kutatásokat igényel.

6. SUMMARY

Since the middle of the twentieth century eutrophication has become more widespread, it has caused deterioration in the aquatic environment and serious problems for water use (Corus and Bartram, 1999). Wherever conditions of temperature, light and nutrient status are conducive, surface waters may host increased growth of cyanobacteria and eukaryotic algae; this phenomenon is referred as a cyanobacterial or algal water-bloom. Phosphorous is the major nutrient controlling the occurrence of water blooms, although nitrogen compounds are sometimes relevant in determining the amount of cyanobacteria or algae present (Corus and Bartram, 1999). Cyanobacterial toxins have recently become widely recognized as a human health problem arising as a consequence of eutrophication (Falconer, 1993; Bell and Codd, 1994). The examination of the relationship between the availability of nutrients and cyanotoxin production is an important and interesting question both environmental and toxicological points of view, especially as there is less available information in the literature, how nutrient starvation interferes with cylindrospermopsin production.

The effect of sulfate, phosphate and combined nitrogen starvation was studied on cylindrospermopsin level in *Aphanizomenon ovalisporum* ILC-164. Since cylindrospermopsin is a sulfur-containing cyanotoxin, it provides a realistic experimental system to analyze and understand the interference of sulfure starvation with cyanotoxin content. As nitrogen fixing cyanobacteria are frequently prominent members of undesirable blooms in natural waters, in which phosphate availability is a common regulating factor, it deserves considerable attention to compare the consequences of phosphorous and combined nitrogen starvation on cylindrospermopsin content of *A. ovalisporum*, a nitrogen fixing cyanobacterium. In the case of nitrogen deprivation the cylindrospermopsin content of the differentiated cells, the heterocysts was also measured.

- Both sulfate and phosphate starvation and the lack of combined nitrogen led changes in the morphology of *A. ovalisporum* cells.
 - o The changes of trichomes and cell morphology were detectable within the first 3 days of sulfate deprivation.

The 'granulation' of the cytoplasm of cyanobacterial cells increased, oversized, amorphous cell forms appeared. The trichomes were shortened the fragments of filaments were dripping to the bottom of the culturing flask.

- The trichomes became thinner, the cells interior turn homogenous in cultures lacking phosphate. A tiny fraction of vegetative cells differentiated into akinetes by phosphorous starvation. This phenomenon occurred rather randomly than significantly under the studied conditions in the investigated *A. ovalisporum* strain.
 - Some of the vegetative cells differentiated into heterocysts under combined nitrogen limited conditions. The proheterocysts appeared on the 3rd day of culturing the heterocyst frequency reached 8% at the end of the experiment (14 days).
- Both sulfate, phosphate and combined nitrogen starvation reduced growth but not at the same rate.
- The sulfate starvation resulted in an immediate stop of growth, while phosphate starvation reduced it significantly although that was not completely abolished. The lack of sulfate was deleterious for the viability of cultures after 72-96 h and regeneration of the cells was impossible even with readdition of sulfate. The cells of *A. ovalisporum* are not able to accumulate sulfate and they have no storage capacity for it. This phenomenon is in accordance with previous findings and seems to be a characteristic feature of cyanobacteria. In contrast, cyanobacteria have a substantial storage capacity for phosphorous, as it is widely discussed in the literature. However, after 16-18 days of phosphorous starvation the phosphate pools became exhausted, and the cultures collapsed.
 - The phycobiliproteins may serve as a nitrogen pool in the cyanobacteria (Boussiba and Richmond, 1980). Our results are in accordance with the previous data: the

cultures turned yellow primarily because of the disorganization of phycobiliproteins. After the differentiation of heterocysts, the growth of the cultures restarted and stabilized at a lower rate.

- Through enzymological studies, an induction of the key enzymes of metabolic pathways in question by the studied nutrient was shown.
 - o Our results clearly shows that lack of sulfate induced a significant, 20-fold increase of ATP-sulfurylase activity, one of the key enzyme of sulfate metabolism in filamentous *A. ovalisporum* cultures with a pH optimum of 8,0.
 - o Phosphate starvation induced a significant and continuous 30-fold increase of *in situ* alkaline phosphatase enzyme activity. Chloramphenicol, a specific inhibitor of prokaryotic protein synthesis inhibited the increase of alkaline phosphatase activity; this fact suggests a *de novo* protein synthesis.
 - o The lack of combined nitrogen led to the induction of nitrogenase enzyme complex in *A. ovalisporum*. The presence and the increasing amount of the 33 kDa subunit of dinitrogen-reductase were established by combined nitrogen starvation with the help of immunoblot method.

- We analyzed the alterations of cylindrospermopsin content of nutrient deprived cultures with the help of capillary electrophoresis. Sulfate or phosphate starvation, or the lack of combined nitrogen induced a decrease in cylindrospermopsin content, but not necessarily at the same rate.
 - o The cylindrospermopsin content of sulfur-deficient cultures decreased dramatically – only 35% of the zero time level remained after 48 hours. Phosphorous starvation induced a moderate decrease in cylindrospermopsin content of the cells, 43-46% of zero time level remained after 48 hours. The cyanotoxin

content of the cultures lacking bound nitrogen decreased to 61-62% of zero time level in 48 hours. The amount of cylindrospermopsin began to increase after the 6 days, this phenomenon can be explained with the nitrogen-fixing ability of *A. ovalisporum*.

- The difference observed between the sulfate- and phosphate-limited cultures on the basis of dry mass cannot be obtained if the changes of cyanotoxin content were counted per cell. The explanation of this phenomenon might be the metabolic changes induced by sulfate starvation stress (accumulation of granules, increasing dry mass). The heterocysts, differentiated under nitrogen-limited conditions, do not contain cylindrospermopsin. The reason for this is not known but one may suppose the decomposition of the cyanotoxin, it may be a source of combined nitrogen.

There are several data in literature that environmental factors can induce changes in toxicity or toxin content of a cyanobacterial species or different strains of a species, but reports on alteration of cyanotoxin (cylindrospermopsin) content of cylindrospermopsin producing species are rare.

Our results clearly show that the cylindrospermopsin content of *A. ovalisporum* cells decrease by sulfate or phosphate starvation or in the lack of combined nitrogen, respectively. These changes in cyanotoxin content are not in direct linear correlation with the cell division rates as the cylindrospermopsin content decreases per cell in nutrient starved cultures. We detected difference in rate of cylindrospermopsin pool size reduction on dry mass base and on cell number base in sulfate starved cells. The explanation of this phenomenon might be the conversion of the metabolism of sulfate-deprived cells, the increasing dry mass of the cultures by accumulating storage granules. Our consideration of the results leads us to the expectation that the nutrient limitation in *A. ovalisporum* cells may have pleiotropic effects on cyanobacterial toxin metabolism.

The capillary electrophoretic analysis of crude extracts of nutrient starved *A. ovalisporum* cells demonstrates for the first time a

characteristic reduction of the pool size of cylindrospermopsin under the changes of environmental conditions. Our results add to the debate of literature concerning the pool size alterations of cyanotoxins. The cyanotoxin production of a given strain has its own regulation rules - the more detailed understanding of environmental control of cylindrospermopsin production needs further investigations, especially at gene regulation level.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Borbély Györgynek és Dr. Vasas Gábornak. Hálával tartozom, amiért lehetővé tették, hogy tagja legyek a cianobaktériumokkal foglalkozó kutatócsoportnak, a téma kiválasztásában és kidolgozásában nyújtott szakmai segítségért, a jó tanácsokért, az irányomban tanúsított – nem ritkán komolyan szükséges - végtelen türelmükért.

Köszönettel tartozom a Növénytani Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy munkámat zavartalanul, baráti légkörben végezhettem. Külön köszönöm Dr. Surányi Gyulának felbecsülhetetlen segítségét, és azt, hogy munkájával hozzájárult e dolgozat létrejöttéhez. Köszönöm neki, és Dr. Mikóné Dr. Hamvas Mártának, hogy kérdéseimmel bármikor zaklathattam őket, tudásukat, tapasztalataikat legnagyobb elfoglaltságuk közepette, a lelehetetlenebb időpontokban is megosztották velem. Nagyon hálás vagyok Dr. Máthé Csabának, hogy bevezetett a mikroszkopizálás, a mikroszkópi fotózás rejtelmeibe, és igyekezett tudását, tapasztalatait ezen túlmenően is a legteljesebb mértékben átadni. Köszönettel tartozom továbbá Tóth Szilviának önzetlen szakmai és emberi támogatásáért, Havelant Katalinnak a dolgozatírás során nyújtott legkülönbébb hardveres és szoftveres segítségért, beleértve a lélekápolást is.

Köszönöm Dr. Grigorszky Istvánnak a tanszéken, majd a Hidrobiológia Tanszékről nyújtott mindennemű emberi és szakmai segítségét.

Köszönöm továbbá a Szervetlen- és Analitikai Kémiai Tanszéken Dr. Gáspár Attilának, hogy lehetővé tette a kapilláris elektroforetikus méréseket, Dr. Serfőző Zoltánnak, az MTA BLKI munkatársának, valamint az Alkalmazott Kémiai Tanszéken Dr. Kéki Sándornak és Dr. Török Jánosnak a mikroszkopizálásban való közreműködést, a Biokémia Tanszéken Kertiné Somosi Ritának és Elek Ritának a minták liofilizálását.

Köszönettel tartozom családomnak (Szüleimnek, Testvéremnek, Nagyszüleimnek - Neked különösen Nagyapa - Reninek és Gábornak, Ritának és Zsoltnak) akik mindig biztosítottak támogatásukról.

Külön köszönet illeti menyasszonyomat, Béres Viktóriát, aki munkatársként és az életben társként is megértett, és a legkilátástalanabb helyzetben is kiállt mellettem.

Köszönet jár a barátoknak, akik soha nem engedték, hogy feladjam (TTK Túrakülönítmény, Kikötő Group, Tótfá 205-206, BAKI Group), továbbá mindazoknak, akik biztatásukkal, türelmükkel, megértésükkel hozzájárultak e dolgozat létrejöttéhez.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Allen, M.M.** (1968) Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J PHYCOL* 4: 1-4.
- Allen, M.M. and Smith, A.J.** (1969) Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *ARCH MICROBIOL* 69: 114-120.
- Allen, M.M., Hutchinson, I. and Weathers, P.J.** (1980) Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J BACTERIOL* 141 (2): 687-693.
- Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M. and Saiz-Jimenez, C.** (1995) Effect of sulfur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909. *ARCH MICROBIOL* 163: 447-453.
- Arizmendi, J.M. and Serra, J.L.** (1990) Purification and some properties of the nitrite reductase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1040: 237-244.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R. and Eaglesham, G.K.** (2002) Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *TOXICOLOGY* 181: 441-446.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. and Sukenik, A.** (1997) Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J PHYCOL* 33: 613-616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A. and Carmeli, S.** (2000) 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J NAT PROD* 63 (3): 387-389.
- Batterton, J.C. and Van Baalen, C.** (1968) Phosphorous deficiency and phosphate uptake in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *CAN J MICROBIOL* 14: 341-348.
- Bedu, S., Jeanjean, R. and Rocca-Serra, J.** (1982) Purification, properties and localisation of alkaline phosphatase of yeast *Candida tropicalis*. *PLANT SCI LETT* 27: 163-172.
- Bell, S.G. and Codd, G.A.** (1994) Cyanobacterial toxins and human health. *REV MED MICROBIOL* 5: 256-264.
- Bendall, D.S., Bowes, J.M., Stewart, A.C. and Taylor, M.E.** (1988) Oxygen-evolving photosystem II particles from *Phormidium laminosum*. In: L. Packer and A.N. Glazer (eds.) *Cyanobacteria*, Vol. 167, Meth. Enzymol., Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 272-280.
- Berman, T.** (1997) Dissolved organic nitrogen utilization by an *Aphanizomenon* bloom in Lake Kinneret. *J PLANKTON RES* 19 (5): 577-586.

- Berman, T.** (2001) The role of DON and the effect of N : P ratios on occurrence of cyanobacterial blooms: Implications from the outgrowth of *Aphanizomenon* in Lake Kinneret. *LIMNOL OCEANOGR* 46 (2): 443-447.
- Block, M.A. and Grossman, A.R.** (1988) Identification and purification of a derepressible alkaline phosphatase from *Anacystis nidulans* R-2. *PLANT PHYSIOL* 86 (4): 1179-1184.
- Bockholt, R., Masepohl, B. and Pistorius, E.K.** (1991) Insertional inactivation of the *psbO* gene encoding the manganese stabilizing protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Effect of photosynthetic water oxidation and L-amino acid oxidase activity. *FEBS LETT* 294: 59-63.
- Bogdanova, N. and Hell, R.** (1997) Cysteine synthesis in plants. Protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLANT PHYSIOL* 118: 1337-1344.
- Boussiba, S. and Richmond, A.E.** (1980) C-phycoerythrin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *ARCH MICROBIOL* 125: 143-147.
- Boussiba, S., Dilling, W. and Gibson, J.** (1984a) Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2. *J BACTERIOL* 160: 204-210.
- Boussiba, S., Resch, C.M. and Gibson, J.** (1984b) Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. *ARCH MICROBIOL* 138: 287-292.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *ANAL BIOCHEM* 72: 248-254.
- Bryant, D.A.** (1994) The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 879.
- Burgoyne, D.L., Hemscheidt, T.K., Moore, R.E. and Runnegar, M.T.C.** (2000) Biosynthesis of cylindrospermopsin. *J ORG CHEM* 65 (1): 152-156.
- Candau, P.** (1979) Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. PhD Thesis, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Cardemil, L. and Wolk, C.P.** (1981) Polysaccharids from the envelope of heterocysts and spores of the blue green algae *Anabaena variabilis* and *Cylindrospermum licheniforme*. *J PHYCOL* 17: 234-240.
- Carmichael, W.W.** (1989) Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In: C.L. Ownby and G.V. Odell (eds): Natural toxins. Pergamon Press, Oxford/New York. 3-16.
- Carmichael, W.W.** (1992) Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J APPL BACTERIOL* 72: 445-459.
- Carmichael, W.W.** (1994) The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 64-72.
- Chávez, S. and Candau, P.** (1992) An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria. Identification and properties. *FEBS LETT* 285: 35-38.
- Chen, M.** (1974) Kinetics of phosphorus absorption by *Corynebacterium bovis*. *MICROB ECOL* 1: 164-175.
- Cheng, K.J., Ingram, J.M. and Costerton, J.W.** (1971) Interaction of alkaline phosphatase and the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *J BACTERIOL* 107: 325-336.

- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M. J., Norris, R.L., Seawright, A.A. and Moore, M.R.** (1999) Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. ENVIRON TOXICOL 14 (1): 155-161.
- Chorus, I. and Bartram, J.** (1999) Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon London.
- Clark, J.E., Beegen, H. and Wood, H.G.** (1986) Isolation of Intact Chains of Polyphosphate from *Propionibacterium shermanii* Grown on Glucose or Lactate. J BACTERIOL 168: 1212-1219.
- Cohen-Bazire, G. and Bryant, D.A.** (1982) Phycobilisoms; Comparison and structure. In: N.G. Carr and B.A. Whitton (eds): The Biology of cyanobacteria. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 143-190.
- Coleman, J.E. and Gettins, P.** (1983) Alkaline phosphatase, solution structure and mechanism. In: Meister, A. (Ed): Advances in enzymology 55: 381-452.
- Collier, J.L. and Grossman, A.R.** (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. J BACTERIOL 174: 4718-4726.
- Cooper, T.G.** (1977) Tools of Biochemistry. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto. 55-56.
- Costerton, J.W., Ingram, J.M. and Cheng, K.J.** (1974) Structure and function of the cell envelope of Gram negative bacteria. BACTERIOL REV 38: 87-110.
- Dean, D.R., Bolin, J.T. and Zheng, L.** (1993) Nitrogenase metalloclusters: Structure, organization and synthesis. J BACTERIOL 175: 6737-6744.
- DeMarsac, N.T. and Houmard, J.** (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli – new steps toward molecular mechanisms. FEMS MICROBIOL REV 104 (1-2): 119-189.
- Donan, B.B. and Jensen, T.E.** (1977) Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the blue-green bacterium *Plectonema boryanum*. J BACTERIOL 132: 967-973.
- Droux, M., Ruffet, M.L., Douce, R. and Job, D.** (1998) Interactions between serine acetyltransferase and *O*-acetylserine(thiol)lyase in higher plants – structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. EUR J BIOCHEM 255: 7253-7257.
- Elhai, J. and Wolk, C.P.** (1990) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. EMBIO J 9: 3379-3388.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J-M., Tiwari, D.N. and Wolk, C.P.** (1992) Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. J BACTERIOL 174: 6025-6032.
- Fabbro, L., Baker, M., Duivenvoorden, L., Pegg, G. and Shiel, R.** (2001) The effects of the ciliate *Paramecium* cf. *caudatum* Ehrenberg on toxin producing

- Cylindrospermopsis* isolated from the Fitzroy River, Australia. ENVIRON TOXICOL 16 (6): 489-497.
- Fay, P. and Van Baalen, C.** (eds) (1987) The Cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam, 534.
- Fay, P.** (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. MICROBIOL REV 56: 178-191.
- Falconer, I.R.** (1993) Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer, G.J. and Hawkins, P.R.** (1999) Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. ENVIRON TOXICOL 14 (1): 143-150.
- Fergusson, K.M. and Saint, C.P.** (2003) Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria ENVIRON TOXICOL 18 (2): 120-125.
- Fernley, H.N.** (1971) Mammalian alkaline phosphatases. In: The Enzymes, Vol. 4, 417-447.
- Fitzgerald, G.P. (1969)** Field and laboratory evaluations of bioassays for nitrogen and phosphorus with algae and aquatic weeds. LIMNOL OCEANOGR 14: 206-212.
- Florencio, F.J., Marqués, S. and Candau, P.** (1987) Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. FEBS LETT 223: 37-41.
- Flores, E., Guerrero, M.G. and Losada, M.** (1980) Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. ARCH MICROBIOL 128: 137-144.
- Flores, E., Ramos, J.L., Herrero, A. and Guerrero, M.G.** (1983) Nitrate assimilation by cyanobacteria. In: G.C. Papageorgiou and L. Packer (eds): Photosynthetic Prokaryotes: Cell Differentiation and Function. Elsevier, New York. 363-387.
- Flores, E., Herrero, A. and Guerrero, M.G.** (1987) Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 896: 103-108.
- Flores, E. and Herrero, A.** (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: D.A. Bryant (ed) The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 489.
- Froscio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C. and Falconer, I.R.** (2003) Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. ENVIRON TOXICOL 18 (4): 243-251.
- Gershoni, J.M., Davis, F.E. and Palade, G.E.** (1985) Protein blotting in uniform or gradient electric fields. ANAL BIOCHEM 144: 32-40.

- Gkelis, S., Moustaka-Gouni, M., Sivonen, K. and Lamas, T.** (2005) First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. *J PLANKTON RES* 27 (12): 1295-1300.
- Gophen, M., Smith, V.H., Nishri, A. and Threlkeld, S.T.** (1999) Nitrogen deficiency, phosphorus sufficiency, and the invasion of Lake Kinneret, Israel, by the N₂-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *AQUAT SCI* 61 (4): 293-306.
- Govezensky, D., Greener, T., Segal, G. and Zamir, A.** (1991) Involvement of GroEL in *nif* gene regulation and nitrogenase assembly. *J BACTERIOL* 173 (20): 6339-6346.
- Hadas, O., Pinkas, R., Delphine, E., Vardi, A., Kaplan, A. and Sukenik, A.** (1999) Limnological and ecophysiological aspects of *Aphanizomenon ovalisporum* bloom in Lake Kinneret, Israel. *J PLANKTON RES* 21 (8): 1439-1453.
- Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. and Terao, K.** (1994) Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *TOXICON* 32: 73-84.
- Harada, K., Kondo, F. and Lawton, L.** (1999) Laboratory analysis of Cyanotoxins. In: I. Chorus and J. Bartram (eds): *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E & FN Spon, London and New York. 369-405.
- Haselkorn, R. and Buikema, W.J.** (1992) Nitrogen fixation in cyanobacteria. In: G. Stacy, R.H. Burris and H.J. Evans (eds) *Biological Nitrogen Fixation.* Chapman and Hall, New York. 166-190.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B. and Falconer, I.R.** (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 50: 1292-1295.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R. and Falconer, I R.** (1997) Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *TOXICON* 35, 341-346.
- Healey, F.P.** (1977) Ammonium and urea uptake by some freshwater algae. *CAN J BOT* 55: 61-69.
- Healey, F.P.** (1982) Phosphate. In: N.G. Carr and B.A. Whitton (eds): *The Biology of cyanobacteria.* Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 105-124.
- Healey, F.P. and Hendzel, L.L.** (1975) Effects of phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. *J PHYCOL* 11: 303-309.
- Heintzelman, G.R., Weinreb, S.M. and Parvez, M.** (1996) Imino Diels-Alder-based construction of a piperidine A-ring unit for total synthesis of the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. *J ORG CHEM* 61 (14): 4594-4599.
- Heintzelman, G.R., Fang, W.K. Keen, S.P., Wallace, G.A. and Weinreb, S.M.** (2001) Stereoselective total synthesis of the cyanobacterial hepatotoxin 7-epicylindrospermopsin: Revision of the stereochemistry of cylindrospermopsin. *J AM CHEM SOC* 123 (36): 8851-8853.

- Heintzelman, G.R., Fang, W.K., Keen, S.P., Wallace, G.A. and Weinreb, S.M.** (2002) Stereoselective total syntheses and reassignment of stereochemistry of the Freshwater cyanobacterial hepatotoxins cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin J AM CHEM SOC 124 (15): 3939-3945.
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J. and Moestrup, O.** (1997) Detection of an anatoxin-a(S)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. TOXICON 35: 901-913.
- Hindák, F.** (2000) Morphological variation of four planktic nostocalean cyanophytes – members of the genus *Aphanizomenon* or *Anabaena*? HYDROBIOL 438: 107-116.
- Hoare, D.S., Hoare, S.L. and Moore, R.B.** (1967) The photoassimilation of organic compounds by autotrophic blue-green algae. J GEN MICROBIOL 49: 351-370.
- Hortobágyi, T.** (1962) Két vízvirágzás a Balatonon. BOTANIKAI KÖZLEMÉNYEK 49: 233-237.
- Ihlenfeldt, M.J.A. and Gibson, J.** (1975) Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). ARCH MICROBIOL 102: 23-28.
- Jensen, T.E. and Sicko, L.M.** (1974) Phosphate metabolism in blue-green algae. I. Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. CAN J MICROBIOL 9: 1235-1239.
- Jeong, H-S. and Jouanneau, Y.** (2000) Enhanced nitrogenase activity in strains of *Rhodobacter capsulatus* that overexpress the *rfn* genes. J BACTERIOL 182 (5): 1208-1214.
- Jones, G.J. and Orr, P.T.** (1994) Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibitory assay. WAT RES 28: 871-876.
- Jones, G.J., Bourne, D.G., Blakeley, R.L. and Doelle, H.** (1994) Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. NAT TOXINS 2 (4): 228-235.
- Kankaanpää, H.T., Holliday, J., Schroder, H., Goddard, T.J., von Fister, R. and Carmichael, W.W.** (2005) Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia - a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. TOXICOL APPL PHARM 203 (3): 243-256.
- Kapp, R., Stevens, S.E. and Fox, J.L.** (1975) A survey of available nitrogen sources for the growth of the blue-green alga *Agmenellum quadruplicatum*. ARCH MICROBIOL 104: 135-138.
- Ke, B., Fang, Z-X, Lu, R-Z, Calvert, H.E. and Dolan, E.** (1983) The presence of phycobilisomes in heterocysts of *Anabaena variabilis*. PHOTOBIOCHEM PHOTOBIOPHYS 6: 25-31.
- Keleti, G. and Sykora, J.L.** (1982) Production and properties of Cyanobacterial endotoxins. APPL ENVIRON MICROBIOL 43: 104-109.

- Kellmann, R., Mills, T. and Neilan, B.A.** (2006) Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J MOL EVOL* 62 (3): 267-280.
- Kim, H., Harai, M.Y., Hayashi, H. Chino, M., Naito, S. and Fujiwara, T.** (1999) Role of *O*-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed storage-protein gene by sulfur and nitrogen nutrition. *PLANTA* 209: 282-289.
- Kiss, T., Vehovszky, A., Hiripi, L., Kovács, A. and Vörös, L.** (2002) Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *COMP BIOCHEM PHYS C* 131 (2): 167-176.
- Komárek, J.** (1958) Die taxonomische Revisio der planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei. In: J. Komárek, H. Ettl (eds) *Algologische Studien*. Naklad, CSAV, Praha. 10-206.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *NATURE* 227: 680 -685.
- Lappartient, A.G. and Touraine, B.** (1996) Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. *PLANT PHYSIOL* 111: 147-157.
- Laudenbach, D.E., Ehrhardt, D., Green, L. and Grossman, A.** (1991) Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. *J BACTERIOL* 173: 2739-2750.
- Lawrie, A.C., Codd, G.A. and Stewart, W.D.P.** (1976) The incorporation of nitrogen into products of recent photosynthesis in *Anabaena cylindrica* Lemm. *ARCH MICROBIOL* 107: 15-24.
- Lawry, N.H. and Jensen, T.E.** (1979) Deposition of condensed phosphate as an effect of varying sulfur deficiency in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. (*Anacystis nidulans*). *ARCH MICROBIOL* 12: 1-7.
- Lawry, N.H. and Simon, R.D.** (1982) The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae. *J PHYCOL* 18: 391-399.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K. and Watanabe, M.M.** (2001) Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *TOXICON* 39 (7): 973-980.
- Lin, C.K.** (1974) Review on phosphorus and algal growth in relation to eutrophication. *Quarterly Journal of the Taiwan Museum* vol. 27: 135-151.
- Lindholm, T. and Meriluoto J.A.O.** (1991) Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 1629-1634.
- Looper, R.E. and Williams, R.M.** (2004) A concise asymmetric synthesis of the marine hepatotoxin 7-epicylindrospermopsin. *ANGEW CHEM INT EDIT* 43 (22): 2930-2933.

- MacAlister, T.J., Irvin, R.T. and Costerton, J.W.** (1977) Cell surface-localized alkaline phosphatase of *Escherichia coli* as visualized by reaction product deposition and ferritin-labelled antibodies. *J BACTERIOL* 130: 318-328.
- Madueno, F., Flores, E. and Guerrero, M.G.** (1987) Competition between nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 896: 109-112.
- Martínez-Bilbao, M., Martínez, A., Urkijo, I., Llama, M.J. and Serra, J.L.** (1988) Induction, isolation and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J BACTERIOL* 170: 4897-4902.
- Martín-Nieto, J., Herrero, A. and Flores, E.** (1989) Regulation of nitrate and nitrite reductases in dinitrogen-fixing cyanobacteria and Nif mutants. *ARCH. MICROBIOL* 151: 475-478.
- Martín-Nieto, J., Flores, E. and Herrero, A.** (1990) Mutants of *Anabaena variabilis* requiring high levels of molybdate for nitrate reductase and nitrogenase activities. *FEMS MICROBIOL LETT* 67: 1-4.
- Martín-Nieto, J., Flores, E. and Herrero, A.** (1992) Biphasic kinetic behavior of nitrate reductase from heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacteria. *PLANT PHYSIOL* 100: 157-163.
- Meeks, J.C., Wolk, C.P., Thomas, J., Lockau, W., Shaffer, P.W., Austin, S.M., Chien, W.S. and Galonsky, A.** (1977) The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J BIOL CHEM* 252: 7894-7900.
- Menon, V.K.N. and Varma, A.K.** (1978) Adenosine 5'-triphosphate sulphurilase from *Spirulina platensis*. *EXPERIENTIA* 35: 854-855.
- Metcalfe, M.S., Barakate, A. and Codd, G.A.** (2004) Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *FEMS MICROBIOL LETT* 235 (1): 125-129.
- Mikami, B. and Ida, S.** (1984) Purification and properties of ferredoxin - nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 791: 294-304.
- Mishra, D. and Schmidt, A.** (1992) Regulation and partly purification of the ATP-sulfurylase from cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *Z NATURFORSCH* 47C: 950-101.
- Miyaji, T. and Tamura, G.** (1992) Isolation and partial characterization of homogeneous nitrite reductase from a cyanobacterium *Aphanothece sacrum*. *BIOSCI BIOTECH BIOCHEM* 56: 1333-1334.
- Moore, D., O'Donohue, M., Shaw, G. and Critchley, C.** (2003) Potential triggers for akinete differentiation in an Australian strain of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (AWT 205/1) *HYDROBIOLOGIA* 506 (1-3): 175-180.
- Moore, D., O'Donohue, M., Garnett, C., Critchley, C. and Shaw, G.** (2005) Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) *FRESHWATER BIOLOGY* 50 (2): 345-352.

- Murry, M.A. and Wolk, C.P.** (1989) Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *ARCH MICROBIOL* 151: 469-474.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Torokne, A. and Burns, B.P.** (2003) Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *MOL ECOL* 12: 133-140.
- Neilson, A.H. and Doudoroff, M.** (1973) Ammonia assimilation in blue-green algae. *ARCH MICROBIOL* 89: 15-22.
- Neilson, A.H. and Larsson, T.** (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: Physiological aspects. *PHYSIOL PLANT* 48: 542-543.
- Nierzwicki-Bauer, S.A., Balkwill, D.L. and Stevens, S.E.** (1984) Heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J BACTERIOL* 157: 514-525.
- Ninh, N.H.** (1985) Inorganic phosphorous metabolism of *Anabaena* sp. PCC 7120, a cyanobacterium. Candidate Thesis. Institute of Plant Physiology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Szeged. 17.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.K., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seewright, A.A. and Moore, M.R.** (1999) Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *ENVIRON TOXICOL* 14 (1): 163-165.
- Nogueira, I.C.G., Saker, M.L., Pflugmacher, S., Wiegand, C. and Vasconcelos, V.M.** (2004) Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis radborskii* to *Daphnia magna*. *ENVIRON TOXICOL* 19 (5): 453-459.
- Ohmori, M., Ohmori, K. and Strotmann, H.** (1977) Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *ARCH MICROBIOL* 114: 225-229.
- Ohtani, I., Moore, R.E. and Runnegar, M.T.C.** (1992) Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J AM CHEM SOC* 114: 7941-7942.
- Olli, K., Kangro, K., Kabel, M.** (2005) Akinete production of *Anabaena lemmermannii* and *Anabaena cylindrica* (Cyanophyceae) in natural populations of N- and P-limited coastal mesocosms. *J PHYCOL* 41 (6): 1094-1098.
- Omata, T., Ohmori, M., Arai, N. and Ogawa, T.** (1989) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. *PROC NATL ACAD SCI USA* 86: 6612-6616.
- Omata, T., Andriessse, X. and Hirano, A.** (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *MOL GEN GENET* 236: 193-202.
- Ormerod, J.G.** (1992) Physiology of the photosynthetic procaryotes. In: N.H. Mann and N.G. Carr (eds): *Photosynthetic Procaryotes*. Plenum press, New York. 93-120.
- Orr, P.T. and Jones, G. J.** (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures *LIMNOL OCEANOGR* 43 (7): 1604-1614.

- Ortega-Calvo, J.J. and Stal, L.J.** (1994) Sulphate-limited growth in the N₂-fixing unicellular cyanobacterium *Gleothoece* (Nägeli) PCC 6909. NEW PHYTOL 128: 273-281.
- Padisák, J.** (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. ARCH HYDROBIOL/SUPPL 107: 563-593.
- Peterson, R.B., Dolan, E., Calvert, H.E. and Ke, B.** (1981) Energy transfer from phycobiliproteins to Photosystem I in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 634: 237-248.
- Pollinger, U., Hadas, O., Yacobi, Y.Z., Zohary, T. and Berman, T.** (1998) *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in Lake Kinneret, Israel. J PLANKTON RES 20 (7): 1321-1339.
- Porat, R., Teltsch, B., Dubinsky, Z. and Walsby, A.E.** (2000) Effects of light and pressure on gas vesicle and buoyancy in *Aphanizomenon ovalisporum* Forti (Cyanobacteria) from Lake Kinneret, Israel. ARCH HYDROBIOL SPEC ISSUES ADVANC LIMNOL 55: 333-348.
- Preussel, K., Stuken, A., Wiedner, C., Chorus, I. and Fastner, J.** (2006) First report of cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. TOXICON 47 (2): 156-162.
- Reid, T.W. and Wilson, I.B.** (1971) *E. coli* alkaline phosphatase. In: The Enzymes, Vol.4: 373-415.
- Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M. and Sukenik, A.** (2004) The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. TOX SCIE 82 (2): 620-627.
- Reynolds, C.S. and Walsby, A.E.** (1975) Water-blooms. BIOL REV 50: 437-481.
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A. and Thomas, J.-C.** (2001) Nitrogen and sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. J BACTERIOL 183: 2989-2994.
- Rippka, R. and Waterbury J.B.** (1977) The synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. FEMS MICROBIOL LETT 2: 83-86.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y.** (1979) Generic assignment, strain histories and properties of cultures of cyanobacteria. J GEN MICROBIOL 111: 1-61.
- Rodríguez, R., Lara, C. and Guerrero, M.G.** (1992) Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R-2. Kinetic and energetic aspects. BIOCHEM J 282: 639-643.
- Runnegar, M.T.C. and Lu, S.C.** (1994) The role of glutathione (GSH) in the hepatotoxicity caused by the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin (CY). FASEB J 8 (4): A419-A419.
- Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z. and Lu, S.C.** (1994) The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. BIOCHEM BIOPH RES CO 201 (1): 235-241.

- Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Lu, S.C. and Ge, J.L.** (1995) Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *BIOCHEM PHARMACOL* 49 (2): 219-225.
- Saker, M.L. and Eaglesham, G.K.** (1999) The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *TOXICON* 37 (7): 1065-1077.
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A. and Vasconcelos, V.M.** (2004) Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *TOXICON* 43 (2): 185-194.
- Sarma, T.A. and Khattar, J.I.S.** (1992) Phosphorous deficiency, nitrogen assimilation and akinete differentiation in the cyanobacterium *Anabaena torulosa*. *FOLIA MICROBIOL* 37 (3): 223-226.
- Sarma, T.A., Ahuja, G. and Khattar, J.I.S.** (2004) Nutrient stress causes akinete differentiation in cyanobacterium *Anabaena torulosa* with concomitant increase in nitrogen reserve substances *FOLIA MICROBIOL* 49 (5): 557-561.
- Sawhney, S.K. and Nicholas, D.J.D.** (1977) Effects of adenine nucleotides and phosphate on adenosine triphosphate sulphurylase from *Anabaena cylindrica*. *BIOCHEM J* 164, 161-167.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A. and Saint, C.P.** (2001) Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *ENVIRON TOXICOL* 16 (5): 413-421.
- Schmidt, A. and Christen, U.** (1978) A factor-dependent sulfotransferase specific for 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *PLANTA* 140: 239-244.
- Schmidt, A., Erdle, I. and Kost, H.-P.** (1982) Changes of C-phycocyanin in *Synechococcus* 6301 in relation to growth on various sulfur compounds. *Z NATURFORSCH SECT C* 37: 870-876.
- Schuddemat, J., de Boo, R., van Leeuwen, C.C.M., van den Broek, P.J.A. and van Steveninck, J.** (1988) Polyphosphate synthesis in yeast. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1010: 191-198.
- Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe W. and Shawet G.** (2007) First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) Speziale and Dyck. *HARMFUL ALGAE* 6 (1): 73-80.
- Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R. and Kaplan, A.** (2002) A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* *FEMS MICROBIOL LETT* 209 (1): 87-91.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K. and Moore, M.R.** (1999) Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon*

- ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. ENVIRON TOXICOL 14 (1): 167-177.
- Shen, X.Y., Lam, P.K.S., Shaw, G.R. and Wickramasinghe, W.** (2002) Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. TOXICON 40 (10): 1499-1501.
- Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, L. and Rinehart, K.L.** (1992) Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. APPL ENVIRON MICROBIOL 58: 1321-1325.
- Sivonen, K., Namikoshi, M., Luukkainen, L., Färdig, M., Rouhiainen, L., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., and Niemelä, S.I.** (1995) Variation of cyanobacterial hepatotoxins in Finland. In: M. Munawar and M. Luotola (eds): The contaminants in the Nordic ecosystem: dynamics, processes and fate. Ecovision World Monograph Series. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands. 163-169.
- Sivonen, K. and Jones, G.** (1999) Chapter 3, Cyanobacterial toxins. In: I. Chorus and J. Bertram (eds): Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. E & FN Spon, London and New York. 41-111.
- Skulberg, O.M, Carmichael, W.W., Codd, G.A. and Skulberg, R.** (1993) Taxonomy of toxic *Cyanophyceae* (Cyanobacteria). In: I.R. Falkoner (ed): Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, London, Toronto. 145-164.
- Smith, R.L., Van Baalen, C. and Tabita, R.** (1988) Isolation of Metabolically Active Heterocysts from Cyanobacteria. In: Methods in Enzymology 167: 490-495.
- Snider, B.B. and Harvey, T.C.** (1995) Synthesis of a bicyclic model for the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. TETRAHEDRON LETT 36 (26): 4587-4590.
- Snider, B.B. and Xie, C.Y.** (1998) Model studies for the synthesis of the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. Preparation of a bicyclic guanidine with the hydroxymethyluracil side chain. TETRAHEDRON LETT 39 (39): 7021-7024.
- Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A. and Meriluoto J.** (2006) First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). ENVIRON TOXICOL 21 (6): 552-560.
- Stanier, R.Y. and Cohen-Bazire, G.:** (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. ANNU REV MICROBIOL 31: 225-274.
- Stevens, S.E., Nierzwicki-Bauer, S.A. and Balkwill, D.L.** (1985) Effect of nitrogen starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. J BACTERIOL 161: 1215-1218.

- Stolte, W., Karlsson, C., Carlsson, P. and Granéli, E.** (2002) Modeling the increase of nodularin content in Baltic Sea *Nodularia spumigena* during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures FEMS MICROBIOL ECOL 41 (3): 211-220.
- Szalai, I.** (1994) A növények élete. JATEpress, Szeged, 1994. I. kötet, 362-363.
- Thiel, T., Hartnett, T. and Pakrasi, H.B.** (1990) Examination of Photosystem II in heterocysts of the cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC 29150. In: M. Murata (Ed): Current Research in Photosynthesis, Kulwer, Dordrecht. Vol 1, 291-294.
- Thomas, J.** (1970) Absence of the pigments of Photosystem II of photosynthesis in heterocysts of blue-green alga. NATURE 228: 181-183.
- Towbin, H. and Gordon, J.** (1984) Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. J IMMUNOL METHODS 72 313-340.
- Van der Westhuizen, A.J. and Eloff, J.N.** (1983) Effect of culture age and pH of medium on the growth and toxicity of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Z PFLANZENPHYSIOL 110: 157-163.
- Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, Gy., Batta, Gy., Gyémánt, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Grigorszky, I., Molnár, E. and Borbély, Gy.** (2002) Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by plant test (Blue-Green Sinapis Test) ANAL BIOCHEM 302: 95-103.
- Vezeboer, R.M.A., Baker, P.D., Rositano, J., Heresztyn, T., Codd, G.A. and Ragget, S.L.** (2000) Geographical patterns of occurrence and composition of saxitoxins in the cyanobacterial genus *Anabaena* (Nostocales, Cyanophyta) in Australia. PHYCOLOGIA 39 (5): 395-407.
- Wanner, G., Henkelmann, G., Schmidt, A. and Köst, H.P.** (1986) Nitrogen and sulfur starvation of cyanobacterium *Synechococcus* 6301. An ultrastructural, morphometrical and biochemical comparison. Z NATURFORSCH 41C: 741-750.
- Weise, G., Drews, G., Jann, B. and Jann, K.** (1970) Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. ARCH MICROBIOL 71 (1): 89-98.
- Wetzel, B.K., Spicer, S.S., Dvorak, H.F. and Heppel, L.A.** (1970) Cytochemical localization of certain phosphatases in *Escherichia coli*. J BACTERIOL 104: 529-542.
- White, J.D. and Hansen, J.D.** (2000) Approach to the total synthesis of cylindrospermopsin. ABSTR PAP AM CHEM S 219: 812-ORGN Part 2.
- White, J.D. and Hansen, J.D.** (2005) Total synthesis of (-)-7-epicylindrospermopsin, a toxic metabolite of the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*, and assignment of its absolute configuration J ORG CHEM 70 (6): 1963-1977.
- Whitton, B.A.** (2002) Phylum Cyanophyta. In: D.M. John, B.A. Whitton and A.J. Brook (eds) The freshwater algal flora of the British Isles. University Press, Cambridge. 94.

- Wilcox, M., Mitchison, G.J. and Smith, R.J.** (1973) Pattern formation in the blue-green alga, *Anabaena*. II. Controlled proheterocyst regression. J CELL SCI 13: 637-649.
- Wolk, C.P., Thomas, J., Shaffer, P.W., Austin, S.M., and Galonsky, A.** (1976) Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. J BIOL CHEM 251: 5027-5034.
- Wolk, C.P.** (1982) Heterocysts. In: N.G. Carr and B.A. Whitton (eds): The Biology of Cyanobacteria. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 359-386.
- Xie, C.Y., Runnegar, M.T.C. and Snider, B.B.** (2000) Total synthesis of (+/-)-cylindrospermopsin. J AM CHEM SOC 122 (21): 5017-5024.

9. BÁCSI ISTVÁN TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK JEGYZÉKE

9.1. Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Tóth Sz., Borbély Gy. (2003) Az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium periplazmatikus alkalikus foszfatázának vizsgálata foszforéhezés körülményei között. HIDR KÖZL 84. (5-6): 17-19.

Tóth E., Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Máthé Cs., **Bácsi I.**, Borbély Gy. (2003) Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztin tartalmának meghatározása. HIDR KÖZL 84. (5-6): 166-167.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Tóth Sz., Borbély Gy. (2004) A kénéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium növekedésére és ATP-szulfuriláz aktivitására. HIDR KÖZL 85. (6): 15-17.

Grigorszky, I., Kiss, K.T., Béres, V., **Bácsi I.**, M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Vasas, G., Padisák, J., Borics, G., Gligora, M. and Borbély, Gy. (2006) The effects of temperature, nitrogen, and phosphorus on the encystment of *Peridinium cinctum*, Stein (Dinophyta). HIDROBIOL (563): 527-535.

Bácsi, I., Vasas, G., Surányi, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Tóth, E., Grigorszky I., Gáspár, A., Tóth, Sz., Borbély, Gy. (2006) Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate or phosphate starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. FEMS MICROBIOL LETT (259): 303-310.

9.2. Egyéb megjelent, vagy közlésre elfogadott közlemények

Máthé Cs., M-Hamvas M., Vigvári T., Surányi Gy., Vasas G., **Bácsi I.**, Tóth E., Borbély Gy. (2003) Mikrocisztin-LR-el kezelt, kalluszból regenerált „mini” nádnövények szövettani vizsgálata. *HIDR KÖZL* 84. (5-6): 77-78.

M-Hamvas M., Helgert T., Vasas G., Máthé Cs., Tóth E., Vigvári T., **Bácsi I.**, Surányi Gy., Borbély Gy. (2003) A mikrocisztin-LR és a cilindropermopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. *HIDR KÖZL* 84. (5-6): 74-76.

Vigvári T., M-Hamvas M., Máthé Cs., Vasas G., Tóth E., Surányi Gy., **Bácsi I.**, Borbély Gy. (2003) A fenilalanin-ammónia liáz enzim aktivitásának változása mikrocisztin-LR-el (cianotoxin) kezelt regenerált nád növényekben. *HIDR KÖZL* 84, (5-6): 170-171.

Béres, V., **Bácsi I.**, Grigorszky, I., Schnitchen, Cs. and Borbély, Gy. (2004) Factors controlling the encystment a dinoflagellata species (*Peridinium cinctum*, Stein). *VERH INT VER LIMNOL* 235-238.

Béres V., **Bácsi I.**, Schnitchen Cs., (2004) A *Peridinium cinctum* (Dinophyta) cisztaképzését befolyásoló tényezők. *HIDR KÖZL* 85, (6) 20-22.

9.3. Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

Vasas G., **Bácsi I.**, Surányi G., M-Hamvas M., Máthé C., Grigorszky I., Molnár E., Borbély G. (2001) The effect of phosphorus starvation on the cilindropermopsin content and alkaline phosphatase activity of *Aphanisomenon ovalisporum*. *Plankton Symposium, Espinho, Portugal, 20-21. September, 2001*. Poszter.

Vasas G., Gáspár A., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., **Bácsi I.**, Borbély Gy. (2002) Cianotoxin vizsgálata Magyarországon izolált cianobaktériumokban. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2002. Október 2-4.* Poszter.

Vasas G., Gáspár A., Surányi Gy., Batta Gy., Gyémánt Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Grigorszky I., **Bácsi I.**, Borbély G. (2003) Capillary Electrophoretic Assay and Purification of Cyindrospermopsin, a Cyanobacterial Toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by Plant Test (Blue Green Sinapis Test). *5th Balaton Symposium, Siófok, Hungary, 3-5. September, 2003.* Poszter.

Tóth E., Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Máthé Cs., **Bácsi I.**, Borbély Gy. (2003) Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztin tartalmának meghatározása. *XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3.* Poszter.

Vasas G., Gáspár A., Tóth Sz., **Bácsi I.**, M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Surányi Gy., Borbély Gy. (2003) Cianobakteriális toxinok (anatoxin-a, cilindrospermopszin, mikrocisztin-LR) együttes analízise kapilláris elektroforézissel. *XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3.* Poszter.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Tóth Sz., Borbély Gy. (2003) Az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium periplazmatikus alkalikus foszfatázának vizsgálata foszforéhezés körülményei között. *XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3.* Poszterelőadás.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth E., Tóth Sz., Borbély Gy. (2004) A kénéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium növekedésére és ATP-szulfuriláz aktivitására. *XLVI. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. október 6-8.* Poszterelőadás.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth Sz., Borbély Gy. (2006) A kén- és a foszforéhezés hatása az

Aphanizomenon ovalisporum cianobaktérium cilindropermopszin termelésére. XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6. Poszterelőadás.

9.4. Egyéb előadások és poszterek

Máthé Cs., M-Hamvas M., Vigvári T., Surányi Gy., Vasas G., **Bácsi I.**, Tóth E., Borbély Gy. (2003) Mikrocisztin LR-el kezelt, kalluszból regenerált „mini” nádnövények szövettani vizsgálata. XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3. Poszter.

M-Hamvas M., Helgert T., Vasas G., Máthé Cs., Tóth E., Vigvári T., **Bácsi I.**, Surányi Gy., Borbély Gy. (2003) A mikrocisztin-LR és a cilindropermopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3. Poszter.

Vigvári T., M-Hamvas M., Máthé Cs., Vasas G., Tóth E., Surányi Gy., **Bácsi I.**, Borbély Gy. (2003) A fenilalanin-ammónia liáz enzim aktivitásának változása mikrocisztin-LR-el (cianotoxin) kezelt regenerált nád növényekben. XLV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2003. október 1-3. Poszter.

Béres, V., **Bácsi I.**, Grigorszky, I., Schnitchen, Cs. and Borbély, Gy. (2004) Factors controlling the encystment a dinoflagellata species (*Peridinium cinctum*, Stein). XXIX SIL International Congress of Limnology, Lahti, Finland, 8-14. August, 2004. Poszter.

Béres V., **Bácsi I.**, Schnitchen Cs., (2004) A *Peridinium cinctum* (Dinophyta) cisztaképzését befolyásoló tényezők. XLVI. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. október 6-8. Poszter.

Béres, V., **Bácsi I.**, Surányi, Gy., Vasas, G., M-Hamvas, M., Tóth, Sz., Máthé, Cs., Kiss, K.T., Borbély, Gy. and Grigorszky, I. (2006) The interaction between *Cryptomonas ovata*, Ehrenberg (Cryptophyta) and

Microcystis aeruginosa, Kützig (Cyanobacterium) species. *The 6th International Symposium on Use of Algae for Monitoring Large Rivers, Balatonfüred, Hungary, 12-16. September, 2006.* Poszter.

Béres V., **Bácsi I.**, Surányi Gy., Vasas G., M-Hamvas M., Tóth Sz., Máthé Cs., Borbély Gy. és Grigorszky I. (2006) A *Cryptomonas ovata*, Ehrenberg (Cryptophyta) és a *Microcystis aeruginosa*, Kützig (Cyanobacterium) interakciója. *XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6.* Poszter.

Vasas G., Borics G., M-Hamvas M., Nagy L. Zs., **Bácsi I.**, Borbély Gy. (2006) *Prymnesium parvum* algavirágzás és halpusztulás a hajdúszoboszlói Öregtávon – az első toxikus eukarióta algavirágzás észlelése Magyarországról. *XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6.* Poszter.