



1949

***Microcystis* fajok toxicitásának vizsgálata terepi és
laboratóriumi körülmények között**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szerző: Ujvárosi Andrea Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor
egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2020

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Növénybiológiai és Növény-biotechnológiai programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2020. 01. 06.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Ujvárosi Andrea Zsuzsanna doktorjelölt 2015-2019 között a fent megnevezett Doktori Iskola Növénybiológiai és Növény-biotechnológiai programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2020. 01. 06.

.....
a témavezető aláírása

***Microcystis* fajok toxicitásának vizsgálata terepi és laboratóriumi
körülmények között**

**Investigation of the toxicity of *Microcystis* species under field and
laboratory conditions**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Biológia tudományágban

Írta: Ujvárosi Andrea Zsuzsanna okleveles Biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája
(Növénybiológiai és Növény-biotechnológiai programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Magura Tibor György

tagok: Dr. Bácsiné Dr. Béres Viktória

Dr. Bácsi István

A doktori szigorlat időpontja: 2019. október 18.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

Rövidítés jegyzék	1
1. Bevezetés és célkitűzések.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Cianobaktériumok és cianobakteriális vízvirágzások jellemzése.....	6
2.2. Cianobakteriális biológiailag aktív metabolitok.....	10
2.2.1. Cianotoxinok	11
2.2.2. <i>Microcystis</i> genusz biológiailag aktív metabolitjai	15
Anabaenopeptinek.....	16
Aeruginozinok.....	19
Cianopeptolinok	19
Mikroviridinek	20
Ciklamidok	20
Mikrogininek.....	21
Mikrocisztinek.....	22
2.3. Genotoxicitás jelentősége az ökotoxikológiában	26
3. Anyag és módszer	30
3.1. Terepi mintagyűjtés.....	30
3.2. Cianobakteriális tenyészetek fenntartása.....	31
3.3. Cianobakteriális kivonatok készítése	32
3.4. Toxintisztítás	33
3.4.1. Kivonat készítése.....	33
3.4.2. Anion-cserélő (DEAE-cellulóz) kromatográfia.....	34
3.4.3. Méretkizárásos kromatográfia.....	34
3.4.4. C18-flash kromatográfia.....	35
3.4.5. HPLC (Nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia).....	35
3.5. MALDI-TOF.....	36
3.6. LC-ESI-MS	36
3.7. DNS izolálása.....	37
3.8. PCR (Polimeráz láncreakció).....	38
3.9. Agaróz gélelektroforézis	40

3.10. Mustár csíranövényteszt (Blue-Green Sinapis Test, BGST).....	40
3.11. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	41
3.12. Genotoxikológiai vizsgálatok.....	41
3.12.1. HepG2 sejt kultúra fenntartása.....	41
3.13.2. MTT teszt.....	42
3.13.3. Comet assay.....	43
3.13.4. Citokinézis-blokkolt mikronukleusz (CBMN) teszt.....	44
3.13.5. DNS kettős száltörés vizsgálata γ H2AX-teszttel.....	45
4. Eredmények és értékelésük.....	47
4.1. Bárdos-tó - Terepi tanulmány.....	47
4.1.1. Cianobaktérium fajok azonosítása.....	47
4.1.2. Mikrocisztin termelésért felelős génklaszterek analízise.....	49
4.1.3. Mikrocisztin tisztítása és variánsok meghatározása.....	53
4.1.4. Mikrocisztin koncentrációk meghatározása a víztérből.....	55
4.1.5. Mikrocisztin hatása növényi rendszerekben.....	57
4.2. <i>In vitro</i> oligopeptid vizsgálatok.....	66
4.2.1. Oligopeptidek azonosítása LC-MS-sel.....	66
4.2.2. Toxintisztítás oszlopkromatográfiával.....	70
4.2.3. Mikroginin tartalmú cianobaktériális kivonatok bioaktivitása a mustár csíranövények növekedésére.....	74
4.2.4. Mikrogininek citotoxicitása HepG2 sejtvonalon.....	78
4.2.5. DNS száltörések detektálása comet és γ H2AX assay-vel.....	83
4.2.6. Kromoszóma aberrációk vizsgálata mikronukleusz teszttel.....	89
Az értekezés új tudományos eredményei.....	96
Összefoglalás.....	97
Summary.....	101
Irodalomjegyzék.....	105
Köszönetnyilvánítás.....	118
Publikációs lista.....	119

Rövidítés jegyzék

ACE – angiotenzin-konvertáló enzim
Adda – 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoiksav
Ahda – 3-amino-2-hidroxi-dekánsav
Ahoa – 3-amino-2-hidroxi-oktánsav
ANOVA – variancia analízis
APM – aminopeptidáz M
BaP – benzo(a)pirén
BNC – binukleáris sejt
CYN – cilindrospermopszin
DEAE-cellulóz – dietilaminoetil-cellulóz
DMSO – dimetil-szulfoxid
DSB – kettős száltörés
ELISA – enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
HPLC – magas teljesítményű folyadékkromatográfia
IC₅₀ – 50%-os gátló koncentráció
LAP – leucin aminopeptidáz
LC-ESI-MS – folyadékkromatográfia elektropray-ionizáció
tömegspektrometria
LMP – alacsony olvadáspontú agaróz
MALDI-TOF – mátrix segített lézerdeszorpció/ionizáció repülési idő
tömegspektrometria
MC – mikrocisztin
MG – mikroginin
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
MNeD sejt – mikronukleuszt tartalmazó sejt
MNi – mikronukleuszok
NBUD – sejtmagi rügy (bud)
NDI – citokinezis blokkolt proliferációs index (nuclear division index)
NMP – normál olvadáspontú agaróz
NPB – nukleoplazmahíd
PBS – NaCl tartalmú foszfát puffer
PP – protein foszfatáz
ROS – reaktív oxigén gyök
SSB – egyszálú törés
TFA – trifluor-ecetsav
TRIS-HCl – tris-(hidroximetil)aminometán-sósav

1. Bevezetés és célkitűzések

A cianobakteriális vízvirágzások száma az utóbbi évtizedekben világszerte megnövekedett, amelyhez a felszíni vizek eutrofizációja nagymértékben hozzájárult. Az eukarióta algák, valamint prokarióta cianobaktériumok által alkotott hatalmas fitoplankton biomassa mellett, hogy befolyásolja a víztér oldott oxigén tartalmát (hipoxiás és anoxiás viszonyokat teremt) és a víz felszínét vastagon ellepi, további szag- és színváltozást is okoz (Humbert és Fastner, 2017). Az édesvizekben megjelenő cianobakteriális tömegprodukciók során az erősen toxikus hatású szekunder metabolitok termelődése gyakori jelenség (Puschner, 2018). Kozmopolita előfordulásának köszönhetően a vízvirágzások gyakori alkotói a *Microcystis* genuszba tartozó fajok, amelyekre változatos peptid típusú bioaktív metabolitok termelése jellemző (Janssen, 2019; Riba és mtsai., 2019). A cianobakteriális toxinok közül a mikrocisztinek a legelterjedtebb peptid metabolitok, azonban egyre több olyan peptid típusú vegyületet írnak le cianobaktériumokból, amelyeket gyakran detektálnak vízvirágzások alkalmával. Ide tartoznak az aeruginozinok, anabaenopeptinek, ciklamidok, cianopeptolinok, mikroviridinek vagy mikrogininek, melyek a protein foszfataz gátló mikrocisztinektől eltérően más proteázok inhibitorai és főként tripszin, kimotripszin, elasztáz, karboxipeptidáz és aminopeptidáz inhibitor aktivitással rendelkeznek (Huisman és mtsai., 2018; Janssen, 2019). Ezen bioaktív peptid típusú metabolitok környezetben betöltött biológiai szerepe, hatásmechanizmusa, valamint termelődésük oka nem teljesen tisztázott (Dittmann és mtsai., 2015; Janssen, 2019; Yunes, 2019).

A víztérben akár több hétig perzisztáló mikrocisztin akkumulálódhat az ott élő vízi növényzet szöveteiben, továbbá a zooplankton és a gerinctelenek is képesek a mikrocisztin felvételére. Mindez jelentőséggel bír a vízi táplálkozási lánc szempontjából, és közvetve humán egészségügyi kockázattal járhat (Jia és mtsai., 2016; Pham és Utsumi, 2018). Az alámerülő és lebegő makrofita szervezetek, mint primer producensek, központi szerepet töltenek be a vízi ökoszisztémákban. Tanulmányok bizonyítják, hogy a vízi makrofíták (például *Ceratophyllum demersum*, *Eloдея canadensis*, *Vesicularia dubyana*, *Polygonum portoricensis*, *Eichhornia crassipes*, *Typha sp.* és *Hydrilla verticillata*) képesek a mikrocisztinek felvételére (Pflugmacher és mtsai., 1999; Romero-Oliva és mtsai., 2014). Természetes eutróf víztérben szintén megfigyelték, hogy a vízvirágzás során a *Ceratophyllum inflatum*, *C. demersum* és *Potamogeton maackianus* makrofíták a termelődött mikrocisztint óriási hatékonysággal vették fel (Jia és mtsai., 2016). A mikrocisztin bioakkumulációját azonban gyakran laboratóriumban beállított mérésekkel tanulmányozzák, és több olyan vizsgálatra van szükség, amely a cianotoxinok vízi növényekre a víztérben kifejtett közvetlen és környezetileg releváns hatásait kutatja.

A vízvirágzások során a mikrogininek előfordulását is megfigyelték (Carneiro és mtsai., 2012; Beversdorf és mtsai., 2017; Lodin-Friedman és Carmeli, 2018; Riba és mtsai., 2019). Cianobaktérium izolátumokban világszerte leírták a mikrogininek termelődését, azonban környezeti koncentrációját eddig egy esetben határozták meg ($\leq 2,21 \mu\text{g L}^{-1}$) eutróf környezetben (Beversdorf és mtsai., 2017). Ez a *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena fertilissima* és *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin által termelt cianopeptid csoport jellemzően cink-metalloproteáz inhibitor aktivitású, amelynek főleg angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) és

aminopeptidáz gátló aktivitása ismert, fontos szerepük lehet a gyógyszerkutatásban is (Kraft és mtsai., 2006; Chlipala és mtsai., 2011). Azonban a mikrogininek hatásmechanizmusa kevésbé ismert, toxicitásukról kevés ismeret áll rendelkezésre. Az akut toxicitást vizsgálták *Thamnocephalus platyurus* (Branchiopoda, Anostraca) és *Caenorabditis elegans* (Nematoda) lárvákon (Bober és Bialczyk, 2017; Lenz és mtsai., 2019), míg mikroginin tartalmú *Microcystis sp.* teljes kivonata *Astyanax altiparanae* (Characidae) trópusi, édesvízi hallárvákon számos fejlődésbeli rendellenességet idézett elő (Fernandes és mtsai., 2019). Mindezen megfigyelések tükrében a mikrogininek ökológiai és egészségügyi kockázatának megállapítására több *in vitro* toxikológiai vizsgálat elvégzése fontos és nélkülözhetetlen.

Munkánk során átfogó képet kaphatunk a mikrocisztinek toxicitásáról és akkumulációjáról terepi körülmények között, a szakirodalomban megtalálható toxin specifikus markerek vizsgálatával. Továbbá a témában született korábbi eredményeket is alá kívánjuk támasztani.

Ugyanakkor egy másik cianopeptid csoport, a mikrogininek biológiai szerepét és káros hatásait vizsgáljuk laboratóriumi körülmények között *in vitro* növényi és humán sejt kultúrák rendszereiben.

A következő célokat tűztük ki:

1. Terepi körülmények között a mikrocisztin termelő fajok megfigyelése és a toxintermelés dinamikájának, toxinvariabilitásának vizsgálata egy hazai eutróf víztérből három éven keresztül.
2. Extracelluláris és intracelluláris mikrocisztin tartalom meghatározása eutróf víztérből. A fitoplankton biomassa toxicitásának vizsgálata növényi tesztrendszerben.

3. A vízvirágzásnak kitett környezetből gyűjtött *Ceratophyllum submersum* vízi makrofita bioakkumulációs potenciáljának vizsgálata.
4. Laboratóriumi körülmények között fenntartott *Microcystis* izolátumok oligopeptid mintázatának vizsgálata és oligopeptid monokomponensek tisztítása kromatográfias-tömegspektrometriás módszerek segítségével.
5. *Microcystis* izolátum kivonatok növényi növekedésre kifejtett hatásának *in vitro* vizsgálata és összevetése egy mikrocisztin termelő törzsszel.
6. *Microcystis* izolátumok kivonatának és tisztított mikroginin típusú monokomponensek citotoxikológiai és genotoxikológiai hatásainak vizsgálata, elemzése és összevetése mikrocisztin-LR és cilindrospermopszin cianotoxinok hatásaival a metabolikusan aktív, humán HepG2 sejtvonalon.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Cianobaktériumok és cianobakteriális vízvirágzások jellemzése

A prokarióta cianobaktériumok megjelenése kb. 3 milliárd évvel ezelőttre datálható, amellyel fotoautotróf szervezetekként megteremtették bolygónk légkörét. Óriási biomassájuk révén hozzájárulnak a globális szén és nitrogén anyagcseréhez (Huisman és mtsai., 2018). Rendkívül változatos élőhelyeken, klímaviszonyok mellett világszerte előfordulnak. Ehhez az is hozzájárult, hogy rendkívül hatékonyan képesek a tápanyagok (N, P, Fe és nyomelemek) felvételére és tárolására (Dolman és mtsai., 2012).

Édesvizekben, brakkvizekben, és sós vízi élőhelyek planktonikus közösségeiben lebegő organizmusok, míg a bentikus fajok a folyók és állóvizek üledékein, növényeken megtapadva, vagy magasabb rendű növényekkel, gombákkal (pl. zuzmók) szimbiózisban élnek. Néhány nemzetség tagjai diatómák, szivacsok, korallok, zuzmók, páfrányok szimbiontái (endoszimbiontái), és képesek további szervezetekkel is mutualista kapcsolatot kialakítani, amely védelmet nyújt és elősegíti a tápanyag hozzáférhetőségét. Az endoszimbionta elmélet szerint az eukarióta sejtorganellek (mitokondrium, kloroplasztisz) az egysejtű prokarióták (baktériumok és archeák) szimbiózisa, bekebeleződése révén alakultak ki. A mitokondrium proteabaktériummal, míg a kloroplasztisz cianobaktériummal hozható összefüggésbe. A cianobaktériumok extrém körülmények között is életképesek: extrém meleg (hőforrások) vagy hideg (sarkkörön), valamint magas sótartalmú élőhelyeken, valamint ha szárazságnak, nitrogén éhezésnek, anaerob és fotooxidációs körülményeknek vannak kitéve (Humbert és Fastner, 2017). A környezeti feltételekhez való alkalmazkodásban szerepe van annak is, hogy rendkívül

változatos szerkezetű és hatásmechanizmusú metabolitokat termelnek. A biológiailag aktív metabolitok széles spektrumába beletartoznak a cianotoxinok, lipopeptidek, pigmentek, amidok, vitaminok, aminosavak, zsírsavak, enzimek és makrolidok (Geada és mtsai., 2017; Huang és Zimba, 2019; Janssen, 2019).

Egysejtű, telepeket képző és fonalas többsejtű morfológia jellemzi a cianobaktériumokat. Gram-negatív sejtfaluk peptidoglikán és lipopoliszacharid rétegeket tartalmaz. A sejteket egy főként poliszacharidokból (egyres törzseknél akár 20%-nál többet is kitesz a polipeptidek aránya) álló glikokalix réteg veszi körül, amely gyakran nyálka vagy kocsonyaként kap említést (Humbert és Fastner, 2017). A sejtek nem rendelkeznek sejtmaggal, mitokondriummal, endoplazmatikus retikulummal és Golgi-apparátussal. A DNS a sejtben szabadon, a citoplazmában helyezkedik el. Számos planktonikus nemzetség tagja képes a gázvakuólumaik segítségével gyors, vertikális migrációra, mely lehetővé teszi a víz mélyebb, tápanyagdúsabb rétegeiben való, ugyanakkor a felszínhez közeli, magasabb fényintenzitású életet is (Huisman és mtsai., 2018). A tilakoidok szabadon helyezkednek el a citoplazmába, és a felszínükön lévő fikobiliszómákban a fikobiliproteinek és kötőfehérjék komplexként vannak jelen. Jellemző pigmentjeik a klorofill-a és a fikobilinok: a kékes színt adó fikocianin és a pirosas színű fikoeritrin. Ezeknek a pigmenteknek alacsonyabb hullámhosszon történik az elnyelése, amely segíti a cianobaktérium alacsonyabb fényintenzitás melletti fényhasznosulását (Castenholz és Garcia-Pichel, 2013). Egyes fajok esetében más pigmentek is előfordulhatnak. A szkitonemin jellegzetes, sárgás-barna pigmentnek UV-elnyelő, védő szerepe van. Bizonyos fajoknál (pl. *Nostoc commune*) pedig UV-A/B-elnyelő

mikosporinszerű aminosavak is előfordulhatnak a külső burookban (Castenholz és Garcia-Pichel, 2013; Dolman és mtsai., 2012). Egyes csoportok speciális sejtekkel is rendelkezhetnek: heterocisztákkal képesek a légköri nitrogén fixációra, vagy akinétákkal (spóraszerű sejtek) a kedvezőtlen körülmények átvészelésére. A heterociszták főként a fonalas fajoknál fordulnak elő, a többi sejttől eltérő módon ez a sejtípus sem gázvakuólumot, sem pedig pigmenteket nem tartalmaz, és vastagabb sejtfallal rendelkezik. A nitrogén fixációjában van szerepük, megjelenésüket a nitrogén hiánya indukálja. A cianobaktériumok ivartalanul, sejtosztódással szaporodnak. A kolóniákat alkotó, és fonalas cianobaktériumok esetében a sejtek egyirányba történő osztódása révén sejtfonalak alakulnak ki, majd kisebb sejtcsoportokra válnak szét. Az egyedülálló sejtek mikroszkopikus méretűek, azonban a több sejtből álló, nyálkaburokkal körül vett kolóniák (pl. *Microcystis*) vagy a bentikus aljzaton élők (pl. *Phormidium*) szabad szemmel is egyszerűen észrevehetőek (Humbert és Fastner, 2017).

Világszerte megfigyelhető a cianobakteriális vízvirágzások előfordulása. A klímaváltozás és főként az antropogén hatásra bekövetkező szerves nitrogén és foszfor tartalmú tápanyag feldúsulása miatt felgyorsul az eutrofizáció folyamata, amely a természetes vizek primer producenseinek elszaporodásával jár (Huisman és mtsai., 2018; Yunes, 2019). A vízvirágzások gyakorisága és intenzitása növekvő tendenciát mutat. A klímaváltozás következtében a globális felmelegedés és a szélsőséges időjárási viszonyok (viharos esőzések és hosszú, száraz időszakok váltakozása) tovább fokozzák a feldúsuló tápanyagok bejutását és felvételét, illetve a keveredési folyamatok elmaradása következtében a vízterek vertikális rétegződését is (Huisman és mtsai., 2018). Az

édesvizekben a foszfor feldúsulásával a fitoplankton közösség a cianobaktériumok dominanciája felé tolódik el. Mivel sok cianobaktérium diazotróf, azaz nitrogén megkötésére képes, ezért főként a foszfor a kontrolláló tényező, a nem diazotrófok számára azonban a nitrogén is limitáló tényező lehet. Emellett a mikroelemek szerepe is fontos lehet, pl. a vas, különösen a diazotrófok számára, mivel a nitrogenáz enzim aktivitásához vas szükséges (Huisman és mtsai., 2018). A természetes fitoplankton közösségek másik befolyásoló tényezője a hőmérséklet: 20°C felett az édesvízi eukarióták száma stabilizálódik vagy elkezd csökkenni, míg számos cianobaktérium faj növekedési rátája nő. A cianobakteriális biomassza növekedése (pl. klorofill-a koncentráció mérésével) egy vízterben relatíve rövid időtartamú (néhány naptól 1-2 hétig tartó), és jellemzően egy vagy csupán néhány faj dominanciája (> 80 %) jellemző a fitoplankton közösségen belül. A biomassza mezotróf vagy kevésbé eutróf vizekben 30-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ klorofill-a-tól nagy vízvirágzásnak felel meg, míg eutróf és hipereutróf vizekben meghaladja a 300-400 $\mu\text{g L}^{-1}$ klorofill-a értéket is (Humbert és Fastner, 2017).

Az eutrofizáció kedvez a káros cianobakteriális vízvirágzások (angol kifejezéssel Cyanobacterial Harmful Algal Blooms, cyanoHABs) időszakos elszaporodásának és dominanciájának a planktonikus környezetben (Huisman és mtsai., 2018). Az egyik legfőbb egészségügyi kockázatot jelentik, ugyanis a globális vízkészletek állati és humán célú használata óriási mértékű, többek között az ivóvíz fogyasztásával, és az akvakultúrákban vagy rekreációs vizekben. A WHO (Egészségügyi Világ Szervezet) szerint neurotoxikus, hepatotoxikus, citotoxikus és dermatotoxikus hatásoknak lehetünk potenciálisan kitéve (World Health Organization, 2017).

Végezetül a bioakkumulációs vizsgálatok is rendkívül relevánsak, ugyanis a cianobakteriális vízvirágzásokban megjelenő toxinok számos közegészségügyi problémát okozhatnak. Az ivóvízben, a természetes vizek öntözővízként való felhasználásával a táplálkozásra szánt növényekben, valamint a vadon élő állatok, haszonállatok és vízi állatok szöveteiben akkumulálódhatnak. Elfogyasztásukkal, illetve nem megfelelően tisztított ivóvíz felhasználása révén végsősoron humán megbetegedéseket és/vagy halált okozhatnak (Pham és Utsumi, 2018).

2.2. Cianobakteriális biológiailag aktív metabolitok

A rendkívül változatos szerkezetű cianobakteriális szekunder metabolitok világszerte jelen vannak. Több mint 30 nemzetségből legalább 80 szerkezeti archetípust határoztak meg. A legtöbb metabolitot főleg az Oscillatoriales és Nostocales rendből, valamint a Chroococcales és Stigonematales rendből írták le, míg a Pleurocapsales rend szekunder metabolit termelése kevésbé ismert (Welker és Von Döhren, 2006). Egyes metabolitok valamilyen biológiai aktivitással bírnak, míg mások toxikusak lehetnek. Cianotoxinok általában azokat a vegyületeket nevezik, amelyek állati és humán mérgezést vagy egészségügyi kockázatot jelentenek, míg a bioaktív komponensek valamilyen antimikrobiális és/vagy citotoxikus hatásúak, és gyakran gyógyászati vagy kutatási célra alkalmasak lehetnek (Huang és Zimba, 2019).

2.2.1. Cianotoxinok

A főbb cianotoxin csoportok szerkezetük alapján a peptidek, alkaloidok és lipopoliszacharidok közé sorolhatók, ugyanakkor hatásuk alapján neurotoxinok, hepatotoxinok, citotoxinok, és gasztroenterális toxinok lehetnek (1. táblázat).

A cilindrospermopszin (CYN) főbb termelői a szubtrópusi és mérsékelt övi vizekben élnek (Moreira és mtsai., 2013; Pichardo és mtsai., 2017). Széleskörű toxicitás jellemzi, amelyben több szerv és metabolikus útvonal érintett, hatásmechanizmusa közvetlen vagy citokróm P-450 rendszer modifikációja által lehetséges. Az anatoxinokat, saxitoxinokat és a β -N-metilamino-L-alanint (BMAA) a neurotoxinok közé sorolják. Míg az anatoxin-a előfordulását világszerte jelentették, a homoanatoxin-a variánst mindeddig Japán, Írország, Svédország, Új-Zéland vizeitől írták le. Az anatoxin-a(s) szerkezete eltérő, melyet Amerika és Európa vízvirágzásaiból detektáltak (Puschner, 2018). A saxitoxinok karbamát alkaloidok, neosaxitoxin, gonyautoxon és C-toxin variánsokkal. Bénulást okozó kagylómérgeként (PSP) is ismertek, ugyanis a kagylók által akkumulált toxin fogyasztásával okozza a mérgezést. A saxitoxinokat megfigyelték Ausztrália, Új-Zéland, Kelet-Ázsia, Nyugat-Európa és az USA partjainál előforduló vízvirágzásokban (Aráoz és mtsai., 2010). A BMAA nem-proteinogén aminosav, amelyet világszerte cianobaktériumok, diatómák és dinoflagelláták termelnek tengeri, édesvízi és szárazföldi ökoszisztémákban (Cox és mtsai., 2018; Violi és mtsai., 2019). A dermatotoxinok fő képviselői a *Lyngbya sp.* által termelt lyngbyatoxinok, debromoaplysiatoxinok és aplysiatoxinok, világszerte detektáltak a trópusi, szubtrópusi és mérsékelt övi vizekben. A

cianobaktériumok Gram-negatív sejtfalának külső rétegét lipopoliszacharid alkotja, amely foszfolipid és poliszacharid molekulákból áll. Ez az endotoxin kiválthat bőrirritációt, gasztrointesztinális tüneteket, allergiás reakciókat valamint szapora légzést (Buratti és mtsai., 2017). Végezetül, a mikrocisztin (MC) és nodularin oligopeptid hepatotoxinokat a 2.2.2. alfejezetben részletezzük (2. táblázat).

1. táblázat. Főbb cianotoxin csoportok jellemzése szerkezetük, termelő fajok és hatásmechanizmusuk alapján.

Cianotoxin	Szerkezet	Termelő faj	Hatásmechanizmus	Referencia
Cilindrospermopszin	Triciklikus guanidin alkaloid	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Számos szervre toxikus, neurotoxikus, genotoxikus, protein és glutathion szintézis gátló, citokróm P-450 inhibitor	Moreira és mtsai., 2013; Pearson és mtsai., 2010; Pichardo és mtsai., 2017; Žegura és mtsai., 2011
Anatoxin-a	Biciklikus alkaloid	<i>Anabaena</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Neurotoxikus, nikotinos acetilkolin receptorokhoz kompetitíven kötődik	Aráoz és mtsai., 2010
Anatoxin-a(S)	Foszforilált ciklikus N-hidroxiguanin	<i>Anabaena</i>	Neurotoxikus, irreverzibilis acetilkolin észteráz inhibitor	Aráoz és mtsai., 2010
Saxitoxin	Karbamát alkaloid	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i>	Neurotoxikus, feszültség függő Na-csatorna blokkoló	Aráoz és mtsai., 2010; Llewellyn, 2006; Wiese és mtsai., 2010
Lyngbyatoxinok Aplysiatoxinok	Indol alkaloid	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>	Tumor promóter, eukarióta protein kináz C aktivátor	Osborne és mtsai., 2001; Rzymiski és Poniedzialek, 2012

1. táblázat. Főbb cianotoxin csoportok jellemzése szerkezetük, termelő fajok és hatásmechanizmusuk alapján

Cianotoxin	Szerkezet	Termelő faj	Hatásmechanizmus	Referencia
BMAA (β -N-metilamino-L-alanin)	Diaminosav	Számos nemzetség, cianobaktériumok, dinoflagelláták, diatómák	Neurotoxikus, az excitotoxin glutamát receptoron hat, indukálja a kalcium-függő enzimatis utvonalaakat és az oxidatív stresszt. Vér-agy gáton átjut, és az agyszövetben neurodegeneratív hatást vált ki. Szabadon vagy fehérjébe épülve akkumulálódik, melynek szerkezetét, funkcióját módosítja.	Aráoz és mtsai., 2010; Cox és mtsai., 2018; Violi és mtsai., 2019
LPS endotoxin	Lipopoliszacharidok	Minden cianobaktérium	Gyulladást okoz, fokozza a citokin szekréciót, gasztrointesztinális irritáns.	Buratti és mtsai., 2017

2.2.2. *Microcystis* genusz biológiailag aktív metabolitjai

Microcystis az egyik leggyakoribb vízvirágzást alkotó édesvízi nemzetség, minden kontinensen jelen van. A klímaváltozásra és antropogén hatásokra a *Microcystis* vízvirágzások gyakorisága és intenzitása növekvő tendenciát mutat, mint ahogyan azt a 2.1. fejezetben részleteztük. A klasszikus botanikai vagy a filogenetikai osztályozással kevésbé vagy egyáltalán nem magyarázható a rendkívül variábilis oligopeptid összetétel. Az oligopeptidek alpopuláció-markerként való használata egy új megközelítés, amely rámutathat az intraspecifikus kémiai polimorfizmus ökológiai jelentőségére, és az oligopeptidek ismeretlen biológiai szerepére. A *Microcystis* fajon belüli kémiai polimorfizmus olyan alpopulációkat (kemotípusokat) vázol fel, amelyek eltérően hatnak egymásra az adott környezetükben az üledék vesztés, pelágikus növekedés és élőhelyi eloszlás tekintetében. Tehát a kémiai diverzifikáció egy új dimenziót jelent a cianobakteriális biodiverzitásban, amelynek potenciálisan nagyobb ökológiai szerepe lehet, mint a morfológiai alapon történő megközelítésnek önmagában (Agha és mtsai., 2014; Briand és mtsai., 2016).

Az utóbbi évtizedekben a *Microcystis* genuszban számos bioaktív metabolit csoport termelését figyelték meg, amelyek biotechnológiai és orvosi értékkel bírnak. Citotoxikus, antivirális, antimaláriás vagy allelopatikus hatásukat megfigyelték, és a biológiai hatásmechanizmusuk általában valamilyen eukarióta enzim gátlásához kapcsolódik (Elersek és mtsai., 2017; Huang és Zimba, 2019; Janssen, 2019). Ennek ellenére az ökológiai, élővilágban betöltött szerepük még nem teljesen világos. A legszélesebb körben tanulmányozott cianobakteriális bioaktív metabolitok az oligopeptidek, amelyeket (a) bioszintézisük (riboszomális, nem-

riboszomális), (b) kémiai szerkezetük (lineáris, ciklikus, depsipeptid stb.), a primer célszervre vagy organizmusra kifejtett hatásuk (hepatotoxikus, citotoxikus stb.) alapján csoportosítják. A több mint 600 féle oligopeptidet tartalmazó metabolitot a jellegzetes szerkezeti sajátosságaik alapján aeruginozinok, anabaenopeptinek, ciklamidok, cianopeptolinok, mikrocisztinek, mikroviridinek és mikrogininek családjába sorolják (1. ábra és 2. táblázat) (Welker és Von Döhren, 2006; Janssen, 2019).

Anabaenopeptinek

Legalább 96 variánst azonosítottak, azonban a variánsok nevezéktana nem következetes, a metabolitokat általában a termelő fajról vagy földrajzi előfordulásáról nevezik el (Spoof és mtsai., 2016). Nem-riboszomálisan szintetizálódó, ciklikus pentapeptidek (1. ábra/A). Az 1. pozícióban található egyetlen, nem variábilis aminosavhoz egy ureid híd kialakításával kapcsolódnak a leggyakrabban Arg, Ile, Tyr vagy Phe aminosav származékot tartalmazó oldalláncok. A 2. pozícióban Val és Ile fordul elő a leggyakrabban, a 3. pozícióban homo-Tyr (Hty) vagy homo-Phe (Hph), a 4. pozícióban N-metilált aminosavak (*N*-MeAla, *N*-MeHty, *N*-MeHph, *N*-MeGly) épülnek be. A C-terminálison általában Phe, Tyr, Hty, Ile/Leu vagy Hph áll, azonban nodulapeptineknél O-Ac-Ser is előfordulhat (Elersek és mtsai., 2017).

2. táblázat. Cianobakteriális oligopeptid családok jellemzése termelők és biológiai aktivitás alapján.				
Oligopeptid család	Termelők	Variánsok nevezéktana	Biológiai aktivitás	Referencia
Aeruginozinok	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Nodularia spumigena</i>	aeruginozin, microcin, spumigin	Tripszin, kimotripszin, és gyenge papain inhibitorok. Trombin és plazmin inhibitorok	Elersek és mtsai., 2017; Fewer és mtsai., 2013; Ishida és mtsai., 1999; Murakami és mtsai., 1994
Anabaenopeptinek	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Desmonostoc</i>	oscillamide, ferintoic acid, nodulapeptin, plectamide, schizopeptin, lyngbyaureidamid, melophluspeptin, brunsvicamid	Protein foszfatáz, tripszin, kimotripszin, elasztáz, karboxipeptidáz A és U. A norepinefrin-indukálta aorta összehúzódást relaxálja. Lizogén cianobaktérium lítikus ciklusát indukálja.	Elersek és mtsai., 2017; Sano és mtsai., 2001; Sedmak és mtsai., 2008; Spooft és mtsai., 2016
Mikroviridinek	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i>	microviridin	Elasztáz, szelektív tripszin, kimotripszin inhibitorok	Elersek és mtsai., 2017; Ishitsuka és mtsai., 1990
Cianopeptolinok	<i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Symploca</i> , <i>Dolabella</i> tengeri gerinctelen	aeruginopeptin, anabaenopeptilide, dolostatin, hofmannolin, microcystilide, micropeptin, nostocyclin, nostopeptin, oscillapeptilide, oscillapeptin, planktopeptin, scyptolin, somamide, symplostatin, tasipeptin	Tripszin, kimotripszin, elasztáz inhibitorok	Blom és mtsai., 2006; Bubik és mtsai., 2008; Martin és mtsai., 1993; Welker és Von Döhren, 2006

2. táblázat. Cianobakteriális oligopeptid családok jellemzése termelők és biológiai aktivitás alapján.				
Oligopeptid család	Termelők	Variánsok nevezéktana	Biológiai aktivitás	Referencia
Ciklamidok	<i>Lyngbya, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Stigonema, Westelliopsis</i>	aanyascyclamide, bistratamide, dendroamide, microcyclamide, nostocyclamide, obyranamide, raocyclamide, tenuocyclamide, ulongamide, westiellamide	Citotoxikus aktivitásukat megfigyelték számos rákos sejtvonalon	Ishida és mtsai., 2000b; Portmann és mtsai., 2008; Welker és Von Döhren, 2006
Mikrogininek	<i>Microcystis, Anabaena festilissima, Woronichinia naegeliana</i> (Unger) Elenkin, <i>Nostoc, Planktothrix</i>	microginin, oscillagin, nostoginin, cyanostatin	Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), aminopeptidáz M (APM) és leucin-aminopeptidáz (LAP) inhibitorok	Bober és mtsai., 2011; Ishida és mtsai., 2000a; Lifshits és mtsai., 2011; Sano és Kaya, 1997
Mikrocisztinek	<i>Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Phormidium, Oscillatoria, Anabaenopsis, Radiocystis, Gloeothrichia, Rivularia, Tolypothrix, Hapalosiphon, Plectonema</i>	microcystin	Hepatotoxikus, tumor promóter, eukarióta protein foszfatáz PP1, PP2A és foszfoprotein foszfatáz PPP4, PPP5 inhibitorok	Mulvenna és mtsai., 2012; Pearson és mtsai., 2010; Žegura, 2016
Nodularinok	<i>Nodularia, Nostoc</i> (szimbióta)	nodularin	protein foszfatáz 1, 2A és foszfoprotein foszfatáz 4, 5 inhibitor, karcinogének	Mulvenna és mtsai., 2012; Pearson és mtsai., 2010

Aeruginozinok

Ez a metabolit csoport nem-riboszomálisan szintetizálódó lineáris tri- és tetrapeptideket tartalmaz (1. ábra/B). Az aeruginozinok jellegzetessége az N-terminálison lévő fenil-tejsav (Pla) vagy p-hidroxi származéka (Hpla), és a C-terminálison egy arginin származék (agmatin, argininol, argininal). A Hpla-hoz egy vagy két klór vagy bróm, és O-szulfát is kapcsolódhat. A 2-es pozícióban D- és L-aminosavak is állhatnak (Welker és Von Döhren, 2006). Míg a 3-as pozícióban a spumiginekben L-Pro vagy MePro áll (például spumigin A), addig az aeruginozinokban egy 2-karboxi-6-hidroxi-oktahidroindol (Choi) található. A *Planktothrix/Oscillatoria agardhii* és *Nodularia spumigena* aeruginozinja glikozilált (xilóz), *Nodularia spumigena*-ból rövid zsírsavláncot tartalmazó aeruginozint azonosítottak (Fewer és mtsai., 2013).

Cianopeptolinok

Elágazó láncot tartalmazó ciklikus peptidolakton hexadepsipeptidek (1. ábra/E), több mint 120 variánssal. Jellegzetes a 3-amino-6-hidroxi-2-piperidon (Ahp) aminosav, és a peptidgyűrűben a Thr β -hidroxi csoportjának és a terminális aminosav karboxil csoportja közötti kapcsolódás észterkötéssel. Variábilis hosszúságú oldallánc kapcsolódik a Thr egység amino csoportjához, két fő oldallánc típus gyakori: (a) egy vagy két aminosav és egy alifás zsírsav, (b) glicerinsav egység, amely közvetlenül Thr-hoz vagy egy aminosav oldallánchoz kapcsolódhat. A szulfatált és O-metilált glicerinsav szintén elfordul (Welker and von Döhren, 2006). A gyűrűben a Thr és Ahp-n kívül a többi pozíció variábilis.

Az 5. pozícióban, általánosan egy aromás aminosav található, a 6. pozícióban pedig egy neutrális aminosav. A 2. pozíció rendkívül változatos, az aromás, bázikus, alifás és hidroxil aminosavak mellett még a mikrocisztineknél gyakori Dhb-t (dehidrobutirát) is detektáltak (Harrigan és mtsai., 1999), egyes variánsokban H₄Tyr (tetrahidro-Tyr) is lehetséges. Minden variáns 5. pozíciójában álló aminosav N-metilált vagy klórozott. A cianopeptidokban található összes aminosav L-konfigurációjú.

Mikroviridinek

A legnagyobb cianobakteriális oligopeptidek, 12-14 aminosavból épülnek fel (1. ábra/D). Bioszintézisük riboszomális, a triciklikus szerkezet kialakításában a poszttranszlációs módosítások játszanak szerepet. A fő peptidgyűrű hét aminosavból áll, a 4. és 10. pozícióban lévő Thr hidroxil és Asp 4-karboxil csoportja között észter kötés, a 6. és 7. pozícióban található Lys amino- és Glu karboxil csoportjai között peptid kötés alakul ki. A variabilitást az oldalláncban való eltérések, és az 5. pozícióban található aminosav adja. Minden aminosav L-konfigurációjú, az egyetlen nem-proteinogén egység az N-terminális ecetsav.

Ciklamidok

Kis molekulatömegű, ciklikus hexapeptidek, amelyek Cys-ből, Ser-ből és Thr-ből származó tiazol, tiazolin, oxazol és oxazolin gyűrűt tartalmaznak (1. ábra/E). A mikroviridinekhez hasonlóan bioszintézisük riboszomális úton valósul meg (Portmann és mtsai., 2008; Schmidt és mtsai., 2005).

Mikrogininek

A mikrogininek (MG) (1. ábra/C) lineáris oligopeptidek kb. 40 variánsal. Jellemző szerkezeti egységük a 3-amino-2-hidroxi-dekánsav (Ahda), melyhez a C-terminálison három-öt további aminosav kapcsolódik (Ishida és mtsai., 1998), de három vagy négy aminosavból álló variánsokat is azonosítottak már (Sano és Kaya, 1997; Stewart és mtsai., 2018). Az 1., 3. és 4. pozícióban az N-metiláció, illetve a klórozott Ahda egység szintén lehetséges (Gesner-Apter és Carmeli, 2008; Ishida és mtsai., 1998, 2000a; Kodani és mtsai., 1999; Reshef és Carmeli, 2001; Lifshits és mtsai., 2011; Bagchi és mtsai., 2016; Strangman és Wright, 2016). Egyes variánsokban szintén lehetséges a 3-amino-2-hidroxi-oktánsav (Ahoa) (Ploutno és Carmeli, 2002). A MG-ek a cink metalloproteázok inhibitorai (Okino és mtsai., 1993; Neumann és mtsai., 1997; Kodani és mtsai., 1999; Ishida és mtsai., 2000a; Sano és mtsai., 2005; Lifshits és mtsai., 2011; Lodin-Friedman és Carmeli, 2018). Az enzimgátló hatásmechanizmusban szerepet játszik az Ahda, valamint a C-terminális N-Me-Tyr-Tyr egységek (Ishida és mtsai., 2000a; Kraft és mtsai., 2006). Megfigyelték, hogy a tri- vagy tetrapeptid MG-k ACE gátló aktivitása erősebb, mint a pentapeptid variánsoké (Ishida és mtsai., 2000a; Stewart és mtsai., 2018). Nano- vagy mikromoláris koncentrációban gátolják az ACE és aminopeptidáz enzimek aktivitását, de a tripszin, kimotripszin, elasztáz, trombin, papain és protein foszfatáz 1A enzimeket nem gátolják (Bober és Bialczyk, 2017). A MG akut toxicitását leírták *Thamnocephalus platyurus* lárvákban (Bober és Bialczyk, 2017) és *Caenorhabditis elegans* fonálféregben (Lenz és mtsai., 2019). MG-t tartalmazó *Microcystis sp.* teljes kivonat akut toxicitását egy trópusi édesvízi halfaj (*Astyanax altiparanae*) lárváinál is megfigyelték,

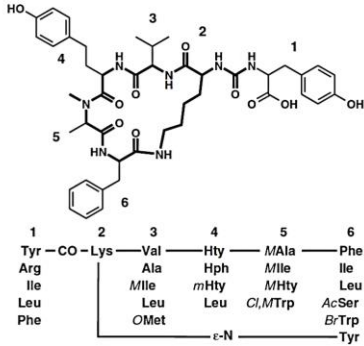
ahol abdominális és perikardiális ödémát, gerincgörbületet tapasztaltak (Fernandes és mtsai., 2019).

Mikrocisztinek

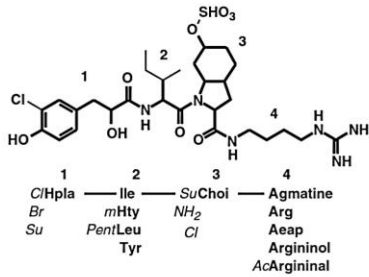
A mikrocisztin (MC) előfordulását legalább 80 országból jelentették. Eddig több mint 240 MC variánst írtak le. Ciklikus heptapeptidek (1. ábra/G), a variánsok a metiláció, hidroxiláció, epimerizációban eltérhetnek. Fontos az aminosav sorrend, és a variábilis aminosavak jellege (D- vagy L-aminosav). A MC-k szerkezeti összegképlete: ciklo-(D-Ala-L-X-D-eritro- β -MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-N-Mdha), amelyben a 2. (X) és 4. (Z) pozícióban álló aminosav variábilis, a 7. pozícióban pedig előfordulhat Dha (dehidroalanin), Mdha (N-metil-dehidroalanin), Dhb (dehidrobutirát), metilált Dhb (Mdhb) vagy Ser. Jellegzetes szerkezeti sajátosságuk a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoiksav (Adda), és a 6. és a 3. pozícióban álló Glu és Asp (Catherine és mtsai., 2017).

A nodularinok ciklikus pentapeptidek, ciklo-(D-eritro- β -metilAsp-L-Z-Adda-D-Glu-2-metilamino-2-Z-dehidrobutirát) szerkezettel (1. ábra/H). A mikrocisztinekhez képest a Mdha helyett Mdhb egység áll. A 2. pozíció (Z) variábilis, leggyakrabban az Arg-t tartalmazó variáns fordul elő, összesen 10 variánsa ismert. A nodularint *Nodularia spumigena*, fonalas, heterocisztás, nitrogén-fixáló fajból írták le. A toxin világszerte előfordul tölcsértorkolatokban, tengerekben és brakkvizekben. (Catherine és mtsai., 2017; Gehringer és mtsai., 2012).

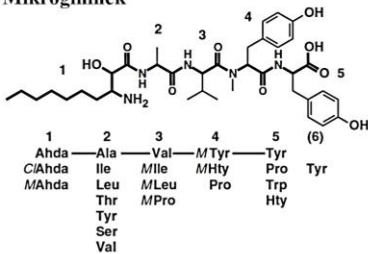
A. Anabaenopeptinek



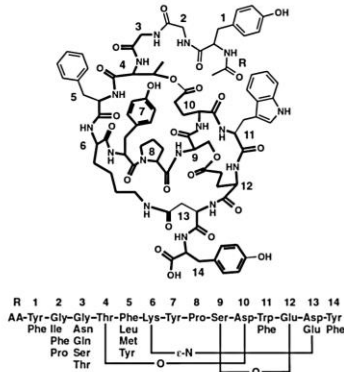
B. Aeruginozinok



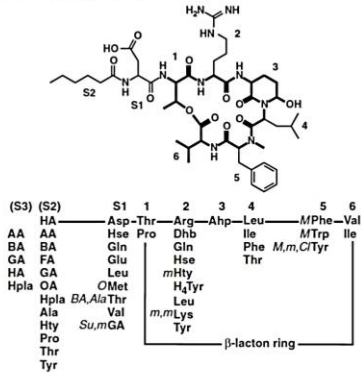
C. Mikrogininék



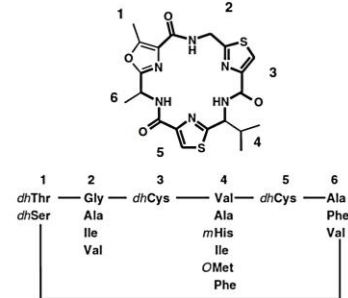
D. Mikroviridinek



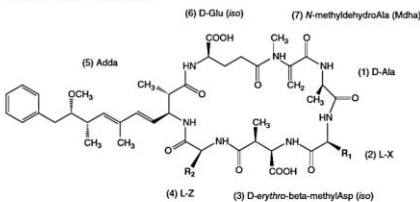
E. Cianopeptolinok



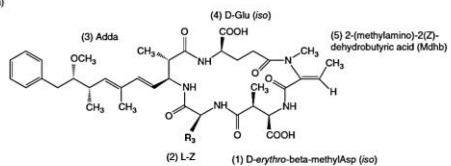
F. Ciklamidok



G. Mikrociszteinek



H. Nodularinok



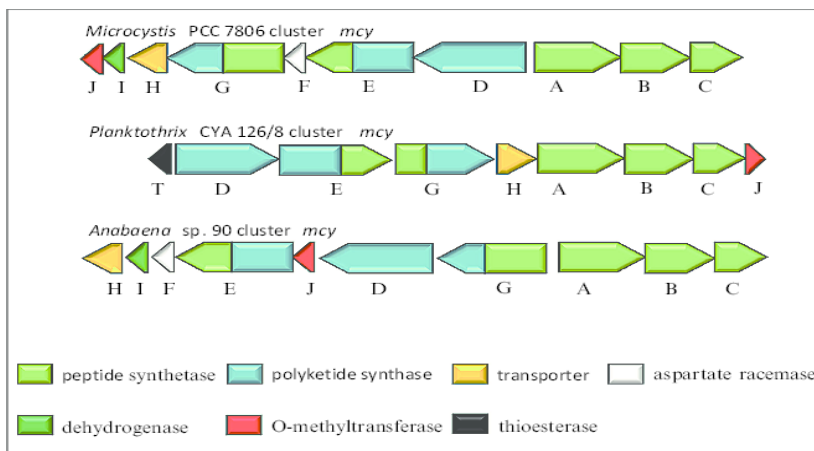
1. ábra. Oligopeptid családok szerkezeti képlete Welker and von Döhren (2006) alapján.

A mikrocisztinek és nodularinok a hepatotoxinok közé tartoznak. A mikrocisztinek a protein foszfatázokkal (PP) kovalens kötést alakítanak ki, míg a nodularinok nem (MacKintosh és mtsai., 1990; Annila és mtsai., 1996; Hastie és mtsai., 2005). A protein foszfatázok defoszforilálják az állati és növényi sejtekben a Ser és Thr aminosavakat. A PP2A inhibíciója révén megnő a májsejtekben a proteinek foszforilációja. Mindez hatással van a metabolikus útvonalakra (például glikogén szintézis), a sejtek kontraktilitására, a membrán transzport folyamatokra, a szekrécióra, a sejtosztódásra, és a gének transzkripciójára és translációjára. Az MC-k továbbá tumor promóter, endokrin diszruptor és immunotoxikus metabolitok. Genotoxinok, indukálják az oxidatív DNS károsodását és proto-onkogének (*c-jun*, *c-fos*, *c-myc*) aktivációját. A nodularinok erősebb tumor promóter aktivitással bírnak a mikrocisztinekhez képest, ugyanis kisebb méretük miatt a hepatociták könnyebben képesek felvenni. Az intracelluláris reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését indukálják, amely lipid, protein és DNS peroxidációt okoz (Žegura és mtsai., 2011; Žegura, 2016; Pham és Utsumi, 2018; Štern és mtsai., 2019).

Az MC-k ökoszisztémákban betöltött szerepe nem teljesen tisztázott. A vízi táplálékláncban jelen vannak, azonban a magasabb trofikus szinteken (pl. puhatestűek, kételtűek, halak, madarak) is ártalmasnak bizonyultak. Megfigyelték, hogy képesek akkumulálódni a fito- és zooplanktonban, valamint növényi és állati szövetekben egyaránt (Pham és Utsumi, 2018). A biomagnifikáció jelensége azonban vitatott, a toxin valószínűleg a detoxifikációs útvonalakon degradálódik vagy exkretálódik (Ibelings és mtsai., 2005). Bioakkumulációjuk a vízi növényekben a növekedés és fotoszintézis inhibícióját, klorofill a/b arány eltolódását és oxidatív stresszt okoz, továbbá a fitoplankton sejt, kloroplasztisz méretére és

pigmenttartalmára is hatással van. A vízi baktériumok a mikrocisztint képesek szubsztrátként metabolizálni és lebontani (Cao és mtsai., 2019; Catherine és mtsai., 2017).

Az MC termelésért felelős *mcy* génklasztert teljesen azonosították *Microcystis* (Tillett és mtsai., 2000), *Planktothrix* (Christiansen és mtsai., 2003), és *Anabaena* (Rouhiainen és mtsai., 2004) genuszokban (2. ábra). A bioszintetikus génklaszter terjedésében a horizontális géntranszfer jelensége lehetséges mechanizmus, továbbá a változatosságot növeli a klaszteren belüli (egy vagy több domén) horizontális géntranszfer, rekombinációs és pont mutációs események (Dittmann és mtsai., 2015). A nodularin génklaszter (*ndaA*) domén delécióval alakult ki a mikrocisztin klaszterből, hiányzik a 3-as pozícióban lévő két aminosav, és az *mcyA*, *mcyB* régiók (Moffitt és Neilan, 2004).



2. ábra. A mikrocisztin termelésért felelős génklasztert leírták *Microcystis*, *Planktothrix*, és *Anabaena* genuszokban, Vichi és mtsai. (2016) alapján. Az *mcy* klaszterbe tartozó 10 gén a poliketid szintáz (PKS) és nem-riboszomális peptid szintetáz (NRPS) bioszintetikus reakciók nagyrészéért felelős, amelyek erősen konzervált multidomén proteinek kódolnak. A különbség a gének promóter régióinak elhelyezkedésében és orientációjában van.

Az *mcyF* (aminosav racemáz), *mcyI* (foszfoglicerát-dehidrogenáz) szerepe, továbbá a dehidro-Ala keletkezése nem tisztázott, míg az *mcyH* ABC transzporter szerepe esszenciális az MC termelésben (Pearson és mtsai., 2004). Az NRPS rendszerek által hasznosított közvetlen prekursorok gyakran elsődleges metabolitok, és nem kell az adott klaszternek előállítania. Viszont sokszor a prekursorok bioszintéziséért felelős gének is a klaszter részét képezik, például az a PKS rendszer, amely az Adda képzésért felelős, nem része a klaszternek (Welker és Von Döhren, 2006). Az MC a sejtek lízise során kerül a vztérben, ahol akár hetekig perzisztál, amely magas toxin koncentrációkat eredményez akár alacsony sejtömeg esetén is. A WHO meghatározta az ivóvízben maximális, egészségügyi kockázattal nem járó MC koncentrációt ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) és a napi tolerálható beviteli értékét ($0,04 \text{ mg tkg}^{-1}$) (World Health Organization, 2017).

2.3. Genotoxicitás jelentősége az ökotoxikológiában

Rengetegféle természetes és szintetikus vegyületcsoport, metabolitok komplex elegye kerülhet mind az élőlények metabolizmusából adódóan, mint pedig antropogén hatásra a felszíni vizekbe, amely az élővilágra közvetlen veszélyt jelent. Humán forrásokból kerülnek a vizekbe, talajokba és levegőbe a gyógyszer maradványok, peszticidek, nehézfémek vagy a műanyagokból kioldódó biszfenolok. A poliaromás szénhidrogének igazoltan karcinogének, mutagének és teratogének. Ezek a metabolitok bizonyítottan hatással vannak az élőlények fejlődésére, reprodukciós képességére és viselkedésére (Bafana és mtsai., 2018; Gerić és mtsai., 2014; Hercog és mtsai., 2019). Megfigyelték, hogy az antropogén szennyezők, toxikus fémek akkumulálódhatnak a cianobaktérium

sejtekben, amely a terepi minták genotoxicitásának vizsgálata során tovább növelte az MC és CYN tartalmú vízvirágzások toxicitását (Bláha és mtsai., 2017). A cianobakteriális szekunder metabolitok közül az MC-LR és CYN genotoxicitása kutatott a legszélesebb körben, de a BMAA és nodularin örökítőanyagra gyakorolt hatását is vizsgálták (Díez-Quijada és mtsai., 2019a; Herczeg és mtsai., 2017; Novak és mtsai., 2016; Raška és mtsai., 2019). Ezek a metabolitok már alacsony, környezetileg releváns koncentrációban is oxidatív stresszt és DNS károsodást képesek indukálni. Ezért fontos a cianobakteriális bioaktív, oligopeptid típusú vegyületek genotoxicitását célzó kutatások szerepe a hatásmechanizmusok, és potenciális környezeti hatásuk megismerése érdekében (Pamplona-Silva és mtsai., 2018).

A genotoxikus ágensek hatására a sejtek örökítőanyagának (DNS vagy RNS) integritása sérül. A három elsődleges hatásuk alapján karcinogén, mutagén vagy teratogén ágensek lehetnek. A legtöbb esetben számos sejttypusban mutációkat okozhat. Bizonyos mutációk végső soron tumoros sejtek képződéséhez vezetnek, ezért a mutagének karcinogének is lehetnek. A DNS károsodása a szomatikus sejtekben szomatikus mutációkat okoz, amely malignus transzformációhoz (rák) vezet. A genotoxikus vegyületek, a DNS-sel kölcsönhatásba lépve, sokféle változást idézhetnek elő: pontmutációkat, szerkezeti (klasztogén hatás) és számbeli (aneugén hatás) kromoszóma aberrációkat, kromoszomális újra-szerveződést, excíziós repair hiányát, valamint alkáli labilis helyek, DNS adduktok, DNS száltörések, és mikronukleuszok képződését (Kaur és mtsai., 2018).

A tiszta komponensek, és környezeti minták vizsgálatához bakteriális és eukarióta *in vitro* és *in vivo* tesztrendszereket dolgoztak ki a különböző biomarkerek alapján. A mutagenitást leggyakrabban a bakteriális Ames és

SOS/umuC tesztekkel vizsgálják, amelyek *Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli* mutáns törzseket alkalmaznak. A mikrobiális teszt gyors, hatékony, és pozitívan korrelál az emlőssejteken adott válaszreakcióval (Bafana és mtsai., 2018; Bláha és mtsai., 2017; Novak és mtsai., 2016).

A DNS károsodás biomarkerek vizsgálata eukarióta (állati, humán, növényi) sejteken rendkívül változatos, a leggyakrabban alkalmazott módszer a DNS fragmentációra, száltörések kimutatására alkalmas comet assay, valamint a γ H2AX fókuszok detektálása révén a DNS kettős száltörések meghatározása. Az ehhez kapcsolódó DNS javítási folyamatok, a nukleotid excíziós repair (NER), és nem-homológ végek egyesítése (NHEJ) repair útvonalak gátlása szintén megfigyelhető genotoxinok hatására. Gyakori az oxidatív stressz vizsgálata, hiszen a ROS indirekt módon DNS károsodást okoz. Az oxidált DNS bázisok (8-hidroxi-guanin, oxidált purin bázis) felhalmozódása mutációkhoz vezethet. Az antioxidáns védelemben részt vevő enzimek (szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutathion-S-transzferáz) aktivitása, valamint az intracelluláris redukált glutathion aránya szintén fontos lehet a DNS károsodás kialakulásában.

A genomi instabilitás indikátorai a kromoszóma aberrációk: a mikronukleuszok, nukleoplazmahidak, nukleáris „rügyek”, amelyek kimutatására érzékeny a CBMN assay (Pichardo és mtsai., 2017; Žegura, 2016). A növényi sejtekben megfigyelték sejtosztódás során az MC-LR hatására képződő dicentrikus kromoszómákat, és a mitotikus osztódási orsó elváltozásait (Máthé és mtsai., 2013a; Pamplona-Silva és mtsai., 2018).

A génexpressziós vizsgálatok szintén részét képezik a genotoxicitás vizsgálatoknak, amelynél a leggyakrabban a metabolikus aktiváció és detoxifikáció citokróm P450 enzimeit, és a DNS károsodásra válasz

géneket (pl. repair), tumorpromóter géneket vizsgálják mRNS szinten (Bláha és mtsai., 2017; Hercog és mtsai., 2017).

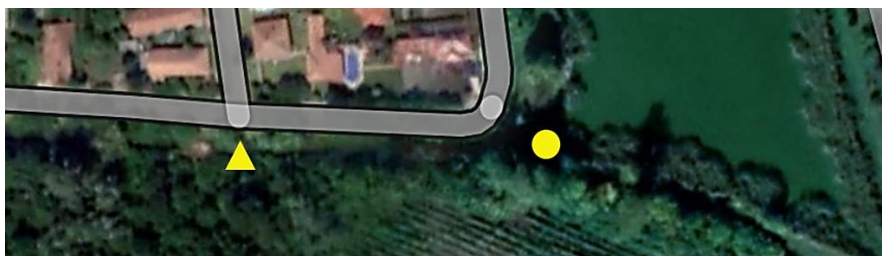
A környezeti toxicitásra adott válaszok detektálására gyakran *in vitro* sejtkultúrákat alkalmaznak. Ugyanakkor a természetes élőhelyről gyűjtött állatok és laboratóriumi állatok *in vivo*, szöveteiből vizsgált DNS károsodás vizsgálatára is van példa. A gyakorlatban a halakból, gerinctelenekből vagy rágcsálókban (pl. egér) vett szövetmintákon végzett kísérletek fordulnak elő a leggyakrabban. Ezekhez a vizsgálatokhoz a fentebb leírt módszerek alkalmazhatóak az élőlényből izolált sejteken (de Lima Cardoso és mtsai., 2018; Kaur és mtsai., 2018).

A cianobakteriális szekunder metabolitok világszerte megjelennek. A tudományos módszerek fejlődésével egyre több szekunder metabolitot azonosítanak a környezetből, amelyek potenciális káros hatásainak vizsgálata, környezeti kockázatuk felmérése is óriási relevanciával bír. A genotoxikológiai vizsgálatok a cianotoxinok biológiai funkciójára is segíthetnek magyarázatot találni.

3. Anyag és módszer

3.1. Terepi mintagyűjtés

2011 és 2013 között az eutróf Bárdos-tóban (Gyula) (terület: 3 ha, átlagos mélység 1,5-2 m) a nyári időszakban megjelenő vízvirágzások fitoplankton mintáit a víz felszíni rétegéből gyűjtöttük (●). A növényi (*Ceratophyllum submersum*) és víz mintákat 2012-ben gyűjtöttük a vízvirágzások területéről (●) (GPS: 46.634958, 21.270314) és a vízvirágzástól távol eső, kontroll területéről (▲) (GPS: 46.634626, 21.269220) (3. ábra).



3. ábra. Bárdos-tó mintavételi pontok. A háromszög (▲) a kontroll területet, a kör (●) a vízvirágzások területet jelöli.

A cianobaktérium fajokat morfológiai jegyek alapján azonosítottuk (Komárek és Anagnostidis, 1998), 250× nagyítással, fénymikroszkóp (Carl Zeiss Jenamed2) segítségével.

3.2. Cianobakteriális tenyészetek fenntartása

A balatoni *Microcystis* izolátumokból (Riba és mtsai., 2019) laboratóriumban B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 kódszámú törzseket hoztunk létre, amelyeket Allen tápoldatban (3. táblázat; Allen, 1968), $26\pm 1^\circ\text{C}$ hőmérsékleten, állandó megvilágítás mellett ($100 \text{ lu m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), buborékoltatással (steril sűrített levegő, 5% CO_2) 1,5 L üvegcsovekben, illetve 1 L Erlenmeyer lombikokban tenyésztettünk. A sejtek aratása 7 naponta centrifugálással (5000 rpm, 5 perc, Beckman Avanti J-25) történt. A sejteket liofilizáltuk (Christ Alpha 1-2 LD Plus) későbbi felhasználásig.

3. táblázat. Allen tápoldat összetétele.

Allen tápoldat (pH 7,5-8,0)	g L⁻¹
NaNO_3	1,5 g
K_2HPO_4	0,039
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,075
Na_2CO_3	0,02
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,034
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,058
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{EDTA}$	0,006 + 0,001
A6 mikroelemek	0,001
A6 mikroelem törzsoldat:	g L⁻¹
H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,390
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} / \text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494 / 0,0403

3.3. Cianobakteriális kivonatok készítése

A balatoni izolátumok teljes kivonatának peptidmintázat vizsgálatához (LC-MS) a liofilizált cianobaktérium sejtek extrakcióját (250 mg) 99,8 % metanollal (4 mL - 2 mL - 2 mL), szonikálással és vortex-szel végeztük. A felülúszót centrifugálással (13000 rpm, 15 perc) gyűjtöttük össze, amelyet vákuumcentrifugában oldószermentesítettünk. Az analitikai (LC-MS) mérésekhez, és humán sejt kultúrán végzett kísérletekhez a kivonatokat 50%-os etanolban, a mustár csíranövényteszthez pedig steril ultratiszta vízben oldottuk. A kivonatokat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A liofilizált Bárdos-fitoplankton minták extrakciója (10 mg) bidesztillált vízzel, szonikálás és rázatás (6 óra, szobahőmérséklet) segítségével történt. Centrifugálással (13000 rpm, 5 perc) összegyűjtött felülúszót használtuk az ELISA mérésekhez és mustár csíranövényteszthez.

A liofilizált Bárdos-víz mintákat bidesztillált vízben oldottuk. A *Ceratophyllum submersum* növényminták extrakciója 99,8% metanollal, a nedves tömeg háromszoros térfogatával (4°C, éjszakán át) történt, majd centrifugáltuk (5000 rpm, 5 perc). A pellethez másfélszeres térfogatú 99,8% metanolt adtunk, ráztuk (4 óra, 4°C), majd centrifugáltuk (5000 rpm, 5 perc). Ezt a lépést megismételtük még egyszer. A felülúszót vákuumcentrifugával (Christ RVC 2-18, Christ CT02-50 solvent trap) oldószermentesítettük, és bidesztillált vízben oldottuk a mérésekhez.

3.4. Toxintisztítás

A 2012. augusztusi Bárdos-tóból származó liofilizált terepi mintából, és a balatoni B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 *Microcystis* törzsekből toxint tisztítottunk, azonban a kivonatok előállításában adódtak eltérések.

3.4.1. Kivonat készítése

A kivonatokat Vasas és mtsai. (2006) alapján kisebb módosításokkal készítettük. A liofilizált sejtekből metanolos (99,8%) kivonatot készítettünk (4. táblázat). A kivonatot többszöri kevertetéssel és centrifugálással (Beckman Avanti J-25) különítettük el a sejtörmeléktől, a sejtörmeléket további 99,8% metanollal kevertettük, és centrifugáltuk. A felülúszót vákuumos bepárlással (40°C, Scilogex RE100-Pro) töményítettük. A kivonatot 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) pufferben oldottuk fel ioncserélő kromatográfiához. Legalább 1 éjszakán át fagyasztoóban (-20°C) tároltuk. Oszlopra injektálás előtt centrifugáltuk és szűrtük (GF/C, Whatman).

4. táblázat. Liofilizált fitoplankton minták extrakciójának lépései.

	Bárdos tavi vízvirágzás minta	Balatoni (B-14-01, F-14/9- S12-4-A-01) törzsek
Liofilizált sejt	7,39 g	10 g
99,8% metanol	260 mL éjszakán át 13000 rpm, 20 perc (Beckman Avanti J-25)	200 mL, kevertetés éjszakán át 13000 rpm, 20 perc (Beckman Avanti J-25)
99,8% metanol	50 mL, kevertetés 1 órán át 13000 rpm, 20 perc	200 mL, kevertetés éjszakán át 13000 rpm, 20 perc
Vákuumos bepárlás	40°C, Scilogex RE100-Pro	40°C, Scilogex RE100-Pro
Kivonat oldása, szűrése oszlopra injektálás előtt	10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 13000 rpm, 15 perc GF/C filter (Whatman)	10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 13000 rpm, 20 perc GF/C filter (Whatman)

3.4.2. Anion-cserélő (DEAE-cellulóz) kromatográfia

A kromatográfiát Vasas és mtsai. (2013) alapján kisebb módosításokkal végeztük. DEAE-cellulóz oszloptölteten (DEAE-52, Whatman) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) eluenst és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) lineáris grádiens (0-100%) alkalmaztunk. A Bárdos-minta kromatográfiáját Pharmacia FRAC-300 frakció szedővel és BOECO S-22 UV/VIS spektrofotométerrel végeztük. A balatoni mintákat flash kromatográfiás rendszerben (Teledyne ISCO CombiFlash® Rf+; PeakTrak software) tisztítottuk. Az áramlási sebesség 5 mL min^{-1} volt. Az elválasztás során 240 nm hullámhosszon detektáltuk a mikrocisztint, és 220 nm-en a mikroginint tartalmazó frakciókat, a kapott csúcsokat vákuumos bepárlással töményítettük. A Bárdos-mintát a továbbiakban MALDI-TOF tömegspektrométerrel mértük, a balatoni törzseket 5 mL 50% (v/v) etanol/ultratiszta vízben oldottuk méretkizárásos kromatográfiához.

3.4.3. Méretkizárásos kromatográfia

Az elválasztást Toyopearl-HW40 oszlopon, 50% (v/v) etanol/ultratiszta vízzel történő elúcióval végeztük Vasas és mtsai. (2002) alapján kisebb módosításokkal. A frakciókat Pharmacia FRAC-300-as frakciószedővel gyűjtöttük (3 mL perc^{-1} áramlási sebesség), és az abszorbanciát BOECO S-22 UV/VIS egy utas spektrofotométerrel mértük 220 nm-en. A kapott abszorbancia értékek alapján kiválasztott frakciókat vákuum bepárlással töményítettük.

3.4.4. C18-flash kromatográfia

Flash kromatográfias rendszerben (Teledyne ISCO CombiFlash® Rf+; PeakTrak software) reverz-fázisú oszlopot (RediSep C18Aq 50 gram Gold) használtunk. Az eluensek 0,1% TFA tartalmú acetonitril (B) és ultratiszta víz (A) voltak. Az elúció: 0-5% B 28, 3 percig, 5-90% B 113, 2 percig, 90-100% B 28, 3 percig, 100% B 35, 4 percig, végül 100-5% B 7, 6 percig. 3 mL min⁻¹ áramlási sebességgel Az oszlopra 1,5-2 mL 5% (v/v) acetonitrilben oldott mintát fecskendeztünk. A kapott frakciók abszorbanciáját 220 nm-en mértük spektrofotométerrel (BOECO S-22 UV/VIS), és a bioaktív metabolitokat tartalmazó frakciókat vákuum bepárlással oldószer mentesítettük.

3.4.5. HPLC (Nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia)

Végső tisztítási lépésként szemipreparatív HPLC készülékkel dolgoztunk (Shimadzu SPD-M10A, CLASS-VP™ Chromatography Data System Software), Supelco Supelcosil LC-18 (25 cm x 10 mm, 5 μm) típusú oszloppal. A kolonna hőmérséklete 40°C volt. A tisztítási módszert Bober és mtsai. (2011) alapján módosítottuk. Eluensként 0,1% (v/v) TFA tartalmú acetonitrilt (B) és ultratiszta vizet (A) használtunk, a mozgófázis áramlási sebessége 3 mL min⁻¹ volt. A mintákat 10% (v/v) acetonitrilben oldottuk. Az oligopeptidek elválasztásához az elúció: 10% B 0-10 percig, 10-45% B 50 percig, 45-90% B 10 percig, 90-100% B 5 percig, végül 100-10% B 2,5 percig. Az injektált mennyiség 50-100 μL volt. A frakciókból vákuumcentrifugával (Christ RVC 2-18, Christ CT02-50 solvent trap)

távolítottuk el az eluenst. A száraztömeg pontos meghatározása után végeztük a további kísérleteket a tiszta anyagokkal.

3.5. MALDI-TOF

A Bárdos-tavi vízvirágzás és vízminták mikrocisztin variánsainak meghatározására MALDI (mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció)-TOF (repülési idő) módszert alkalmaztunk Vasas és mtsai. (2013) alapján. A mérés pozitív-ionizációs módban, Bruker Biflex MALDI-TOF tömegspektrométerrel történt. A lézer deszorpció/ionizációhoz 337 nm nitrogén lézerrel történt, a spektrum (min. 100) lézer lövésből (19-kV gyorsító és 20-kV reflektoron feszültség) adódott. Külső kalibrációhoz ciklodextrint ($[M+Na]^+$ csúcsok 6-8 DP-vel (m/z 995.311157.361319.41 Da)) használtunk. A mérést 2,5-dihidroxibenzoészav (DHB) mátrixon történt, 0,5 μ L mátrix oldat és 0,5 μ L minta elegyével. DHB mátrix oldat 10 mg DHB-t tartalmazott etanol:víz 1:1 elegyében (0,5 mL) oldva. A mikrocisztineket m/z értékük alapján $[M+H]^+$ csúcsokból azonosítottuk.

3.6. LC-ESI-MS

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális kivonatok összetételét, és mikroginin variánsok aminosav sorrendjét LC-ESI-MS (folyadék kromatográfia-elektrospray ionizációs-tömegspektrometria) módszerrel, Riba és mtsai. (2019) alapján határoztuk meg Thermo Accela HPLC, Thermo LTQ XL Linear Ion Trap MS rendszerrel, Kinetex XB-C18 kolonna (100 mm x 2,10 mm x 2,6 μ m) használatával. Az ESI forrást pozitív ionizációs módban használtuk. A gradiens mobil fázis 0,1% (v/v)

hangyasav tartalmú ultratiszta víz (A) és acetonitril (B). A lineáris gradiens 10-70% B 0-10 percig, 70-100% B 10-11 percig, 100% B 11-16 percig, 100-10% B 16-18 percig, 10% B 18-20 percig. Az áramlási sebesség 0,25 mL perc⁻¹ volt. 1 µL mintát injektáltunk. Az adatok feldolgozását és analízisét Thermo Excalibur 2.2 SP1.48 és MZmine 2.11 (Pluskal és mtsai., 2010) szoftverek segítségével végeztük. A molekula iont 300-1500 Da között detektáltuk. A mikroginin standardok hiányában, a variánsok mennyiségi meghatározását a csúcs alatti területek arányával jellemeztük és %-ként írtuk le.

3.7. DNS izolálása

A DNS izolálását Farkas és mtsai. (2014) alapján végeztük kisebb módosításokkal. A Bárdos-vízvirágzásból származó liofilizált mintákból (20 mg) DNS-t izoláltunk fenol-kloroformos módszerrel. A mintákat DNS-kivonó pufferrel (50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 10 mM EDTA (pH=8.0), 50 mM NaCl, 0,5% SDS), háromszor folyékony nitrogénes fagyasztás-olvasztással, és dörzsöléssel roncsoltuk, majd inkubáltuk (2 óra, 65°C). 1x TE fenol (1:1 arány) hozzáadása után vortexeltük, 5 percig inkubáltuk majd centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc), ezt a lépést háromszor ismételtük, amelynél a keletkezett felülúszó vizes fázishoz adtunk fenolt. Végül a felülúszóhoz 1:1 arányban kloroformot (4°C) adtunk, vortexeltük és 3 perc után centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc). A -20°C-on tárolt 96%-os etanol (1:1 arány) és 5 M NaCl oldat hozzáadásával inkubáltuk (1 óra, -20°C), majd centrifugáltuk (13000 rpm, 20 perc, 4°C). A pelletet háromszor 200 µl 75%-os etanollal (4°C) mostuk, centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc). Végül a pelletről (DNS) a maradék etanolt steril fülkében párologtattuk el

(10 perc), és 50 µl nukleázmentes vízben (Fermentas) oldottuk. A DNS koncentrációját és tisztaságát Shimadzu UV1601 spektrofotométerrel ellenőriztük.

3.8. PCR (Polimeráz lánreakció)

A mikrocisztin bioszintézisért felelős génklaszterek vizsgálatát PCR-rel végeztük Farkas és mtsai. (2014) alapján. Az általunk alkalmazott reakcióelegy (25 µL):

- 12,5 µL DreamTaq™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific)
- 0,625-0,625 µL forward és reverse primer (5. táblázat)
- 10 µL DNS templát
- 1,25 µL nukleázmentes víz

Microcystis sp. specifikus génklaszter hőprogramja:

1. kezdeti denaturáció 94 °C 5 perc
2. 35 ciklus: denaturáció 95 °C 1 perc, annealing megadott hőmérséklet (5. táblázat) 30 másodperc, extenzió 72 °C 1 perc
3. végső extenzió 72 °C 7 perc.

Planktothrix sp. specifikus génklaszter hőprogramja:

1. kezdeti denaturáció 96 °C 10 perc
2. 35 ciklus: denaturáció 96 °C 10 másodperc, annealing megadott hőmérséklet (1.táblázat) 30 másodperc, extenzió 72 °C 30 másodperc
3. végső extenzió 72 °C 10 perc.

5. táblázat. *Microcystis sp.* specifikus (*mcyA*, B, C, D1, D2, E, G), és a *Planktothrix sp.* specifikus (*mcyA*, HA, CJ, B, EG, E, T, TD) mikrocisztin termelésért felelős gének és primerek paraméterei.

Gének	Primer pár	Szekvencia 5'→3'	Annealing (°C)	Méret (bp)
mcyA	MSF MSR	ATCCAGCAGTTGAGCAAGC TGCAGATAACTCCGCAGTTG	47	1300
mcyB	2156-F 3111-R	ATCACTTCAATCTAACGACT AGTTGCTGCTGTAAGAAA	52	955
mcyC	PSCF1 PSCR1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG CCGACAACATCACAAAGGC	52	674
mcyD1	PKDF1 PKDR1	GACGCTCAAATGATGAAAC GCAACCGATAAAAACTCCC	52	647
mcyD2	PKDF2 PKDR2	AGTTATTCTCCTCAAGCC CATTCGTTCCACTAAATCC	52	859
mcyE	PKEF1 PKER1	CGCAAACCCGATTTACAG CCCCTACCATCTTCATCTTC	52	755
mcyG	PKGF1 PKGR1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC AATCGCTAAAACGCCACC	52	425
mcyA	<i>mcyA</i> .fw <i>mcyA</i> .rev	ATGTCACCTATTGGGCTTGC TCGATTCCCCTAAGTGATGC	57	839
mcyHA	<i>mcyHA</i> .fw <i>mcyHA</i> .rev	TTAGATGAAGCCACCAGTGC GATTA AAAAATTGAATAGCTGCTAGG	57	540
mcyCJ	<i>mcyCJ</i> .fw <i>mcyCJ</i> .rev	TTGGATACAAGCGACAAAAGG TCTCCAGCTTGAAGTTCTGC	57	524
mcyB	<i>mcyB</i> .fw <i>mcyB</i> .rev	ATTACAGCAGAGAAAATCCAAGCA TCGCAATAGCGGGATCA	59	555
mcyEG	<i>mcyEG</i> .fw <i>mcyEG</i> .rev	GAATTCATTTTTGTTGAGGAAGG AGAAAACAAGCCCAGAGTGC	59	755 (642)
mcyE	<i>mcyE</i> .fw <i>mcyE</i> .rev	TTACCTAATTATCCCTTCAAAG CAATGGGTAAGGTTTGCTT	48	589
mcyT	<i>mcyT</i> .fw <i>mcyT</i> .rev	CCCAATCTAACCCCAACTGC CAATAGCGATTTTCCCAAGC	55	747
mcyTD	<i>mcyTD</i> .fw <i>mcyTD</i> .rev	ATCCGCCATACTGTGACC GATTTTGCCCGGTTTACTCC	59	763 (1300)

3.9. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékek detektálásához agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk (Farkas és mtsai., 2014) kisebb módosításokkal. Az 1%-os agarózgélhez a 0,5 g agarózt (Lonza) melegítéssel 50 mL 10×TBE pufferben oldottuk. A festéshez 4 µL etídium bromidot adtunk szilárdulás előtt a gélhez. A gélbe és futtató pufferként 10×TBE (Tris-borát + Na₂EDTA; pH=8.0) alkalmaztunk. Az elválasztáshoz 10 µL PCR terméket, 1 µL DNS markert (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; Thermo Scientific) futtattunk és Cleaver GelDoc Systemmel detektáltuk.

3.10. Mustár csíranövényteszt (Blue-Green Sinapis Test, BGST)

A cianobakteriális kivonatok növekedésgátló hatásának meghatározására BGST tesztet (Kós és mtsai., 1995; Vasas és mtsai., 2002) végeztünk kisebb módosításokkal (Ujvárosi és mtsai., 2019). 100 µL mintát és 100 µL steril 2%-os agart 98-lyukú plate-re pipettáztunk. A Bárdos-fitoplankton kivonatok koncentrációi: 0; 0,20; 0,40; 0,80; 1,60; 3,20; 6,40 mg szt. mL⁻¹. A B-14-01, F-14/9-S12-4-A-01 és BGSD 243 kivonatok koncentrációi: 0; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80; 1,60; 3,20; 6,40; 12,5; 25; 50 mg szt. mL⁻¹. Kontrollként steril bidesztillált vizet használtunk. A száraz magokat (*Sinapis alba* var. budakalászi sárga) az agarra helyeztünk, majd sötétben, 28°C-on, nedves papírtörülkövel bélelt steril fémdobozban 72 órán át inkubáltuk. Az etiolált csíranövények hosszát a kontrollhoz (100%) viszonyítottuk, és ahol lehetett, IC₅₀ értéket határoztunk meg nem-lineáris regressziós analízissel. A méréseket egymástól függetlenül, legalább 3 ismétlésben végeztük, és statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA-val

határoztuk meg, $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $< 0,0001$ (****).

3.11. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

A mikrocisztin tartalom meghatározásához Adda-specifikus mikrocisztin indirekt kompetitív ELISA kitet (Enzo Life Sciences; ALX-850-319-KI01) használtunk a gyártó utasításai szerint. A növényi kivonatok törzsoldatából ($0,2 \text{ mg szt. mL}^{-1}$), a cianobakteriális kivonatból ($0,2 \text{ mg szt. mL}^{-1}$), a vízmintákból ($66,66 \text{ mg szt. mL}^{-1}$) hígításokat készítettünk. Az abszorbanciát 450 nm -en mértük. Három egymástól független mérést végeztünk, és eredményeinket standard sorhoz ($0\text{-}5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ MC}$) viszonyítva határoztuk meg. Oldószer kontrollként bidesztillált vizet, pozitív kontrollként a kitben lévő standardot ($0,75 \pm 0,185 \text{ } \mu\text{g mikrocisztin L}^{-1}$) használtuk.

3.12. Genotoxikológiai vizsgálatok

3.12.1. HepG2 sejt kultúra fenntartása

Kísérleteinkhez humán hepatocelluláris karcinóma (HepG2) sejt vonalat használtunk, amely Dr. Firouz Darroudi ajándéka volt (Leiden University Medical Centre, Department of Toxicogenetics, Leiden, The Netherlands). A sejteket 37°C -on és 5% CO_2 tartalmú termosztátban tenyésztettük. A sejt médium Williams' E médiumot (Sigma, St. Louis, USA), 15% FBS-t (foetális borjú szérum), 2 mM L-glutamin és 100 U mL^{-1} penicillin/sztreptomicint tartalmazott. A sejteket kísérleteinkhez a 3-11. passzálig használtuk fel. Pozitív kontrollként a pro-karcinogén BaP-ot

(benzo[a]pirén) és a DNS szintézis inhibitor etopozidot használtunk a genotoxicitás kimutatására szolgáló tesztekben. Mikrocisztin-LR (MC-LR) és cilindropermopszin (CYN) cianotoxinokat a kapott hatások összevetése végett alkalmaztuk.

3.13.2. MTT teszt

A citotoxicitást és sejtproliferációt Mosmann (1983) által leírt módszer alapján és Žegura és mtsai. (2008) kisebb módosításaival mértük. A kísérletekhez a sejteket 96-lyukú plate-en 8×10^3 (24 órás kezelés) és 3×10^3 (72 órás kezelés) sejt/well denzitással 24 órán át, letapadásig 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú termosztátban tenyésztettük. Majd a sejtmédiumot a cianobakteriális kivonatot és mikroginineket tartalmazó sejtmédiumra cseréltük. A 24 órás kezeléshez 0; 0,1; 1; 6,25; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MG-t, és 0; 1; 6,25; 10; 100; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ szt. cianobakteriális kivonatot, a 72 órás kezelésekhöz 0, 0,01; 0,1; 1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MG-t, és 0; 0,01; 0,1; 1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ szt. cianobakteriális kivonatot vizsgáltunk. A kezelést követően 20 $\mu\text{l/well}$ MTT reagenssel (5 mg mL^{-1}) inkubáltuk (3 óra), és 200 μl DMSO-ban reszuszpendáltuk a képződött formazán kristályokat, amelynek az abszorbanciáját 570 és 690 nm-en spektrofotométerrel (SynergyMx, BioTek, Winooski, USA; Gen5 szoftver) mértük. A kezelt sejtek viabilitását az oldószer kontrollhoz (0,1% etanol tartalmú médium) viszonyítva határoztuk meg. Pozitív kontrollként MC-LR-t ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), CYN-t ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) és etopozidot (50 és $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 és 72 órás expozícióra vonatkozóan) használtunk. Kísérleteinket kétszer, 5 ismétléssel végeztünk, és a statisztikai szignifikanciát egyutas variancia analízissel (1-way ANOVA) határoztuk meg, $P < 0,05$ (*). Az

IC₅₀ értékét nem-lineáris regressziós analízissel határoztuk meg (GraphPad Prism 6 szoftver, San Diego, California, USA).

3.13.3. Comet assay

A kísérletekhez a sejteket 12-well plate-en, 6×10^4 (24 órás kezelés) és 8×10^4 (4 órás kezelés) sejt/well denzitással 24 órán át, letapadásig 37°C-on, 5 % CO₂ tartalmú termosztátban tenyésztettük. A sejtmediumot a cianobakteriális kivonatot (0,01; 0,1; 1 µg szt. mL⁻¹) és MG-t (0,01; 0,1; 1 µg mL⁻¹) tartalmazó sejtmediumra cseréltük. A kontroll sejtmedium, a pozitív kontroll 30 µM BaP és CYN (0,5 µg mL⁻¹) volt. A vizsgálatokat Singh és mtsai. (1988) alapján Žegura és mtsai. (2004) módosításaival végeztük. Az expozíció után a sejteket 1×PBS-sel mostuk, és 200 µl tripszinnel inkubáltuk (4 perc, 37°C). 600 µl médium hozzáadásával a sejteket centrifugáltuk (800 rpm, 5 perc; Eppendorf Minispin). Kb. 100 µl felülúszót hagytunk, amelyben reszuszpendáltuk a sejteket és 2×30 µl-t pipettáztunk külön eppendorf csövekbe. Matt felületű tárgylemezekre 2×80 µl 1% NMP agarózt (0,2 g agaróz, 20 mL 1×PBS) pipettáztunk, fedőlemezzel lefedve hagytuk megszilárdulni (5 perc, 4°C). A fedőlemezek levétele után tárgylemezenként 2×70 µl 1% LMP agarózt (0,2 g agaróz, 20 mL 1×PBS) adtunk a 30 µl sejtsuszpenziókhöz, és 70 µl-t pipettáztunk az 1% NMP agarózra, majd ismét fedőlemezzel lefedve 4°C-on hűtöttük 5 percig. Az agaróz megszilárdulása után eltávolítottuk a fedőlemezeket, és a tárgylemezeket lízis pufferben (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM Tris, 1% (v/v) Triton-X; pH 10,0) inkubáltuk (1 óra, sötétben, 4°C). Az inkubációs idő lejártá után futtatókádba, elektroforézis pufferbe (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA; pH > 13,0) helyeztük a tárgylemezeket (sötét, 4°C),

20 percig inkubáltuk, majd sötétben futtatuk (20 perc, 25V, 300mA, 4°C). Gélelektroforézist követően a lemezeket neutralizáló pufferben (0,4 M Tris; pH 7,5) inkubáltuk (15 perc, sötét), majd egy nedves törlőkendővel bélelt dobozban tároltuk 4°C-on. A detektálás GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain (1:3333)) festéssel, fluoreszcens mikroszkóppal (Eclipse 800, Nikon) (400× nagyítás), Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK) program segítségével történt. Minden minta esetében 50 sejtet számoltunk, a program által vett DNS csóva %-os értéke alapján történt a kiértékelés GraphPad Prism 6 programmal (egyutas ANOVA, Dunnett-teszt). Minden minta esetében 3 egymástól független párhuzamost vizsgáltunk.

3.13.4. Citokinézis-blokkolt mikronukleusz (CBMN) teszt

A HepG2 sejteket T-25-ös flaskában $6,5 \times 10^5$ sejt/flaska, 24 órán át, 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú termosztátban tenyésztettük. A sejtmediumot 1 µg szt. mL⁻¹ cianobakteriális kivonatot, illetve 1 µg mL⁻¹ MG-t tartalmazó médiumra cseréltük. A kontroll sejtmedium, a pozitív kontroll CYN (0,5 µg mL⁻¹) és BaP (2,5 µM) volt. A 24 órás expozíciót követően a sejteket Štraser és mtsai. (2011) alapján dolgoztuk fel. 1×PBS-sel mostuk kétszer, és a sejtekhez citokalazin B-t (2 µg mL⁻¹) adtunk, amellyel 26 órán át inkubáltuk, majd a sejteket tárgylemezeken fixáltuk. A fixáláshoz az összes sejtet összegyűjtöttük: a sejtmediummal a lebegő sejteket, majd 1×PBS-sel mostuk a flaskákat, és a 3-4 perces tripszinizálással a letapadó sejteket, melyeket a sejtmediummal való mosással a centrifugacsövekbe gyűjtöttük, és centrifugáltuk (800 rpm, 5 perc, 4°C). A kapott pellet felülúszójának eltávolítása után 1×PBS-ben óvatosan reszuszpendáltuk a sejteket, és ismét centrifugáltuk (800 rpm, 5 perc, 4°C). Ezt a lépést még egyszer

megismételtük, majd a sejtellethez 5 mL 75 mM KCl hipotóniás oldatot (4°C) adtunk cseppenként, óvatosan összeráztuk, és 5 perc inkubálás után centrifugáltuk (600 rpm, 5 perc, 4°C). A felülúszó eltávolítása után 5 mL fixáló oldatot (metanol:ecetsav=3:1 v/v) és 3 csepp formaldehidet adtunk a sejtekhez, és 3 perc után centrifugáltuk (600 rpm, 5 perc, 4°C), amelyet még kétszer megismételtünk formaldehid nélkül. Végül 500 µL felülúszót hagytunk a sejteken, és 100-100 µl-t pipettáztunk fényes felületű tárgylemezre. A detektáláshoz 10 µg mL⁻¹ akridin narancs fluoreszcens festéket és fluoreszcens mikroszkópot használtunk (Eclipse 800, Nikon) (400× nagyítás). A mikronukleuszt tartalmazó sejtek (MNed BNC), mikronukleuszok (MNi), nukleáris rügyek (NBUD) és nukleoplazmahidak (NPB) 1000 db binukleáris sejtben (BNC) számoltuk a Fenech (2000) által leírt kritériumok szerint. A citokinezis-gátlási proliferációs indexet (NDI, nuclear division index) 500 sejt mono-, bi-, tri- és tetranukleáris sejtéből számoltuk a $[M1 + 2M2 + 3(M3 + M4)]/500$ képlet alapján, ahol M1-M4 az 1-4 sejtmagok számát jelenti. A kísérleteinket háromszor, egymástól függetlenül ismételtük meg. A MNi, MNed sejtek, NBUD, NPB számát a kontroll és kezelt csoportok között χ^2 próbával értékeltük, $P < 0,05$ (*). A kontrollhoz képest ≥ 2 -szeres emelkedést biológiailag pozitív válasznak tekintettük. A NDI-beli eltérést egyszempontos ANOVA-val határoztuk meg a kontrollhoz viszonyítva.

3.13.5. DNS kettős száltörés vizsgálata γ H2AX-tesztel

HepG2 sejteket $7,5 \times 10^5$ /T-25 flaska (24 órás kezelés) és 4×10^5 /T-25 flaska (72 órás kezelés) denzitással, 24 órán át, 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú termosztátban tenyésztettük. A sejtmediumot 1 µg szt. mL⁻¹

cianobakteriális kivonatot, illetve $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ MG-t tartalmazó médiumra cseréltük. A kontroll sejtmédium, a pozitív kontroll etopozid ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) volt. A 24 vagy 72 órás expozíciót követően a sejteket fixáltuk. A fixáláshoz az összes sejtet összegyűjtöttük: a sejtmédiummal a lebegő sejteket, majd $1\times\text{PBS}$ -sel való mosást követően a 3-4 perces tripszinizálással a letapadó sejteket, melyeket sejtmédiummal mosva a centrifugacsövekbe gyűjtöttük, és centrifugáltuk (800 rpm, 5 perc, 4°C). A pelletet 5 mL $1\times\text{PBS}$ -sel (4°C) erősen összeráztuk a sejtek különválása végett, majd ismét centrifugáltuk (800 rpm, 5 perc, 4°C). Ezt a lépést még egyszer ismételjük, végül a kapott pelletet 0,5 mL $1\times\text{PBS}$ és 1,5 mL 99,8% etanol jéghideg elegyével cseppenként, vortexelve fixáltuk, és legalább 2 órára 4°C -on, majd egy éjszakán át -20°C -on tároltuk. Mérés előtt, a fixáló oldatot centrifugálással (1200 rpm, 10 perc, 4°C) eltávolítottuk, majd $1\times\text{PBS}$ -sel (4°C) 2-3 percig mostuk a sejteket, és centrifugáltuk (1200 rpm, 7 perc, 4°C). A felülúszó eltávolítása után sötétben hozzáadtuk a 9% γH2AX antitestet (anti-H2AX pS139-FITC) tartalmazó $1\times\text{PBS}$ -t, amellyel 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A jelölt sejteket hideg $1\times\text{PBS}$ -sel mostuk (1200 rpm, 5 perc, 4°C), és 0,5 mL $1\times\text{PBS}$ -sel reszuszpendáltuk (Hercog és mtsai., 2019). Méréseinket MACSQuant® Analyzer 10 áramlási citométerrel, MACSQuantify™ szoftverrel (Miltenyi Biotech, Germany) végeztük. A FITC intenzitást B1-A csatornán detektáltuk. Mindegyik mintában, 10^4 sejtszámú sejtpopulációt mértünk. Kísérleteinket három párhuzamosban végeztük 24 és 72 órás expozícióval. A kontroll és kezelt csoportok közti különbség statisztikai szignifikanciáját R lineáris kevert modell, nlme, és reshape csomagjaival (Pinheiro és mtsai., 2018; R Core Team, 2018; Wickham, 2007) határoztuk meg.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Bárdos-tó - Terepi tanulmány

A Bárdos-tóban a 2000-es évek elején megjelenő mikrocisztin (MC) termelő *Microcystis* domináns vízvirágzást figyelt meg kutatócsoportunk. Az akkor végzett elővizsgálatok és megfigyelések alapján munkánk során valós környezetben bekövetkező és lezajló folyamatokat tanulmányoztunk 3 éven keresztül. Dolgozatunkban vízvirágzásnak nevezzük a cianobakteriális fajok olyan mértékű tömeges elszaporodását, amely során a víz felszínén zavaros, kékes-zöld biomasszát és kellemetlen szagot tapasztaltunk. A 2011-2013 között megjelent vízvirágzásokból azonosított cianobaktérium fajok toxintermelési potenciálját kutattuk. A különböző metagenomikai és metabolomikai biomarkerek átfogó vizsgálatával az MC-termelés dinamikáját, a toxinvariabilitást, a környezeti fitoplankton és vízminták toxinkoncentrációját határoztuk meg. Az MC hatását növényi rendszerekben szintén vizsgáltuk. A *Ceratophyllum submersum* vízi makrofita bioakkumulációs vizsgálata során arra kerestük a választ, hogy *in situ*, MC tartalmú vízterben mi történik az ott élő növényvel. Ugyanakkor a környezeti fitoplankton minták toxicitását *in vitro* MC-szenzitív csíranövény rendszerben is teszteltük.

4.1.1. Cianobaktérium fajok azonosítása

A 2000-es évek elején laboratóriumunk elővizsgálatai során megfigyeltük, hogy a Gyulán található Bárdos-tóban *Microcystis aeruginosa* okozta toxikus vízvirágzás jelent meg (Farkas és mtsai., 2014). Ez a mesterséges

víztér horgásztóként funkcionál, amelynél fontos szempont a víztér folyamatos monitorozása és tisztaságának megőrzése.

A Bárdós-tóból, 3 éven keresztül, 2011-2013 között gyűjtött vízvirágzás minták mikroszkópos vizsgálata alapján a vízvirágzást alkotó fajok összetétele, és azok aránya is eltért (6. táblázat). Eredményeinkből kiemelendő, hogy a 2012. augusztusi vízvirágzásban, nagy mennyiségű cianobaktérium biomasszával *Microcystis sp.* volt a domináns vízvirágzás alkotó, mely genusz jelenlétét a további vízvirágzásokkor is, eltérő arányban detektáltuk.

6. táblázat. A Bárdos-tóból a mintavételek során azonosított cianobaktérium fajok összetétele és arányuk.

Mintavétel	Fajok
2011.08.03.	<i>Planktothrix agardhii</i> – 80% <i>Microcystis sp.</i> – 10% <i>Anabaena spiroides</i> – 5% <i>Anabaenopsis hungarica</i> – 5%
2011.10.17.	<i>Planktothrix agardhii</i> – 80% <i>Microcystis sp.</i> – 10% <i>Anabaena spiroides</i> – 5% <i>Anabaenopsis sp.</i> – 5%
2012.08.22.	<i>Microcystis sp.</i> – 90% <i>Anabaena sp.</i> – 5% <i>Planktothrix agardhii</i> – 5%
2013.07.08.	<i>Planktothrix agardhii</i> – 70% <i>Anabaena spiroides</i> – 15% <i>Anabaena circinalis</i> – 15%
2013.08.26.	<i>Planktothrix agardhii</i> – 70% <i>Microcystis sp.</i> – 20% <i>Anabaena spiroides</i> – 5% <i>Anabaena circinalis</i> – 5%

Ellenben a 2011-es és 2013-as vízvirágzásokban a *Planktothrix agardhii* volt domináns, *Microcystis sp.* alig, vagy egyáltalán nem volt jelen ezekben az időszakokban. Az eutróf vizekben mindkét faj gyakori, azonban megfigyelték, hogy a különböző környezeti feltételek megfelelő kombinációjának hatására (hőmérséklet, pH, N:P aránya) a cianobakteriális tömegprodukciónak eltolódhat a *Microcystis aeruginosa* vagy *Planktothrix agardhii* dominanciájának irányába (Yunes, 2019). Esetünkben a 2012-es év volt a kedvező a *Microcystis sp.* túlszaporodásának. Ebben az évben az alábbi paramétereket mértük a vízvirágzás területén: vezetőképesség: 647 $\mu\text{S cm}^{-1}$, pH: 7.9, hőmérséklet 26,4 °C. A *Microcystis spp.* túlsúlyba kerülését, afelé történő faji eltolódást a hőmérséklet optimummal ($\geq 25^\circ\text{C}$) is összefüggésbe hozták, azonban azt a következtetést vonták le, hogy nem magyarázza egyértelműen egy faj dominanciáját a közösségben (de la Escalera és mtsai., 2017; Yunes, 2019).

A *Microcystis sp.* és *Planktothrix agardhii* fajok ugyanakkor ismertek MC termelők (Catherine és mtsai., 2017). Hazánkban ezen két genusz MC termelését számtalanszor megfigyelték az utóbbi évtizedek során (Bácsi és mtsai., 2011; Farkas és mtsai., 2014; Vasas és mtsai., 2013). Mivel azonban a morfológiai azonosítás nem elegendő a toxintermelő egyedek meghatározásához, ezért a gyűjtött fitoplankton mintákból toxingén vizsgálatot végeztünk.

4.1.2. Mikrocisztin termelésért felelős génklaszterek analízise

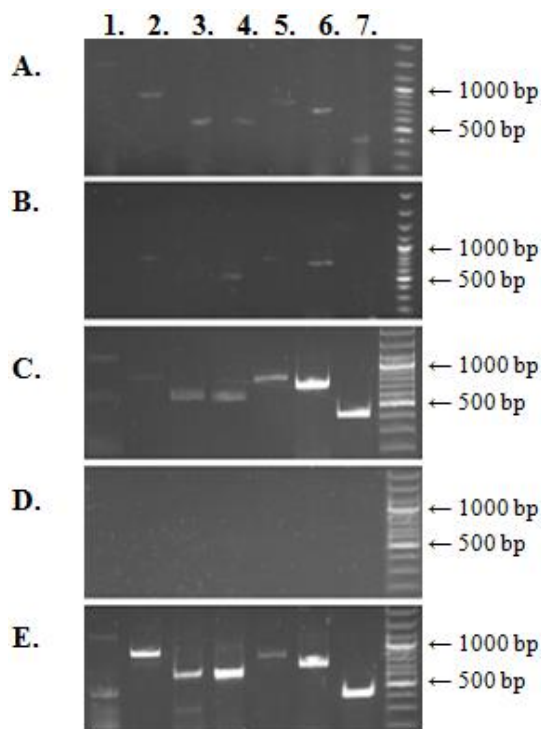
A metagenom analízis során a környezeti minták DNS-éből PCR-rel megvizsgáltuk a *Microcystis sp.* és *Planktothrix sp.* specifikus *mcy* géneket. Vizsgálataink alátámasztják az MC termelő genotípusok

előfordulását a környezetben, valamint igazolják hipotézisünket, miszerint az elővizsgálatok során korábban már detektált, toxintermelő *Microcystis* a felelős a toxintermelésért. Mindkét faj esetében jól karakterizált, MC bioszintézis génklasztereket írtak le, amelyek azonban felépítésükben különböznek (Christiansen és mtsai., 2003; Tillett és mtsai., 2000).

Eredményeink azt mutatták, hogy az *mcy+*/*mcy-* genotípusú *Microcystis* populációk relatív aránya eltért a három év során, és az *mcy+* genotípus a 2012-es évben szaporodott el a legnagyobb mértékben a környezetben.

A *Microcystis sp.* specifikus vizsgált összes gént (*mcyA-E, G*) a 2011.08.03. (4. ábra/A), a 2012.08.22 (4. ábra/C), és 2013.08.26 (4. ábra/E) mintákból detektáltuk. A 2011.10.17-i időpontban (4. ábra/B) csak hiányosan (*mcyB, mcyD1, mcyD2, mcyE* géneket), míg a 2013.07.08. (4. ábra/D) mintában egyik toxingént sem detektáltuk. Az általunk vizsgált *Microcystis* specifikus nagy, multienzim peptid szintáz gének (*mcyA, mcyB, mcyC, mcyD, mcyE, mcyG*) esszenciálisak, és hiánytalan jelenlétük nélkülözhetetlen az MC termeléséhez (Tillett és mtsai., 2000).

A *Planktothrix sp.* specifikus génklaszter elemei közül csupán az *mcyT* gént detektáltuk az összes minta esetében (7. táblázat). Az *mcyT* régió nem határozza meg az MC termelődést önmagában, és detektálása nem ad pontos választ az MC-termelő *Planktothrix* egyedek meghatározására terepi mintákból, ugyanis ez a fragment a nem-termelőkben is előfordulhat. Azonban a *Planktothrix* és *Microcystis* fajok elkülönítésére megfelelő biomarker lehet (Mbedi és mtsai., 2005; Welker és Von Döhren, 2006).



4. ábra. A *Microcystis* specifikus *mcy* génklaszter detektálása az (A.) 2011. 08. 03.; (B.) 2011. 10. 17.; (C.) 2012. 08. 22.; (D.) 2013. 07. 08. és (E.) 2013. 08. 26. mintavételi időpontokból. Az 1. *mcyA*, 2. *mcyB*, 3. *mcyC*, 4. *mcyD1*, 5. *mcyD2*, 6. *mcyE*, 7. *mcyG* fragmentek a gélelektroforézis során kapott sávok. DNS marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

7. táblázat. A *Planktothrix* specifikus *mcy* génklaszter vizsgálata során kapott eredmények. (-) nem detektált, (+) detektált génfragmentek.

	2011.08.03.	2011.10.17.	2012.08.22.	2013.07.08.	2013.08.26.
<i>mcyA</i>	-	-	-	-	-
<i>mcyB</i>	-	-	-	-	-
<i>mcyCJ</i>	-	-	-	-	-
<i>mcyHA</i>	-	-	-	-	-
<i>mcyE</i>	-	-	-	-	-
<i>mcyEG</i>	-	-	-	-	-
<i>mcyT</i>	+	+	+	+	+
<i>mcyTD</i>	-	-	-	-	-

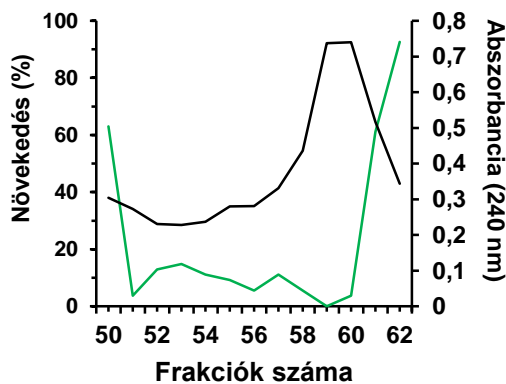
Vizsgálatunk alátámasztja a korábbi megfigyeléseket, miszerint egy cianobakteriális populáción belül különböző genotípusok jelenhetnek meg, és előfordulhat, hogy csak néhány tartalmazza a mikrocisztin termelésért felelős géneket (Kurmayer és mtsai., 2002; Welker és Von Döhren, 2006). A környezeti faktorok befolyásolhatják a toxikus genotípusok előfordulását. Ezek a környezeti faktorok többek között a fény intenzitása és időtartama, a víz mozgása és áramlása, az allelopatikus hatások, a kompetíció a növényevőkkel és a tápanyag forrásokért, a tápanyagok koncentrációja és aránya, a víz hőmérséklete, sótartalma, valamint a sejtosztódási és növekedési ráta (Neilan és mtsai., 2013).

A legtöbb tanulmányban célzott a cianotoxin bioszintézis gének vizsgálata, amely különösképpen a mikrocisztineknél jól definiált. Ez a konvencionális PCR alapú módszer a mintában lévő gének meglétéről vagy hiányáról nyújt információt, amely hasznos lehet a vízvirágzás korai analízisében, amikor még a toxinkoncentráció túl alacsony a detektáláshoz. Azonban nem ad információt a toxikus sejtek arányáról a víztérben vagy a cianobaktérium populáción belül (Humbert, 2017).

A vizsgálataink alapján tehát a környezeti mintákból a MC termeléshez nélkülözhetetlen géneket hiánytalanul csak az augusztusi időpontokban detektáluk. Ez lényeges, hiszen magyarázza, és alátámasztja a környezeti minták toxintartalmának és bioaktivitásának mérése során kapott eredményeinket is, amelyet lentebb mutatunk be.

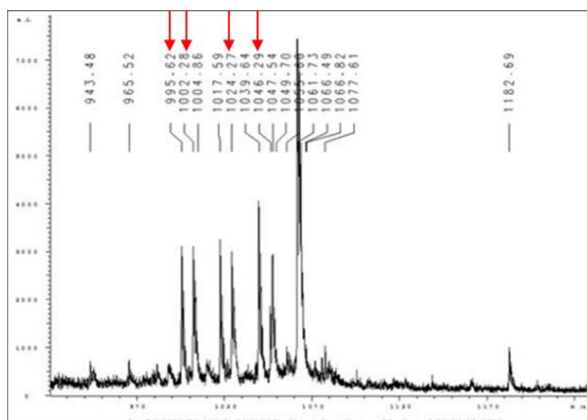
4.1.3. Mikrocisztin tisztítása és variánsok meghatározása

A 2012-es vízvirágzás jelentős mértékű cianobaktérium biomasszát termelt, amelyből nagyobb mennyiséget gyűjtöttünk. A környezeti minta bioaktív peptid mintázatának meghatározásához MC-t tisztítottunk, amellyel célunk a mintában lévő variánsok meghatározása volt. A toxintisztítás folyamán a komplex cianobakteriális kivonathoz képest egy kevésbé összetett frakcióhoz jutottunk, amelyből ezáltal pontosabb, átláthatóbb mérési eredményeket kaphatunk MALDI-TOF analízissel. A kromatográfias tisztítás során a frakciók abszorbanciáját az MC-re jellemző UV-spektrum alapján, 240 nm-en mértük. Az eluált frakciók bioaktivitását mustár csíranövénytesztel igazoltuk. Az MC tartalmú frakciók növekedésgátló hatását megfigyeltük, ahol magasabb ($\geq 0,25$) abszorbancia értékek és alacsony ($\leq 20\%$) növekedést mértünk (5. ábra). Ezen frakciókat összeöntve vizsgáltuk a peptidmintázatot MALDI-TOF analízissel.



5. ábra. A DEAE-cellulóz oszlopról eluált frakciók mustár csíranövénytesztel és spektrofotométerrel 240 nm-en mért abszorbanciájának összevetése (fekete vonal: abszorbancia, zöld vonal: csíranövény növekedése). A növekedés mértékét a kontrollhoz (steril bidesztillált víz) viszonyítva %-ban határoztuk meg.

A tisztított frakcióból több mikrocisztin variánst azonosítottunk (6. ábra): MC-LR ($M+H^+=995.62$), MC-YR ($M+H^+=1046.29$), [Dha7] MC-RR ($M+H^+=1024.27$) és MC-LY ($M+H^+=1002.28$), amelyek közül a MC-YR adta a legintenzívebb csúcsot. Ezek a variánsok a környezeti előfordulásukat tekintve szokványosnak mondhatók, hiszen több tanulmány leírta, hogy a természetben leggyakrabban előforduló toxin variánsok a *Microcystis sp.* vízvirágzások során a MC-LR, -YR és -RR (Buratti és mtsai., 2017; Gkelis és mtsai., 2015; Turner és mtsai., 2018). Ezért is indokolt, hogy a mikrocisztinek hatásmechanizmusának kutatása során legtöbbször alkalmazott variáns az MC-LR az *in vitro* toxikológiai tesztekben (Žegura, 2016).



6. ábra. A tisztított frakciók MALDI-TOF spektruma.

Kutatócsoportunk a korai analízisek során a vízvirágzás fitoplankton mintából a [Dha7] MC-RR, MC-RR és MC-WR variánsokat azonosította (Farkas és mtsai., 2014). Látható tehát, hogy nem csak az *mcy+* és *mcy-* törzsek megjelenése, de az MC kémiai variabilitása is akár évről évre változhat. Ennek hátterében a *Microcystis* törzsek *mcy* szintetáz adenilációs domén régiójának (*mcyB*, *mcyC*) gyakori rekombinációs és további

pontmutációs eseményei állhatnak, amelyek magas MC variáns diverzitást eredményezhetnek. A *Microcystis mcyB* génen belüli genetikai diverzitás nem okoz specifikus szubsztrát aktivációt az MC bioszintézis során, azonban a környezeti hatásoknak, az aminosav hozzáférhetőségének és a sejtmétabolizmus hatásainak szerepe lehet az MC variánsok szintézisében (Kurmayer és mtsai., 2002; Tooming-Klunderud és mtsai., 2008 Catherine és mtsai., 2017).

A peptidmintázat jelentős mértékben meghatározó a toxicitás szempontjából, amely függ az egyes MC variánsok megjelenésétől és egymáshoz viszonyított arányától. A továbbiakban a víztér sejtmentes frakcióinak (extracelluláris MC) és a fitoplankton biomasszájának a (intracelluláris MC) toxintartalmát határoztuk meg, valamint ezen két frakció növényekre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk.

4.1.4. Mikrocisztin koncentrációk meghatározása a víztérből

A víztérben mért MC koncentráció fontos információt szolgáltat, hiszen az MC a cianobaktérium sejtek lízisét követően kerül a víztérbe, amely ezáltal folyamatos toxin utánpótlást biztosít. Az ismert perzisztens MC egyes variánsai rendkívül stabilak, és akár hetekig-hónapokig a víztérben maradnak. Ugyanakkor, a toxin termelődése, vizekben való előfordulása nem mindig jár óriási biomasszával, a biomassza és toxin tartalom között nincs egyértelmű összefüggés (Yunes, 2019).

Az elővizsgálatok során a Bárdos-tó fitoplankton minta nagy mennyiségű, 15,701 mg MC-LR ekvivalens szt. g⁻¹ koncentrációjú intracelluláris MC-t tartalmazott (Farkas és mtsai., 2014). Az akkori vizsgálatokat alapul véve egy részletesebb, átfogó mérést végeztünk, több mintavételi ponttal. Két

területről vettünk vízmintákat: a vízvirágzástól távolabb eső, kontroll területről, és a vízvirágzás területéről (3. ábra). Eredményeink alapján 2012 augusztusában a kontroll területen nem detektáltunk extracelluláris mikrocisztint, azonban a vízvirágzás területéről származó sejtmentes vízmintából $7,31 \pm 0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ MC koncentrációt mértünk (8. táblázat).

Az extracelluláris MC mellett az intracelluláris MC tartalom is fontos a toxicitás szempontjából, amely az extracelluláris MC tartalom folyamatos utánpótlását biztosítja. Ezért a vízvirágzás területéről származó fitoplankton minták intracelluláris MC tartalmát is vizsgáltuk. A kapott eredmények alapján 2012 augusztusában $4,959 \mu\text{g mg}^{-1}$ és 2013 augusztusában $0,449 \mu\text{g mg}^{-1}$ koncentrációban, az előző évhez képest egy nagyságrenddel kevesebb MC-t határoztunk meg (8. táblázat). A többi mintavételi időpont esetében nem tartalmazott detektálható mennyiségű MC-t a fitoplankton kivonat.

8. táblázat. A vízvirágzás minták fitoplanktonból (intracelluláris), és víztérből mért (extracelluláris) MC tartalma. n.d.=nem detektált.

	Intracelluláris MC ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Extracelluláris MC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2012.08.22.	$4,959 \mu\text{g mg}^{-1}$	$7,31 \pm 0,17 \mu\text{g L}^{-1}$
2013.08.26.	$0,449 \mu\text{g mg}^{-1}$	n.d.

Az előzetesen mért intracelluláris MC tartalom a jelen tanulmányban mért legmagasabb intracelluláris MC tartalomhoz képest több mint háromszor magasabb. Ugyanakkor a 2011-2013 időszakban zajló vizsgálataink során detektált MC koncentrációk is jelentősnek mondhatók. A WHO szerint a rekreációs vízterekben a $2-10 \mu\text{g L}^{-1}$ MC az alacsony kockázati határértékbe esik, míg a $10-40 \mu\text{g L}^{-1}$ közepes kockázatot, a $> 40 \mu\text{g L}^{-1}$

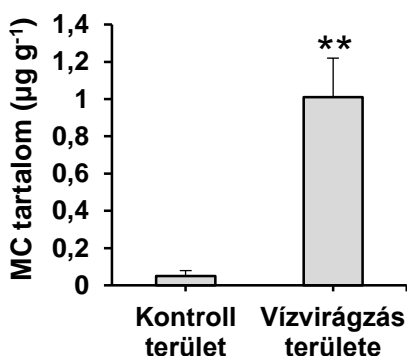
magas kockázatot jelent (Gkelis és mtsai., 2015). Viszont az ivóvizekre meghatározott határérték ennél jóval alacsonyabb ($1 \mu\text{g L}^{-1}$ MC-LR) (WHO, 2017).

Európa-szerte változó MC koncentrációkat mértek természetes vizekben. Német vizekben $36 \mu\text{g L}^{-1}$, Portugáliában $37 \mu\text{g L}^{-1}$ maximum koncentrációban (Ueno és mtsai., 1996), míg az Egyesült Királyságban nagyságrendekkel magasabb koncentrációt, $42,7 \text{ mg L}^{-1}$ MC-t (Turner és mtsai., 2018). Több európai ország átfogó vizsgálatakor többek között Franciaország, Olaszország, Írország, Németország természetes vizeiből azonban $< 3 \mu\text{g L}^{-1}$ koncentrációban mértek MC-t (Greer és mtsai., 2016). Az intracelluláris MC tartalmat környezeti faktorok is módosíthatják. Ezért a környezeti mintákban az MC termelés nem csak az MC termelő és nem termelő törzsek arányától függ. Az egyes termelő törzsek között is akár három-négy nagyságrenddel nagyobb lehet a termelődött MC mennyisége (Kurmayer és mtsai., 2002). Ezért fontos az eutróf vizekben gyakrabban, több pontból történő környezeti víz és fitoplankton mintavétel a potenciális káros környezeti hatások felmérésére és kockázatelemzésére.

4.1.5. Mikrocisztin hatása növényi rendszerekben

Az intracelluláris és extracelluláris MC tartalom hatásait egyaránt elemeztük növényi rendszerekben. Mivel a vizekben perzisztens MC hosszabb távon is hatással lehet az élőhely biótáira, ezért az extracelluláris MC *in situ* bioakkumulációját *Ceratophyllum submersum*-ban vizsgáltuk. Arra kerestük a választ, hogy mi történik a MC-t tartalmazó környezetben a növényvel a valós élőhelyén.

A 2012-es évben a víztér kontroll és vízvirágzásos területéről gyűjtöttünk az ott jellegzetes *C. submersum* (sima tócsagaz) vízi makrofitából mintákat (3. ábra). Az ELISA méréseink alapján a teljes MC koncentrációt a vízvirágzás területéről származó *C. submersum* mintában $1,01 \pm 0,21 \mu\text{g}$ szt. g^{-1} -nak határoztuk meg, míg a kontroll területről gyűjtött mintában $0,05 \pm 0,03 \mu\text{g}$ szt. g^{-1} mikrocisztin koncentrációt mértünk (7. ábra).



7. ábra. A *Ceratophyllum submersum* hajtásból mért mikrocisztin (MC) tartalom. A minták a vízvirágzás és attól távol eső (kontroll) területéről származnak (2012). Statisztikailag szignifikáns különbség $P < 0,01$ (**).

Méréseink tehát olyan növényen történtek, amelyben az MC akkumulációja valós környezetben zajlott. A növényi szövetből mért MC tartalom erősen korrelál a víztérből mért MC koncentrációjával. Ugyanakkor megfigyelhetjük, hogy a kontroll területéről gyűjtött *Ceratophyllum submersum*-ban is alacsony koncentrációban detektáltunk MC-t. Ez nem meglepő, hiszen megfigyelték, hogy a cianobakteriális sejtek lízisét követően a MC a környező vizekbe jut, amely óriási koncentrációkat is eredményezhet a víztérben akár alacsony sejt-tömeg esetén is, és több hétig perzisztál (Corbel és mtsai., 2014; Turner és mtsai., 2018). Az extracelluláris MC a vízvirágzást követően hígulhat, üledéken lerakódik, biodegradálódik és/vagy a vízi szervezetekbe bekerül. Ezen folyamatok eredményeképpen, a MC a környezetben négy fő formában van jelen: a sejtben, a vízben oldott toxinként, bioakkumulálódva, és az

üledéken (Song és mtsai., 2015). Továbbá a fotokémiai (napfény UV) és bakteriális degradáció tovább gyorsítja a víztérből történő toxinkoncentrációk csökkenését (Corbel és mtsai., 2014). A vízi növények általában képesek a toxikus anyagok biotranszformációjára, amelynek következtében azok kevésbé toxikus vegyületekké alakulnak, majd a sejtek vakuólumaiban tárolódnak (Romero-Oliva és mtsai., 2014).

Tanulmányunkhoz szorosan kapcsolódik a DE TTK Növénytan Tanszék, Fotoszintetizáló szervezetek sejt- és fejlődésbiológiája kutatócsoport tagjainak megfigyelései, akik a citológiai, hisztológiai és biokémiai változásokat kutatták a terepről gyűjtött *C. submersum* növényben. Az általuk megfigyelt főbb elváltozásokat a 9. táblázat foglalja össze. Lényeges megjegyezni, hogy mégha nincs is szabadszemmel látható elváltozás a növényen, sejtszinten komoly interakciók játszódhatnak le. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a víztérben lévő MC a növényben számos hisztológiai, citológiai, biokémiai változást indukált. A pigment és teljes protein tartalomból kiderült, hogy az MC biotikus stresszt indukált, amely mellett a stressz védekezőképesség csökkenését figyelték meg. Továbbá a megfigyelt jelenségek magyarázzák a merisztéma szövetben a citoskeletális szerveződésben bekövetkezett elváltozásokat, és a sejthalál indukcióját. A H3 hiszton hiperfoszforilációja pedig az MC protein foszfatáz inhibitor aktivitását bizonyítja.

9. táblázat. Kontroll és vízvirágzásos területről származó *Ceratophyllum submersum* növényen megfigyelt citológiai, hisztológiai és biokémiai változások a Máthé és kutatócsoportja, és M-Hamvas és kutatócsoportja munkája alapján.

	Kontroll terület	Vízvirágzás területe
Pigment tartalom	normál klorofill-a, b koncentráció	
	normál karotinoid tartalom	alacsonyabb karotinoid tartalom (27%-kal); karotinoid-klorofill arány csökkent
	normál antocianin tartalom	jelentősen alacsonyabb antocianin tartalom (> 80%-kal)
Fehérje tartalom	normál koncentráció	jelentős magasabb szolubilis fehérje tartalom (> 75%-kal)
Hajtáscsúcs morfológia	nincs elváltozás	rövidült, kiszélesedett és radiálisan duzzadt hajtáscsúcs; oldalrügyek korai kialakulása
Osztódó szövet	normál kromatin organizáció	sejtmag és kromatin degradáció a merisztéma sejtekben; egészséges és nekrotikus sejtek is előfordultak
Sejtmag autofluoreszcencia	normál háttér autofluoreszcencia	magas autofluoreszcencia: oxidált aromás (fenolos) vegyületek akkumulálódása, oxidatív stressz folyamatok indukálása
H3Ser10ph a hajtáscsúcs osztódó sejtben	normál foszforiláció	metafázis során hiperfoszforiláció rendellenes testvérkromatida szegregáció
Pirogallol-peroxidáz aktivitás	magas peroxidáz aktivitás (pH 7.5)	40%-kal alacsonyabb aktivitás (pH 7.5)
Nukleáz aktivitás	normál aktivitás	emelkedett ssDNáz, dsDNáz aktivitás
Proteáz aktivitás	11 izoenzim normál aktivitás	7 izoenzim magasabb, 2 alacsonyabb, 2 normál aktivitással

A szakirodalomban számos vízi és szárazföldi növényben vizsgálták a mikrocisztinek bioakkumulációját (Diez-Quijada és mtsai., 2019b; McElhiney és mtsai., 2001; Mitrovic és mtsai., 2005; Pham és Utsumi, 2018; Romero-Oliva és mtsai., 2014; Saqrane és mtsai., 2008). Azonban ezek gyakran laboratóriumban beállított vizsgálatok tápoldatban vagy táptalajon nevelt növényekkel, ahol akár környezetileg nem releváns, magas (5 mg L^{-1}) MC-LR koncentrációkat is alkalmaztak, és a további környezeti hatások nem érvényesültek (Pflugmacher, 2002).

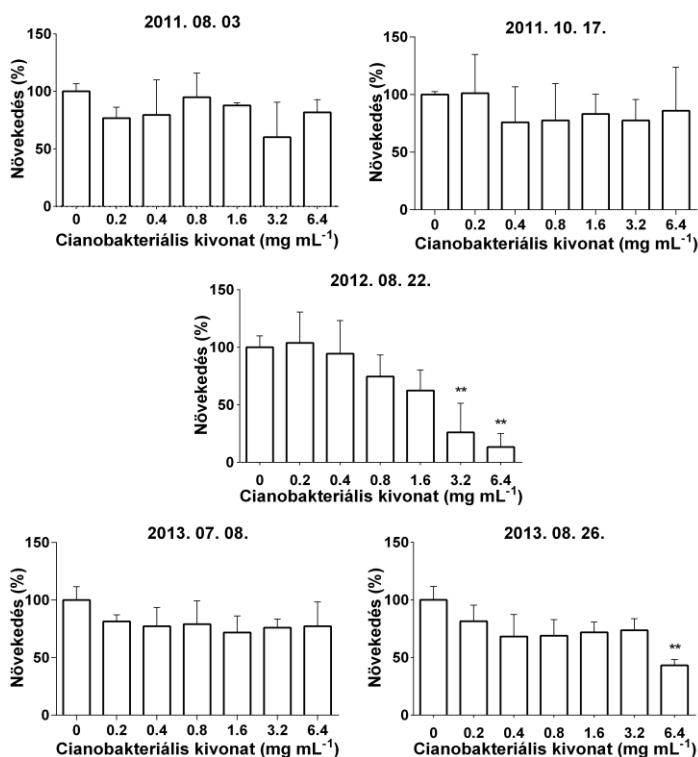
Az MC akkumulációját megfigyelték számos lebegő és alámerülő vízi növény esetében, mint a *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis*, *Vesicularia dubyana*, *Phragmites australis*. Ez elérte akár a $16,9 \text{ mg szt. g}^{-1}$ -ot is. Eredményeikből arra következtettek, hogy az MC akkumulációja függ a toxin dózistól és az MC variánstól, az expozíció módjától és idejétől, a cél szervektől vagy szövetektől, valamint az akkumuláló fajtól (Pham és Utsumi, 2018). Ezenkívül megfigyelték, hogy a gyökérrendszeren keresztül nagyobb mértékű az abszorpció (Saqrane és mtsai., 2009). További bioakkumulációs mérésekből azt tapasztalták, hogy *Lemna minor* képes akár $0,3 \text{ ng nt. mg}^{-1}$ MC-t akkumulálni 5 napos 20 mg L^{-1} MC-nek kitéve, amely $58 \text{ ng g}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ akkumulációs rátának felelt meg (Mitrovic és mtsai., 2005). *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa*, *Hydrilla verticillata* vízi makrofitákkal sejtmentes nyers kivonatból ($104,4 \pm 7,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ MC) idő függvényében történő MC felvételét, bioakkumulációját és biotranszformációját tanulmányozták, amelyből kiderült, hogy ezek a növények életképesek magas mikrocisztin koncentráció mellett is, és a bioakkumulációs és antioxidáns védekező mechanizmusok aktiválása révén a természetes vizek MC eliminációjában fontos szerepük lehet (Romero-Oliva és mtsai., 2015).

Ugyanakkor a szárazföldi növények MC akkumulációjának is fontos szerepe van, ugyanis a fogyasztásra alkalmas részekben is képes szennyezett öntözővíz révén abszorbeálódni a toxin. Ezt figyelték meg saláta, sárgarépa és zöldbab MC-LR tartalmú vízzel való öntözésekor. A legnagyobb mértékű abszorpció a gyökéren keresztül történt, azonban a talajban is hosszú ideig (8-10 hét) magas MC koncentrációt mértek, amely a toxin perzisztenciájára utal (Lee és mtsai., 2017). *Sinapis alba* 7 napos csíranövény MC feltételének vizsgálata során a $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ^3H -dihidro-MC-LR radioaktívan jelölt toxinnal való kezelést követően $5,3 \text{ mg kg}^{-1}$ akkumulált toxinkoncentrációt számoltak. Ugyanakkor ezzel azt is bizonyították, hogy egyes növények már a korai fejlődési stádiumban képesek a toxin felvételére és akkumulációjára (Kurki-Helasma és Meriluoto, 1998). Salátában (*Lactuca sativa*) mikrocisztin tartalmú vízben (Karla víztározó, Görögország) a legmagasabb MC koncentrációt a mag stádiumban mérték, míg a későbbi növekedési fázisokban a gyökérben volt a legnagyobb a toxin koncentrációja (Levizou és mtsai., 2017). A szárazföldi növényekben okozott hatások skálája változik a csíranövények fejlődésének gátlásától a stimulációjáig, továbbá a PP1 és PP2A aktivitásának csökkenését, oxidatív stresszt, csökkent fotoszintetikus aktivitást, DNS károsodást és apoptózist okozhat (Bittencourt-Oliveira és mtsai., 2016; Corbel és mtsai., 2014; Machado és mtsai., 2017).

A fentebb leírt megfigyelések alátámasztása végett a vízvirágzások növényre gyakorolt hatását *in vitro* rendszerben is tanulmányoztuk. A kutatócsoportunk előzetes vizsgálatait során megfigyeltük a mustár csíranövénytesztben a környezeti minta növekedésgátló hatását ($\text{IC}_{50} 245 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Farkas és mtsai., 2014). A gátló hatás és a vízvirágzás MC

tartalma (15,701 mg MC-LR ekvivalens szt. mL⁻¹) között pozitív korreláció volt.

A 2012. augusztusi vízvirágzás kivonat volt a legtoxikusabb, 3,2 mg mL⁻¹ koncentrációban jelentősen gátolta a növekedést, melynek IC₅₀ értéke 2,145 mg mL⁻¹. A 2013. augusztusi minta kevésbé bizonyult toxikusnak, azonban 6,4 mg mL⁻¹ koncentrációnál szintén jelentős növekedésgátlást eredményezett (IC₅₀ 5,678 mg mL⁻¹). Látható továbbá, hogy a két kivonat általi gátlás a koncentráció függvényében változott, a többi vizsgált kivonat azonban nem volt jelentős hatással a csíranövények növekedésére (8. ábra). Megfigyelték, hogy az egyes MC variánsok szerin-treonin típusú protein foszfatáz inhibitor aktivitása eltér (Ikehara és mtsai., 2009). A növekedésgátló aktivitás összefügg a protein foszfatázok inhibíciójával (Kurki-Helasma és Meriluoto, 1998). A protein foszfatázok gátlásának vizsgálatakor, 4 napos fehér mustár csíranövény gyökerében az MC-LR a teljes PP1 és PP2A aktivitásra is hatással volt (IC₅₀ 0,5 µg mL⁻¹), míg a hajtásban mérve jóval alacsonyabb koncentrációban (≤ 0,01 µg mL⁻¹) váltott ki enzimgátlást, a PP1 aktivitás inhibíciójának IC₅₀ értéke pedig < 1 nM (1 ng mL⁻¹) volt (Máthé és mtsai., 2013b). Több MC variáns PP1 és PP2A inhibitor aktivitásának vizsgálatakor megfigyelték, hogy az erősségük a MC-LR>RR>YR trendet követi, amely azonban a protein foszfatázok forrásától, természetétől (vad, rekombináns) és tisztaságától függően eltérhet (Garibo és mtsai., 2014; Ikehara és mtsai., 2009).



8. ábra. Bárdos-tóból gyűjtött vízvirágzás kivonatok (0,2-6,4 mg mL⁻¹) mustár csiranövény növekedésére kifejtett hatása 72 óra elteltével. A növekedés mértékét a kontrollhoz (0, steril bidesztillált víz) viszonyítva százalékban fejeztük ki. Sztatistikailag szignifikáns különbség $P < 0,01$ (**).

A vizsgálataink során megfigyelt vízvirágzás fitoplankton minták növekedésgátló aktivitása tehát alátámasztja a fentebb leírt toxicitási biomarkerek vizsgálata során kapott eredményeket, miszerint a 2012. augusztusi vízvirágzásból *Microcystis mcy+* genotípusú populáció nagymértékű elszaporodása miatt a víztérben nagy mennyiségű MC termelődött. Ez a vízvirágzás volt a legtoxikusabb a többihez képest. Ugyanakkor alacsonyabb mennyiségben a 2013. augusztusi vízvirágzás során is termelődött MC, mely kisebb mértékű növekedésgátlást indukált.

Összegezve, a jelen terepi tanulmány a kutatócsoportunk előzetes megfigyelésein alapult, amely szerint a *Microcystis* alkotta vízvirágzás óriási mennyiségű MC-t termelt, amelynek toxicitását *in vitro* növényi rendszerben is kimutattuk. A tanulmányunkban 3 éven keresztül (2011-2013) vizsgáltuk a víztérben előforduló és valós élettérben lejátszódó jelenségeket. A Bárdos-tóban 2012 augusztusában *Microcystis sp.* domináns vízvirágzást figyeltünk meg. Ez eltért a 2011-es és 2013-as évektől, ahol *Plankothrix agardhii* volt a fő vízvirágzást alkotó faj. A metagenom analízis bizonyította, hogy a *Microcystis sp.* a felelős az MC termelésért. A toxingének jelenléte és a mért toxinkoncentrációk, valamint a csíranövényen megfigyelt hatások között erős korreláció van. A 2012. augusztusi toxikus vízvirágzás során azonosított peptidmintázatból kiderült, hogy gyakori MC variánsok jelentek meg, amelyek között a rendkívül erős protein foszfatáz gátló MC-LR variánst is detektáltuk. A valós térben megfigyelt toxin akkumulációja a víztérben és az ott élő *Ceratophyllum submersum*-ban igazolta, hogy az MC hosszú időn át a víztérben marad, és a toxin akkumulációja révén a sejtszintű folyamatokra is káros hatással lehet. Ugyanakkor a *C. submersum* nagy mértékű MC akkumulációs potenciálja miatt alkalmas lehet a víztérben történő fitoremediációra. A vízvirágzások fitoplankton mintáinak növekedésgátló aktivitása alátámasztotta a 2012. augusztusi vízvirágzás toxikusságát. Eredményeink rámutattak annak jelentőségére, hogy több olyan tanulmányra van szükség, ahol a toxikus vízvirágzásokhoz kapcsolódóan a valós környezetben lezajló folyamatokat átfogóan vizsgálják.

4.2. *In vitro* oligopeptid vizsgálatok

Tanulmányunk második részében egy kevésbé ismert cianobakteriális oligopeptid csoport, a mikrogininek (MG) toxicitását vizsgáltuk. A kutatócsoportunk előzetes munkája során olyan *Microcystis sp.* törzseket szelektáltunk ki környezeti mintákból, amelyek mikroginin termelők voltak. Ezen törzsek izolálását követően tenyészeteket indítottunk, amely révén a cianobaktériumokkal termeltettünk mikroginineket. Ennek jelentősége, hogy az MC-vel ellentétben az MG-hez nehéz hozzájutni, forgalomban alig van, és így a leírt hatásokról is kevés ismeret áll rendelkezésre. Ennek érdekében kidolgoztuk az MG tisztítására alkalmas hatékony kromatográfias módszert. Az előző tanulmánnyal ellentétben ez a rész a mikrogininek toxicitását mutatja be *in vitro* növényi és humán sejtes tesztszerekben.

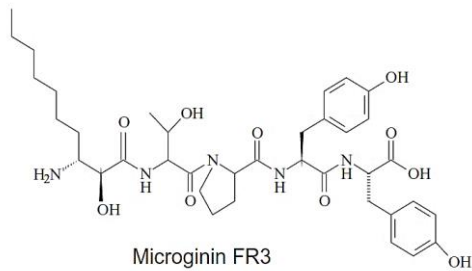
4.2.1. Oligopeptidek azonosítása LC-MS-sel

Két *Microcystis* izolátummal dolgoztunk, a törzsek a B-14-01 és az F-14/9-S12-4-A-01 kódszámot kapták az előfordulásuk alapján (Riba és mtsai., 2019). A B-14-01 cianobakteriális törzsből a teljes kivonat tömegspektrometriás (LC-MS) analízise során kapott csúcsok és azokhoz tartozó fragmentációs mintázat alapján négy MG variánst azonosítottunk, és egy MG-szerű metabolitot (10. táblázat). Az F-14/9-S12-4-A-01 törzs szintén MG termelő, azonban ennél a törzsnél 3 variánst azonosítottunk, a cyanostatin B (68,11%), MG GH787 (29,32%) és MG FR3 (2,57%) variánsokat, amelyek aránya eltérő volt a kivonatban. Tehát ebben a két izolátumban hasonló volt az MG variánsok termelése.

10. táblázat. A B-14-01 törzsből azonosított mikroginin variánsok aminosav sorrendje LC-MS/MS fragmentációs mintázat alapján. A Leu és Ile aminosavak LC-MS alapján nem megkülönböztethetők, ott a szakirodalmi adatokat vettük figyelembe. A teljes kivonatban található mikroginineket a teljes csúcs alatti terület százalékos arányában határoztuk meg. A *-gal jelölt variánsokat detektáltuk az F-14/9-S12-4-A-01 törzsből is.

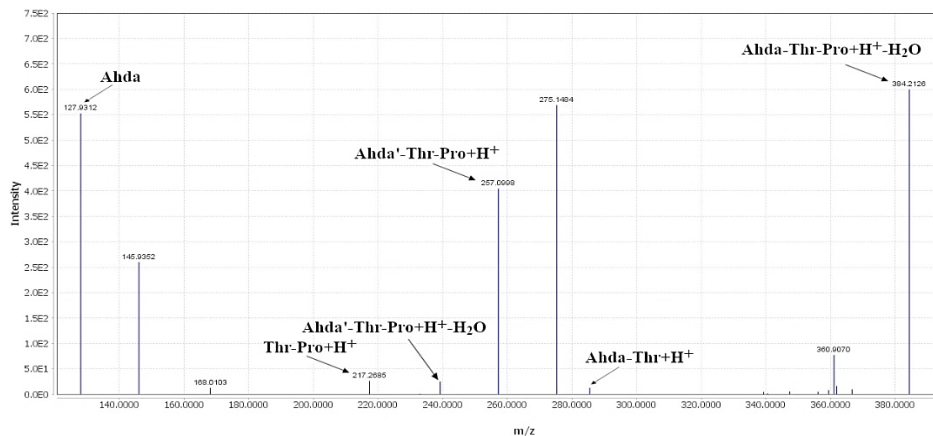
Mikroginin variáns	m/z [M+H ⁺]	Aminosav sorrend	Csúcs alatti terület (%)	Referencia
MGL 402	402,2	Ahda-Thr-Pro	1,02%	Ujvárosi és mtsai., 2020
MG 565	565,5	Ahda-Thr-Pro-Tyr	8,98%	Riba és mtsai., 2019
MG FR3*	728,6	Ahda-Thr-Pro-Tyr-Tyr	21,08%	Welker és mtsai., 2006
Cyanostatin B*	754,4	Ahda-Tyr-Melle-Pro-Tyr	51,51%	Sano és mtsai., 2005; Welker és mtsai., 2006
MG GH787*	788,4	ClAhda-Tyr-Melle-Pro-Tyr	17,35%	Lifshits és mtsai., 2011

A fragmentációs mintázat alapján az MG FR3 (Welker és mtsai., 2006) és az MG 565 (Riba és mtsai., 2019) aminosav szekvenciája egy Tyr egységben tér el. Az MG FR3 m/z 547 (Ahda-Thr-Pro-Tyr+H⁺), m/z 420 (Ahda'-Thr-Pro-Tyr+H⁺) fragmenteket, és további MG 565-ben is detektált, azonos fragmenteket m/z 384 (Ahda-Thr-Pro+H⁺), m/z 287 (Ahda-Thr+H⁺), m/z 257 (Ahda'-Thr-Pro+H⁺), m/z 182 (Tyr+H⁺) m/z 128 (Ahda) tartalmazott.



9. ábra. Microginin FR3 szerkezeti képlete Bober és mtsai. (2011) alapján.

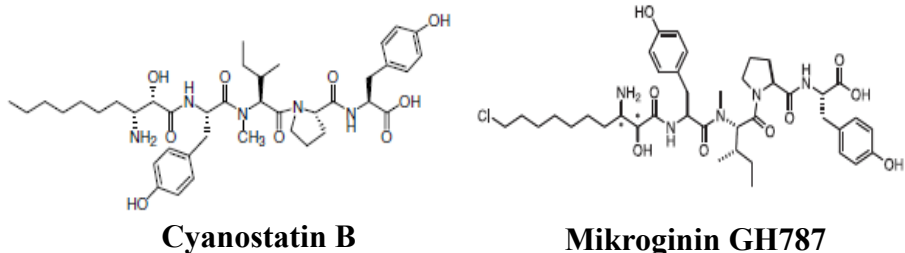
Az MGL 402 (10. ábra) variánst elsőként írtuk le. Ez egy három aminosavból álló tripeptid, amelynek a fragmentációja: m/z 384 (Ahda-Thr-Pro+H⁺-H₂O), m/z 287 (Ahda-Thr+H⁺), m/z 257 (Ahda'-Thr-Pro+H⁺), m/z 239 (Ahda'-Thr-Pro+H⁺-H₂O), m/z 217 (Thr-Pro+H⁺), m/z 128 (Ahda).



10. ábra. A MGL 402 MS² ionspektrum alapján azonosított fragmentációja.

Az m/z 754 [M+H⁺] variánst cyanostatin B-ként írták le (Sano és mtsai., 2005; Welker és mtsai., 2006). Az általunk kapott ionspektrum alapján m/z 573 (Ahda-Tyr-Melle-Pro+H⁺), m/z 476 (Ahda-Tyr-Melle+H⁺), m/z 349 (Ahda-Tyr+H⁺), m/z 186 (Ahda), m/z 59 (Ahda') fragmenteket azonosítottuk. Az MG GH787 variánst Lifshits és mtsai. (2011) írták le, amely m/z 788 [M+H⁺], a cyanostatin B klórozott változata, és az

ionspektrum alapján a következő fragmenteket kaptuk: m/z 510 (ClAhda-Tyr-MeIle+H⁺), m/z 607 (ClAhda-Tyr-Melle-Pro+H⁺), m/z 383 (ClAhda-Tyr-MeIle+H⁺), m/z 220 (ClAhda). Mindkét variánsban jelen volt még továbbá a m/z 569 (Tyr-Melle-Pro-Tyr+H⁺), m/z 406 (MeIle-Pro-Tyr+H⁺), m/z 279 (Pro-Tyr+H⁺), és m/z 182 (Tyr+H⁺) fragmentek.



11. ábra. Cyanostatin B (Sano és mtsai., 2005) és mikroginin GH787 (Lifshits és mtsai., 2011) szerkezete NMR alapján.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált törzsek csak MG variánsokat termeltek és más csoportokba tartozó oligopeptideket nem detektáltunk. Ezen peptidek közül a természetben gyakori előfordulása az MG FR3 variáns, melyet több víztérből is leírtak (Bober és mtsai., 2011; Lodin-Friedman és Carmeli, 2018; Welker és mtsai., 2006). Az azonosított MG variánsok közül mindkét kivonatban a cyanostatin B variáns volt jelen a legnagyobb arányban. Amellett meghatározó mennyiségben mértünk MG FR3 és MG GH787 variánsokat, míg a B-14-01 kivonatból kisebb mértékben MG 565 és MGL 402 variánsokat is detektáltunk. Munkánk során először írtuk le az MGL 402 mikroginin variánst.

Az aminosav szekvenciák alapján látható, hogy MG FR3, cyanostatin B és MG GH787 Tyr-t tartalmaz a C-terminálison. Míg az MG FR3 (9. ábra) Tyr-Tyr, az MG 565, cyanostatin B és MG GH787 Pro-Tyr egységet

tartalmaz. A cyanostatin B és MG GH787 egy metilált aminosavat (Ile), míg utóbbi egy halogénezett Ahda-t (CIAhda) is tartalmaz (11. ábra).

A *Microcystis* genusz bioaktív metabolit termelése rendkívül változatos. A kémiai variabilitás háttere nem teljesen tisztázott (Agha és mtsai., 2014) és sok esetben az oligopeptid mintázatot illetően változatos kombinációk alakulnak ki (Carneiro és mtsai., 2012; Fastner és mtsai., 2001; Martins és mtsai., 2009; Riba és mtsai., 2019; Silva-Stenico és mtsai., 2011; Welker és mtsai., 2004). Azonban nem egyedi jelenség a csak MG termelő *Microcystis* populációk megjelenése (Stewart és mtsai., 2018; Strangman és Wright, 2016).

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális törzsből a monokomponensek kinyeréséhez nagyobb mennyiségben gyűjtöttünk cianobaktérium biomasszát a 3.2. alfejezetben leírtak szerint fenntartott laboratóriumi tenyészetekből, amelyet aratást követően liofilizáltunk, majd metanolos extraktumot készítettünk a kromatográfiás tisztításhoz.

4.2.2. Toxintisztítás oszlopkromatográfiával

Korábban többféle tisztítási módszert írtak le az MG kinyerésére, azonban azok eltérnek az általunk kidolgozott módszertől, mind a kivonatok oldószer összetételében, mind pedig a kromatográfiás oszlop típusában (Ishida és mtsai., 2000a; Bober és mtsai., 2011; Lodin-Friedman és Carmeli, 2018). Az F-14/9-S12-4-A-01 törzs metabolit összetétele nagyon hasonló volt a B-14-01 törzséhez. Azonban a tisztítási lépéseken kicsit módosítottunk. Míg a B-14-01 törzsnél a mikroginin tisztítása 4 kromatográfiás lépésből állt: DEAE-cellulóz kromatográfia – Toyopearl HW-40 méretkizárásos kromatográfia – C18 flash kromatográfia –

szemipreparatív HPLC, az F-14/9-S12-4-A-01-es törzs kivonatánál a C18-as flash kromatográfiás lépést elhagytuk a minta tisztasága és koncentrátsága miatt, így a Toyopearl HW-40 oszlopon történő elúciót követően egyből HPLC-vel gyűjtöttük a monokomponenseket.

Első lépésként DEAE-cellulóz gyenge anion-cserélő oszlopot választottunk. Mivel az MG szerkezeti sajátosságaiból adódóan az UV-spektruma is eltérést mutat az MC-hez képest, így a kromatográfiás lépések során a mikroginin variánsokat a jellegzetes UV spektrum alapján detektáltuk, amelynek maximuma 220 nm-en mérhető, és 276 nm-en az aromás aminosavak miatt egy kisebb csúcs is detektálható. Az ion-cserélő kromatográfia nagy hatékonyságúnak bizonyult a peptid típusú metabolitok elválasztásában, mikrocisztineknél is sikeresen alkalmazott módszer (Lawton és Edwards, 2001; Vasas és mtsai., 2013; Ujvárosi és mtsai., 2019). Korábban mikroginin FR1 variáns tisztítására anion-cserélő (ACCEL QMA) kromatográfiát már használtak, azonban nem első lépésként alkalmazták (Neumann és mtsai., 1997).

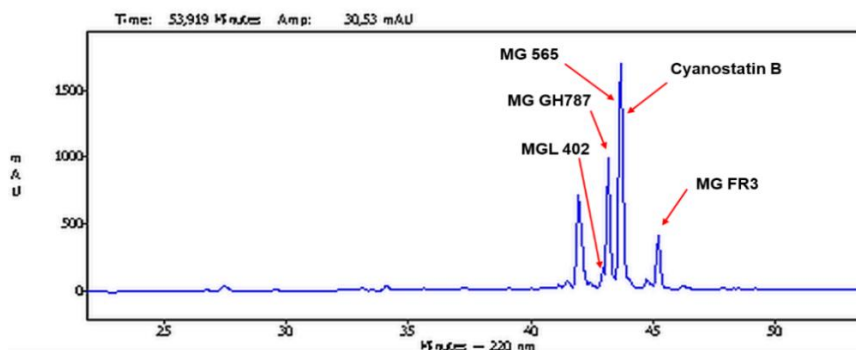
A B-14-01 kivonatból oszlopról eluált frakciókat 220 nm-en flash kromatográfiával detektáltuk, majd a kiválasztott frakciókat a mikroginin tartalmuk megerősítésére LC-MS-sel ellenőriztük. Az F-14/9-S12-4-A-01 törzs esetében hasonló kromatogramot kaptunk, ahol a kisebb eltolódás az MG 565 és MGL 402 variánsok hiánya miatt volt megfigyelhető. Az LC-MS-ből kalkulált csúcs alatti területek alapján öntöttük össze az MG tartalmú frakciókat. Tehát az első lépés közel azonos, és ismételhető eredményt adott a két mikroginin termelő törzs kivonatából.

A következő lépésben a Toyopearl HW-40 méretkizárásos kromatográfiának a tisztítás mellett a mintában lévő só eltávolításában is fontos szerepe volt. Az oszlopról eluált frakciók közül a 220 nm-en mért

csúcsot adókat LC-MS-sel ellenőriztük, majd az MG tartalmúakat összeöntöttük. A B-14-01 és az F-14/9-S12-4-A-01 törzs esetében hasonló kromatogramot kaptunk.

A harmadik lépésben a B-14-01-es mintából származó MG tartalmú frakciókat C18-as flash kromatográfias oszlopon eluáltuk. Ebben a lépésben is ellenőriztük a 220 nm-en csúcsot adó frakciók mikroginin tartalmát LC-MS-sel. Ekkor már közel tiszta, koncentrált frakciókat kaptunk mindkét minta esetében.

Utolsó lépésben a szemipreparatív HPLC segítségével, C18-as oszloppal, és 0,1% TFA tartalmú 10% (v/v) acetonitril és víz elegyével történt az elúció. A kapott csúcsokból LC-MS-sel azonosítottuk a mikroginin variánsokat. Az oszlopról az MGL 402, MG GH787, MG 565, cyanostatin B és MG FR3 variánsok a 42-46. perc között, egymáshoz közeli csúcsokban eluálódtak (12. ábra). Kisebb eltérés adódott a retenciós időkben az F-14/9-S12-4-A-01 minta esetében, de alapvetően egyező kromatogramot kaptunk. Az F-14/9-S12-4-A-01 törzsből az MG GH787 és cyanostatin B variánsokat, és kisebb mennyiségben MG FR3-at is kinyertük.



12. ábra. B-14-01 minta HPLC kromatogramja.

Az MG 565 és cyanostatin B szerkezeti sajátágaikból adódóan egyszerre eluálódtak, amelyet asszimetrikus csúcsként detektáltunk. Az oligopeptid tisztítás során így keletkezett egy olyan frakció is, amely 2 monokomponenst tartalmazott egyszerre: a MG 565 variáns 28,67% és a cyanostatin B 71,33% arányban volt jelen ebben a külön frakcióban. A továbbiakban ezt a frakciót is felhasználtuk a toxikológiai vizsgálatokhoz, a 2 mikroginin variáns együttes hatásának valamint a tisztán cyanostatin B variáns hatásainak összevetésére.

Összességében tehát két olyan mikroginin termelő törzsből sikerült monokomponenseket tisztítani, amelyek hasonló metabolit mintázattal rendelkeztek. Ezáltal a már egyik mintára kidolgozott módszert alkalmazni tudtuk a másik mintára is, kisebb módosításokkal. A tisztítási hatékonyság végül a tisztított komponensekre 17,51 mg össztömeget adott 70 g liofilizált sejtből. Így a tisztítás során kisebb mértékben kaptunk tiszta metabolitokat a már korábban kinyert MG mennyiségekhez képest, ahol 3 g biomassa száraztömegeből 4,8 mg (Paiva és mtsai., 2017), 27 g száraztömegeből 36 mg (Okino és mtsai., 1993), 27,6 g száraztömegeből 19,4 mg, és 75,3 g száraztömegeből 26,8 mg MG variáns tisztítottak (Ishida és mtsai., 2000a). Erre több magyarázat is lehetséges, ugyanis a tiszta komponensek kinyerése nem csak a tisztítási módszer hatékonyságától, de a cianobaktérium törzsek metabolittermelésétől, és tenyésztési körülményeitől is függ.

Az általunk kidolgozott módszer eltért az eddigi szakirodalomban leírt tisztítási eljárásoktól. A mikrogininek tisztítása során többféle módszert is leírtak már, amelyek több kromatográfiás lépésből álltak. Legáltalánosabb eljárás a 70-100% metanollal történő kivonás, amely azonban további proteineket, pigmenteket is eredményez az extraktumban (Lawton és

Edwards, 2001). Leggyakrabban első lépésként valamilyen reverz fázisú töltettel dolgoztak, Neumann és mtsai. (1997) ODS C18 töltetet, Ishida és mtsai. (2000a) ODS YMC-GEL flash rendszert, Bober és mtsai. (2011) és Paiva és mtsai. (2017) SPE C18 szilika töltetet alkalmaztak. Míg további lépésekben anion- és kation-cserélő tölteteket is használtak (Neumann és mtsai., 1997; Okino és mtsai., 1993), mindannyiszor a végső tisztítási lépés C18-as reverz fázisú HPLC volt.

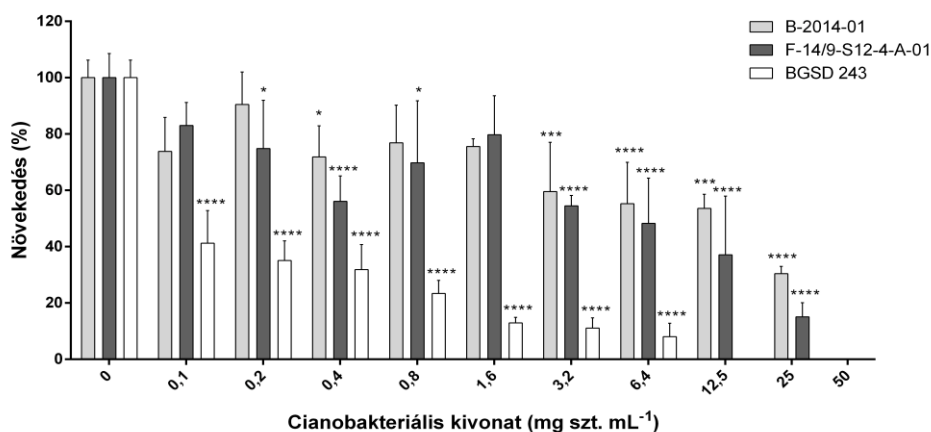
4.2.3. Mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok bioaktivitása a mustár csíranövények növekedésére

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 törzs metanolos extraktumából steril bidesztillált vízzel hígítási sort ($0-50 \text{ mg mL}^{-1}$) készítettünk, amelynek a növekedésgátló hatását vizsgáltuk. Pozitív kontrollként a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszék törzsgyűjteményéből származó *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 törzset használtuk, amelyről korábban leírták, hogy mikrocisztin-LR, -YR, és -YA variánsokat termel és ismert növekedésgátló hatása (Kós és mtsai., 1995; Vasas és mtsai., 2006).

Az etiolált mustár csíranövények teljes hosszát 72 óra elteltével mértük, majd a növekedést a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg (13. ábra). A B-14-01 törzs kivonat növekedésgátló hatása megfigyelhető kisebb mértékben már $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációban, azonban jelentősebb, biológiailag releváns gátlás $\geq 3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ volt mérhető, és az IC_{50} értéket $16,217 \text{ mg mL}^{-1}$ -nek határoztuk meg. Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonatnak erősebb növekedésgátló hatása volt ($IC_{50} 5,5 \text{ mg mL}^{-1}$), és már $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációban gátolta a növekedést, de statisztikailag jelentősebb aktivitást szintén $\geq 3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ mértünk. Megfigyeltük továbbá mindkét

MG tartalmú kivonat esetében a 0,8-1,6 mg mL⁻¹ koncentrációk enyhe növekedésserkentő hatását. A BGSD 243 törzs gátló hatása koncentrációfüggően változott, és a teljes kivonat IC₅₀ értékét 0,076 mg mL⁻¹ koncentrációban határoztuk meg.

A mustár csíranövényteszt alkalmas cianobakteriális kivonatok biológiai aktivitásának mérésére. Ugyan a növekedési teszt érzékenységét (IC₅₀ értékét) nagy mértékben befolyásolja a növény érzékenysége és a teszt körülményei, például a kezelés idejének hossza vagy a fényviszonyok (folyamatos/fotoperiódusban/sötétben) (M-Hamvas és mtsai., 2010), de az MC tartalmú kivonatok esetében bizonyítottan effektív módszernek bizonyult, mint ahogy azt a 4.1.5. fejezetben már tárgyaltuk. Eredményeink alapján azonban láthatjuk, hogy az MG-t tartalmazó cianobakteriális kivonatok szintén képesek a növekedés gátlására, azonban lényegesen magasabb koncentrációban. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy több vízi és szárazföldi élőlénycsoportot vizsgálva megfigyelték, hogy a komplex cianobakteriális kivonatok és tiszta monokomponensek biológiai aktivitása eltérést mutat (Falconer, 2007). Ez azzal magyarázható, hogy egy komplex kivonatban található számos egyéb frakció is a toxikus komponensen kívül, például lipopoliszacharidok, amelyek önmagukban jelentősen képesek csökkenteni egy növényi vagy állati szervezet metabolizációs és detoxifikációs potenciáját (Pietsch és mtsai., 2001).



13. ábra. B-14-01 (világosszürke), F-14/9-S12-4-A-01 (sötétszürke) és BGSD 243 (fehér) törzs metanolos kivonatának hatása fehér mustár (*Sinapis alba* var. budakalászi sárga) csiranövény növekedésére. A kontrollhoz (0, steril bidesztillált víz) viszonyított növekedést százalékban fejeztük ki. A bioaktivitást három párhuzamos alapján határoztuk meg. Statisztikailag szignifikáns eltérés $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

A mikrogininek növényekre gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták. A mikrocisztinek növekedésgátló aktivitása a protein foszfatáz inhibitor aktivitásuknak tulajdonítható. Azonban az eddigi ismereteink szerint a mikrogininek enzim inhibitor aktivitása eltérő, cink-metalloproteáz gátlók, és az egyes variánsok aktivitása az ACE és aminopeptidáz enzimek gátlásán alapszik. Ezért a növényi növekedésre gyakorolt hatások mechanizmusának feltárásához további vizsgálatokra van szükség.

A különböző élőlénycsoportok érzékenysége a mikrogininekre eltérő lehet, és különböző fiziológiai változások figyelhetőek meg. Eddig csupán néhány tanulmány vizsgálta az MG gerinctelen és gerinces állati modell szervezetekben kifejtett negatív hatását. Akut toxicitást figyeltek meg *Thamnocephalus platyurus* édesvízi rák modell organizmusban, ahol a 24 órás expozíciót követően az MG FR3 variánst tisztán tartalmazó

kromatográfiás frakció toxikusnak bizonyult (LC_{50} 7,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Bober és Bialczyk, 2017). A cianopeptidek *Caenorabditis elegans* modell szervezetben vizsgált több toxicitási biomarkerre (reprodukción, peték kikelési ideje, növekedési ráta, élettartam, korrallal összefüggő vulva integritás) adott válaszreakciójuk alapján megállapították, hogy az anabaenopeptin, cianopeptolin, mikrocisztin és mikroginin variánsok közül a legkevésbé toxikus metabolit a mikroginin volt (Lenz és mtsai., 2019). Fernandes és mtsai. (2019) mikrocisztin és mikroginin termelő *Microcystis* törzsek vizes kivonatát vizsgálták *Astyanax altiparanae* lárvákon. Az MC tartalmú kivonat hatása a mortalitásra 24 és 96 órás expozíciót követően erősebbnek bizonyult, mint az MG-t tartalmazó kivonaté. Továbbá számos morfológiai abnormalitást (perikardiális és emésztőrendszeri ödémák, gerinc és farokúszó görbülete) is megfigyeltek az MG-t tartalmazó kivonatnak kitett csoportban. Mindezen vizsgálatok is igazolták, hogy habár az MC tartalmú kivonatok, és tiszta MC-ek hatása erősebb, de az MG tartalmú kivonatok szintén hatással vannak a fiziológiai folyamatokra.

A mikrogininek hatásmechanizmusáról a szerkezet-enzim inhibíció összefüggésében megfigyelték, hogy a C-terminálison lévő NMe-Tyr-Tyr egységnek fontos szerepe lehet az ACE, LAP és APM enzimek gátlásában (Ishida és mtsai., 2000a). Korábban igazolták, hogy az MG FR3 (IC_{50} 6,2 μM), cyanostatin B (IC_{50} 15,9 nM) és MG GH787 (IC_{50} 7,7 μM) erős aminopeptidáz gátló aktivitással bír (Lifshits és mtsai., 2011; Lodin-Friedman és Carmeli, 2018; Sano és mtsai., 2005). Továbbá az NMeAhda-t tartalmazó mikrogininek hatékonyabban gátolták az APM-t, mint a monoklórozott (ClAhda) vagy nem metilált (Ahda) megfelelő variánsaik (Lodin-Friedman és Carmeli, 2018). A bestatin és az amastatin lineáris peptidek, amelyek Ahda-hoz hasonló szerkezetű α -hidroxil- β -aminosav

származékot tartalmaznak. Megfigyelték antitumor és antihipertenzív hatásukat, továbbá aminosavak inhibitorok, és az enzim aktív centrumában lévő cink ion(ok)hoz képesek kötődni (Rich és mtsai., 1984). Ez a kötődéskor szerkezetükben bekövetkező változás hasonlóságot feltételez a mikrogininek hatásmechanizmusával (Kraft és mtsai., 2006).

A mikrogininek, mint toxicitásuk alapján eddig kevésbé ismert oligopeptid csoport, mind környezetileg, mind pedig gyógyászati szempontból fontos és értékes bioaktív metabolit csoport. Ennek okán fontosnak tartjuk, hogy emlős sejtvonalon sejt és DNS szintű vizsgálatokat is végezzünk a potenciálisan káros hatások felderítésére. Ezért a tisztított mikrogininokkal és komplex kivonatokkal HepG2 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon végeztünk citotoxikológiai és genotoxikológiai vizsgálatokat, hogy pontosabb képet kapjunk az MG-ek hatásmechanizmusáról.

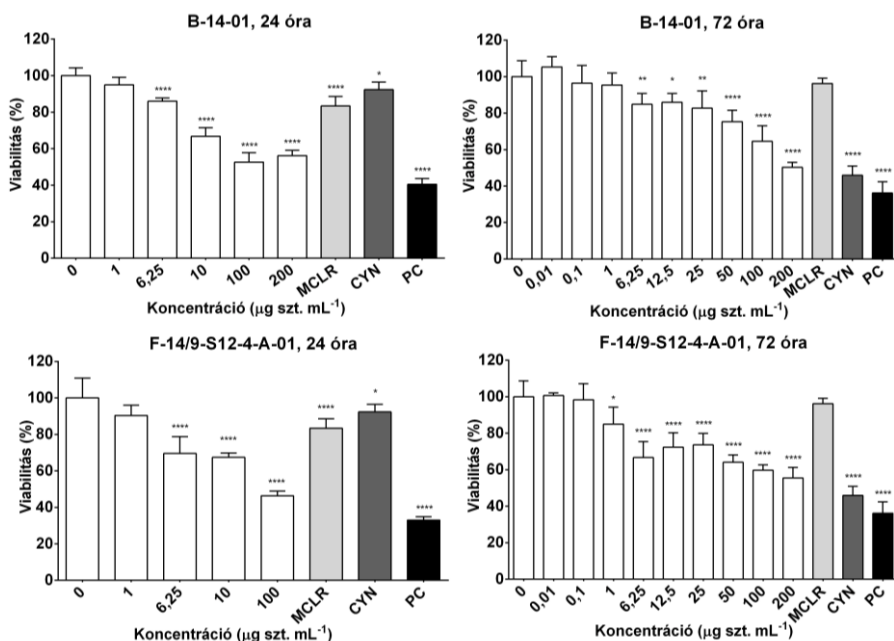
4.2.4. Mikrogininek citotoxicitása HepG2 sejtvonalon

A HepG2 sejtek viabilitását 24 órás és proliferációját 72 órás expozíciót követően határoztuk meg az MTT teszttel. Megfigyeltük, hogy a B-14-01 kivonat jelentősen csökkentette a viabilitást 24 óra után, 14% és 33%-kal 6,25 és 10 μg szt. mL^{-1} koncentrációkban, és az IC_{50} 214,8 \pm 1,19 μg szt. mL^{-1} -nek határoztuk meg. Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat toxikusabbnak bizonyult 24 órás expozíciót követően (IC_{50} 58 \pm 2,07 μg szt. mL^{-1}), 30%-kal csökkentette a HepG2 sejtek viabilitását 6,25 μg szt. mL^{-1} koncentrációban (14. ábra, 24 óra).

A tiszta mikrogininek nem voltak hatással a sejtéletképességre a vizsgált koncentrációkban az oldószer kontrollhoz képest (15 és 16. ábra, 24 óra),

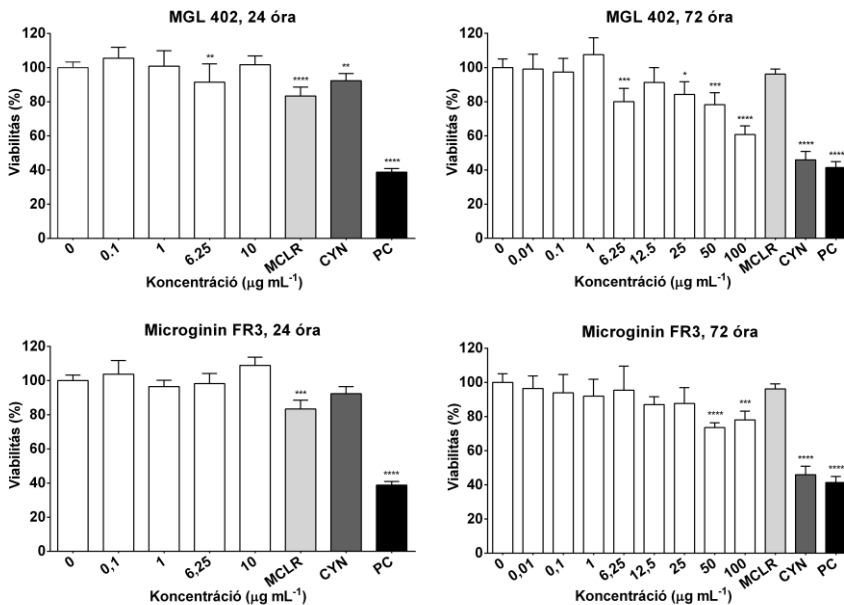
ezért az alacsony 0,01-1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációkat alkalmaztuk a genotoxicitás biomarkerek vizsgálatakor.

A 72 órás expozíciót követően a B-14-01 kivonat koncentráció függő módon csökkentette a HepG2 sejtek proliferációját (IC_{50} $211,5 \pm 1,05 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$), mely hasonlóan bizonyult a 24 órás gátláshoz képest. Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat hatása a proliferációra ezzel szemben kevésbé bizonyult toxikusnak 72 órás expozíciót követően (IC_{50} $279,08 \pm 3,92 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$) (14. ábra. 72 óra).



14. ábra. Mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok hatása HepG2 sejtek viabilitására és proliferációjára 24 és 72 órás expozíció után. A pozitív kontroll (PC) etopozid [fekete] 50 és 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 24 és 72 órás expozícióra vonatkozóan. MCLR (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [világos szürke], és CYN (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [sötét szürke] cianotoxin kontroll. Az oldószer kontrollt (0; 0,1% etanol tartalmú sejtmedium) tekintettük 100%-nak. Statisztikailag szignifikáns különbség, $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) and $P < 0,0001$ (****).

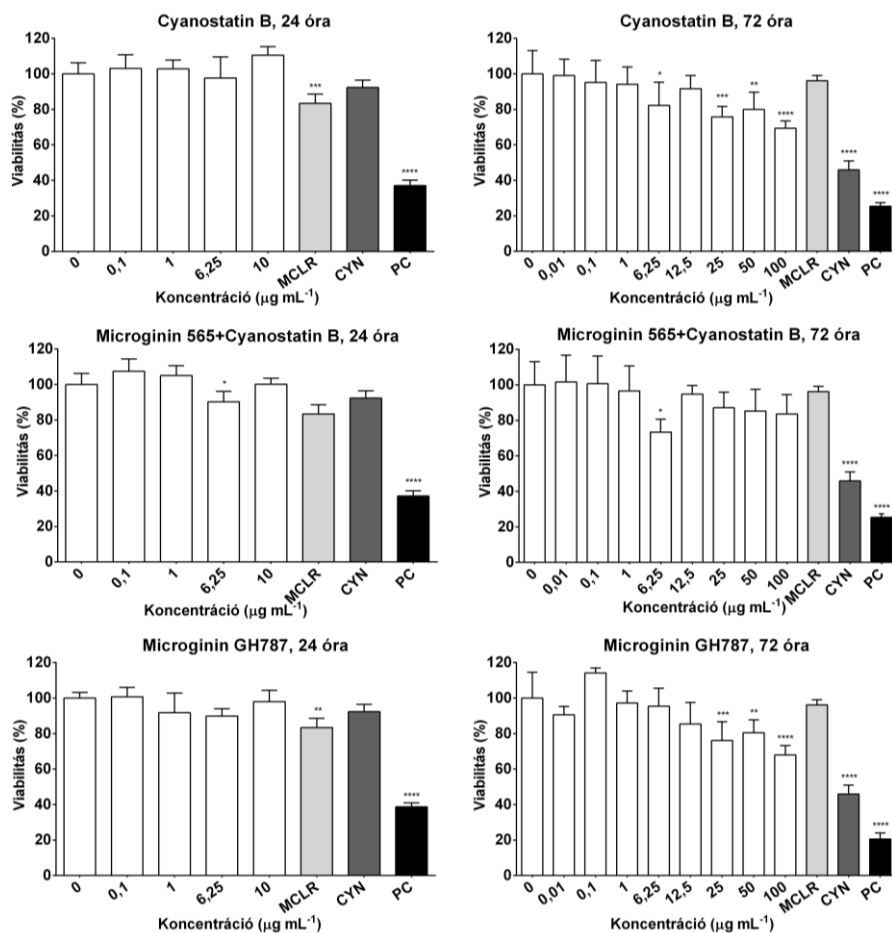
A mikrogininek is koncentráció függő módon csökkentették a sejtproliferációt. A legerősebb variáns az MGL 402 volt, kb. 22 és 42%-os csökkenéssel 50 és 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban. Az MG FR3 kevésbé volt citotoxikus, nagyjából 23 és 20%-os csökkenést figyeltünk meg 50 és 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációkban (15. ábra, 72 óra).



15. ábra. MGL 402 és MG FR3 variánsok hatása HepG2 sejtek viabilitására és proliferációjára 24 és 72 órás expozíció után. A pozitív kontroll (PC) etopozid [fekete] 50 és 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 24 és 72 órás expozícióra vonatkozóan. MCLR (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [világos szürke], és CYN (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [sötét szürke] cianotoxin kontroll. Az oldószer kontrollt (0; 0,1% etanol tartalmú sejtmedium) tekintettük 100%-nak. Statisztikailag szignifikáns különbség, $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) and $P < 0,0001$ (****).

Az MG GH787 és cyanostatin B variánsok esetében hasonló citotoxikus aktivitást figyeltünk meg (16. ábra, 72 óra). Jelentősen csökkentették a sejtproliferációt 25%-kal 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban, azonban a legmagasabb vizsgált koncentrációban (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) az MGL 402 variánshoz képest alacsonyabb aktivitást, 32% és 30%-os csökkenést

mértünk az MG GH787 és cyanostatin B variánsoknál. Az MG 565+cyanostatin B komponensek együttes hatására egyedül 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban figyeltünk meg szignifikáns, 32%-os csökkenést, azonban a magasabb koncentrációkban nem volt jelentős eltérés a kontrollhoz képest.



16. ábra. Cyanostatin B, MG 565+Cyanostatin B és MG GH787 variánsok hatása HepG2 sejtek viabilitására és proliferációjára 24 és 72 órás expozíció után. A pozitív kontroll (PC) etopozid [fekete] 50 és 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 24 és 72 órás expozícióra vonatkozóan. MC-LR (1 mg mL^{-1}) [világos szürke], és CYN (0,5 mg mL^{-1}) [sötét szürke] cianotoxin kontroll. Az oldószer kontrollt (0; 0,1% etanol tartalmú sejtmedium) tekintettük 100%-nak. Statisztikailag szignifikáns különbség, $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) and $P < 0,0001$ (****).

A toxikus hatások összehasonlításához MC-LR ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) és CYN ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) toxinokkal is elvégeztük a kísérleteket, esetükben 24 órát követően nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a HepG2 sejtek viabilitásában. Azonban 72 óra elteltével a CYN jelentősen, kb. 55%-kal csökkentette a sejtproliferációt a kontrollhoz képest, míg a MC-LR nem volt hatással a proliferációra.

A tiszta mikrogininnek nagyságrenddel magasabb koncentrációban gátolták a sejtproliferációt, mint az a koncentráció, amit a természetben detektáltak ($\geq 2,21 \mu\text{g L}^{-1}$) (Beverdorf és mtsai., 2017). Megfigyeltük a mikrogininnek alacsony citotoxicitását. Érdekes módon az MG 565+cyanostatin B komponensek sejtvitalitásra kifejtett együttes hatása jóval alacsonyabb volt a cyanostatin B variánsnál tapasztalható képest, amely bizonyítékul szolgálhat az MG variánsok között lehetséges antagonisták hatásának létrejöttére. Eredményeink összhangban vannak a Chorus és mtsai. (2006) által közölt jelentéssel, amelyben leírták, hogy egyes, nem meghatározott MG variánsok 48 órás expozíciót követően a HepG2 és humán vastagbél adenokarcinóma (Caco-2) sejtvonalalakon nem bizonyultak citotoxikusnak $\leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban.

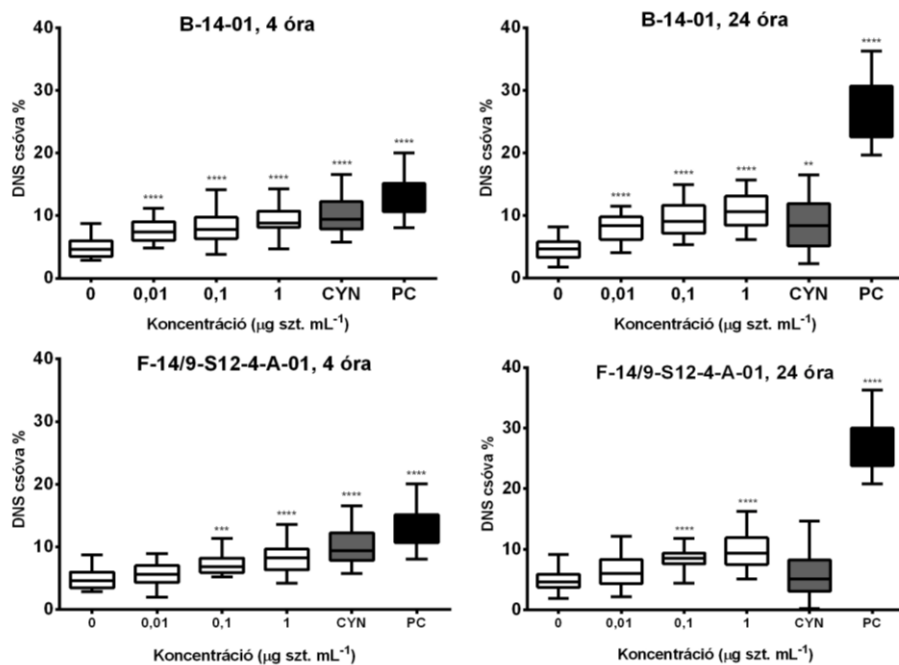
A továbbiakban a HepG2 sejteken a mikrogininnek nem citotoxikus koncentrációkban bekövetkező genotoxicitásának indukcióját vizsgáltuk a DNS száltörések, és genomi instabilitás paramétereinek mérésével. Az MG variánsok genotoxikus hatásainak bemutatása során az $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ tiszta komponens moláris koncentrációban kifejezve egyenértékű: MGL 402 $2,49 \mu\text{M}$, MG FR3 $1,37 \mu\text{M}$, cyanostatin B $1,32 \mu\text{M}$, MG GH787 $1,27 \mu\text{M}$, valamint az $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ MG 565+cyanostatin B együttesen $0,506 \mu\text{M}$ MG 565-nek és $0,944 \mu\text{M}$ cyanostatin B-nek felel meg.

4.2.5. DNS száltörések detektálása comet és γ H2AX assay-vel

Míg a comet assay főként a DNS egyszálú töréseket (SSB), és alkáli labilis helyeket, illetve kisebb mértékben a DNS duplaszálú töréseket (DSB) detektálja (Gajski és mtsai., 2019), addig a γ H2AX assay a DNS DSB-re specifikus módszer (Garcia-Canton és mtsai., 2012).

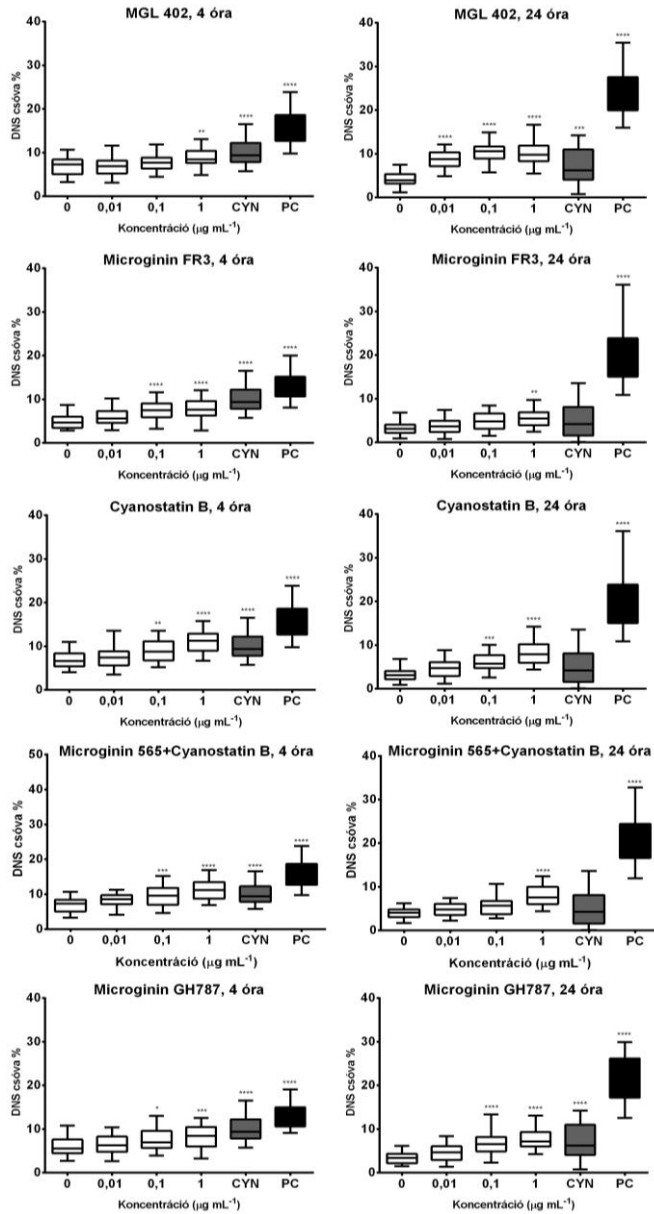
A comet assay-ben 4 és 24 órás expozíciós időt követően a cianobakteriális kivonatok (0-0,01-0,1-1 μg szt. mL^{-1}) és MG variánsok (0-0,01-0,1-1 μg mL^{-1}) eltérő mértékben indukáltak DNS károsodást.

A cianobakteriális kivonatok koncentráció és idő függő módon növelték a DNS károsodás mértékét mindkét expozíciós időtartam során. A B-14-01 kivonat $\geq 0,01$ μg szt. mL^{-1} koncentrációban növelte a DNS károsodás mértékét 4 és 24 óra után. Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat ezzel szemben alacsonyabb aktivitással, $\geq 0,1$ μg szt. mL^{-1} koncentrációban indukálta a DNS száltörések képződését (17. ábra).



17. ábra. DNS száltörések detektálása a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 kivonatokkal kezelt HepG2 sejteken 4 és 24 órás expozíciót követően. A degradáció mértékét a kontrollhoz (0, sejtmedium) képest a DNS csóva %-ban fejeztük ki. Pozitív kontroll (PC, 30 µM BaP) és CYN (0,5 µg mL⁻¹). Statisztikailag szignifikáns eltérés P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***), P < 0,0001 (****).

4 órás kezelés után a cyanostatin B, MG 565+Cyanostatin B, MG GH787 és MG FR3 statisztikailag szignifikánsan növelte a DNS száltörések képződését $\geq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, míg az MGL 402 variáns $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban (18. ábra, 4 óra). Azonban 24 órás expozíciót követően a kontrollhoz képest az MGL 402 szignifikánsan ($\geq 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) indukálta a DNS száltöréseket, így a legerősebb genotoxikus potenciált figyeltük meg ennél a variánsnál. Ezzel ellentétben az MG FR3 indukálta a legkisebb mértékben a DNS száltörések képződését ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), és a cyanostatin B és MG GH787 variánsok $\geq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban.



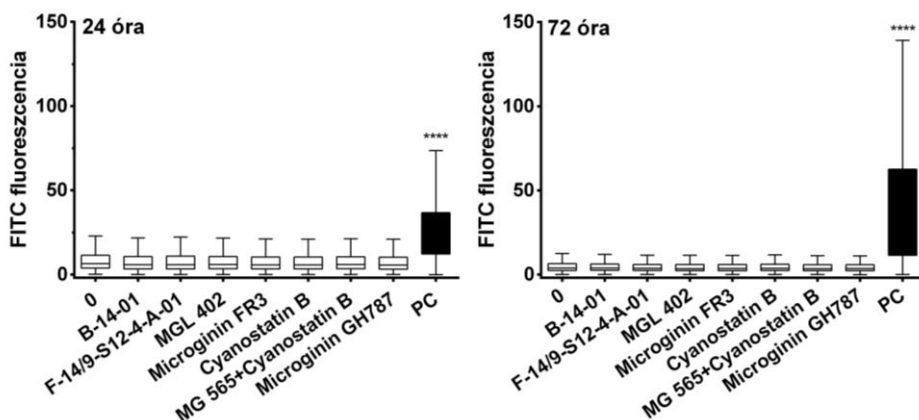
18. ábra. DNS száltörések detektálása az MG variánsokkal kezelt HepG2 sejteken 4 és 24 órás expozíciót követően. A degradáció mértékét a kontrollhoz (0, sejtmedium) képest a DNS csóva %-ban fejeztük ki. Pozitív kontroll (PC, 30 µM BaP) és CYN (0,5 µg mL⁻¹). Statisztikailag szignifikáns eltérés P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***), P < 0,0001 (****).

Továbbá az MG 565+cyanostatin B-vel kezelt sejtek 4 óra után $\geq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, míg 24 óra után $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban indukáltak DNS száltöréseket statisztikailag szignifikánsan, tehát a 24 órás expozíciót követően alacsonyabb genotoxikus aktivitást figyeltünk meg, mint a cyanostatin B variáns esetében önállóan (18. ábra, 24 óra). Az összes MG közül az MG FR3 és az MG 565+cyanostatin B metabolitok vizsgálatakor figyelhetjük meg, hogy rövidebb expozíciós időt követően erősebb genotoxikus aktivitással bírnak. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a DNS károsodás kiküszöbölésére olyan repair folyamatok zajlanak le, amely által a DNS száltörések csak rövid ideig, átmenetileg fordulnak elő. Az intracelluláris ROS a DNS-sel kölcsönhatásba kerülve is okozhat DNS száltöréseket. Ezt a jelenséget figyelték meg a mikrocisztin hatásmechanizmusának tanulmányozása során. $0,01-1 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR hatására a rövid expozíciót követően DNS száltörések keletkeztek, azonban hosszabb idő elteltével a DNS száltörések mértéke csökkent (Žegura és mtsai., 2004, 2003). Ennek háttérében az áll, hogy a MC-LR átmeneti DNS egyszálú törések képződését indukálja, amely az intracelluláris ROS termelődés és DNS bázisok oxidációjának közvetett következménye (Hercog és mtsai., 2017; Žegura, 2016).

Vizsgálataink során a CYN ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) hatására 4 és 24 órás expozíciót követően statisztikailag szignifikáns mértékű DNS károsodást figyeltünk meg. A kapott eredmény összhangban van a korábbi megfigyelésekkel, és annak magyarázatával. A CYN genotoxikus aktivitásának mechanizmusa eltér a MC-LR genotoxicitásától, ugyanis a CYN pro-genotoxikus, és a DNS károsodás indukációjához az elektrofil intermedierek metabolikus aktivációjára van szükség (Bazin és mtsai., 2010; Humpage és mtsai., 2005; Štraser és mtsai., 2011).

A DNS kettős száltörések kimutatására specifikus a γ H2AX assay, amely a H2AX hiszton foszforilált Ser139 (pS139) antigén detektálásán alapszik. A H2AX egy 14 kDa bazális hiszton és a H2 hiszton család egy variánsa. Amikor a DNS-ben kettős száltörés (DSBs) következik be, a H2AX Ser139 gyors és nagymértékű foszforilációját (γ H2AX) okozza (Garcia-Canton és mtsai., 2012).

Méréseink során 24 és 72 órás expozíció után a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális kivonatok ($1 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$) és tiszta MG-k ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) nem indukálták a γ H2AX fókuszok számának emelkedését a kontrollhoz képest, tehát nem indukáltak DNS kettős száltöréseket (19. ábra).



19. ábra. DNS kettős száltörések indukciója a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális kivonatok és MGL 402, MG FR3, Cyanostatin B, MG 565+Cyanostatin B és MG GH787 variánsok által 24 és 72 órás expozíciót követően. A FITC fluoreszcencia intenzitást az FL1-H értékekből határoztuk meg áramlás citometriával, a γ H2AX pozitív helyek indirekt detektálása révén. A kísérletek során kontroll (0, sejtmedium) és pozitív kontroll (PC, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ etopozid) csoportot alkalmaztunk. Mindegyik mintában 10^4 számú sejtpopulációt mértünk. A kontroll és kezelt csoportok közti statisztikailag szignifikáns különbség $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

A H2AX foszforilációja a DNS kettős száltörések képződésének egy viszonylag korán bekövetkező válaszreakciója, melynek detektálása

tükrözi a DNS kettős száltörések képződését és arányos annak mértékével. A DNS-ben bekövetkező duplaszálú törések általában akkor keletkeznek, amikor a hibajavító folyamatok nem megfelelően működnek, amely végül a kromoszóma újraszerveződéséhez vagy sejthalálhoz vezet. Ez az egyik legkritikább, de legkárosabb DNS lézió, amelynek súlyos következményei lehetnek, genomi instabilitást indukál, amely a karcinogenezis kiváltásáért lehet felelős (Geric és mtsai., 2014).

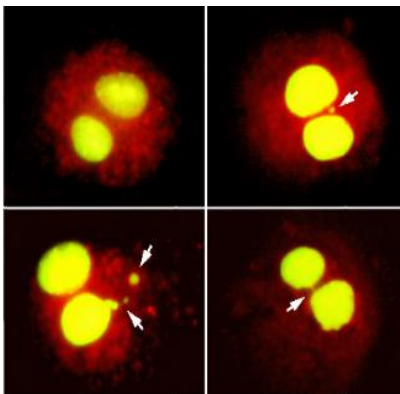
Korábban bebizonyosodott, hogy az MC-LR nem citotoxikus koncentrációkban, hasonlóan az MG-hez, nem indukál DNS kettős száltöréseket HepG2 sejtekben (Žegura és mtsai., nem publikált eredmények). Ezzel ellentétben a CYN hatással volt a DNS kettős száltörések képződésére $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban 72 órás kezelést követően, azonban a 24 órás expozíció során nem figyeltek meg változást a H2AX fókuszok számának emelkedésében a kontroll csoporthoz képest. Ennek magyarázata lehet a CYN protein szintézis inhibitor aktivitása vagy a lejátszódó DSB repair folyamatok (Štraser és mtsai., 2013).

A DNS száltörések vizsgálata során kapott eredményeinkből kiderült, hogy a mikrogininek kisebb mértékű DNS károsodást indukálnak. Azonban a DSB képződését nem detektáltuk, amely a DNS komolyabb mértékű károsodásának indikátora. Méréseink során a MC-LR-nél leírt hasonló hatásmechanizmust figyeltünk meg, amely valószínűsíti, hogy a mikrogininek által indukált DNS száltörések háttérben az oxidatív stressz folyamatok állhatnak. Ennek magyarázatára azonban további vizsgálatok szükségesek.

A lehetséges klasztogén aktivitás tanulmányozására a továbbiakban az MG-kel és cianobakteriális kivonatokkal kezelt HepG2 sejteket a citokinézis-blokkolt mikronukleusz teszttel vizsgáltuk.

4.2.6. Kromoszóma aberrációk vizsgálata mikronukleusz teszttel

A citokinézis-blokkolt mikronukleusz teszttel (CBMN) a citokinézis elején blokkolt osztódó sejtekben történt változásokat detektálhatjuk. Az egy osztódáson átesett, binukleáris sejtekben (BNC) a kromoszóma aberrációk különböző formáit mérhetjük, amelyek a károsodás mértékével arányosak. Ezek a genomi instabilitás mérésére szolgáló biomarkerek Fenech (2000) alapján a mikronukleuszok (MNi), mikronukleuszt tartalmazó binukleáris sejtek (MNed sejt), nukleoplazmahidak (NPB) és nukleáris rügyek (NBUD) (20. ábra).



20. ábra. Binukleáris sejt (bal felső), nukleáris rügyek és mikronukleusz (bal alsó), mikronukleusz (jobb felső) és nukleoplazmahíd (jobb alsó). A citoplazma piros, a sejtmagok sárga festődésűek (akridin narancs). A kép forrása: Fotó: Dr. Bojana Žegura. <https://www.nib.si/eng/>

A sejtben a DNS egyszálú törések képződéséért felelős toxikus koncentráció sokkal alacsonyabb, mint az a koncentráció, amely kromoszóma-aberrációkat indukál, ezért vizsgálatainkban $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ MG és $1 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$ cianobakteriális kivonatokkal kezeltük a HepG2 sejteket, és a megfigyelt hatások összevetéséhez CYN-t ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) alkalmaztunk. A lehetséges klasztogén aktivitás tanulmányozására a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális kivonatok és MGL 402, MG FR3, cyanostatin B, MG 565+cyanostatin B, MG GH787 variánsok hatását a HepG2 sejtek

genomi instabilitására 24 órás expozíciót követően határoztuk meg (11. táblázat).

A B-14-01 kivonat nem volt hatással az MNed sejtek, MNi és NBUDs gyakoriságára, azonban az NPB gyakorisága ≥ 2 -szeres volt a kontrollhoz képest. Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat esetében eltérő hatást figyeltünk meg. Statisztikailag szignifikánsan nőtt az MNed sejtek és MNi gyakorisága, habár a válasz kisebb, mint 2-szeres volt, valamint az NPB és NBUD gyakoriságára nem volt hatással kivonat. A B-14-01 kivonattal kezelt sejtekben megfigyelt hatások összefüggésbe hozhatók az MG 565+cyanostatin B komponensek (mint a kivonatban domináns variánsok) által megfigyelt hatásokkal. Ugyanez elmondható az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat és cyanostatin B által kezelt sejtekben megfigyelt hatásokra is. A tiszta MG-k közül csak az MG GH787 variáns indukált szignifikáns pozitív, ≥ 2 -szeres MNed sejt, MNi és NPB gyakoriságot a kontrollhoz képest. A cyanostatin B, MGL 402 és MG FR3 hatására szignifikánsan nőtt az MNed sejtek és az MNi gyakorisága, azonban ez az emelkedés kisebb, mint 2-szeres volt. Továbbá a cyanostatin B variáns, amely szerkezetileg nagyon hasonló az MG GH787-hez (klórozott cyanostatin B), jelentősen, 1,7-szeresen növelte az MNi gyakoriságát, ezzel jelezve, hogy hatással volt a genomi instabilitásra a HepG2 sejtekben. Ellenben azt figyeltük meg, hogy az MG 565+cyanostatin B metabolitok egyedül az NPB gyakoriságát növelték, tehát együttes hatásuk eltért a cyanostatin B hatásától. Ez a megfigyelés szintén összhangban van a DNS száltörések indukciója során, a két MG variáns együttes hatására tapasztalt kisebb mértékű DNS károsodással. Ez lényeges, mivel a szakirodalomban kevés információ áll rendelkezésre a különböző cianotoxinok együttes hatásairól, és az ilyen fajta ismeretek nélkülözhetetlenek a minél pontosabb kockázati

felméréshez, ugyanis valós környezetben az élőlények a metabolitok elegyének vannak kitéve, nem pedig egyetlen egy vegyületnek (Beverdorf és mtsai., 2017; Hercog és mtsai., 2017; Riba és mtsai., 2019). A citokinézis-blokkolt proliferációs index (NDI) értéke nem csökkent a cianobakteriális kivonatok és mikrogininek hatására, amely összhangban van az MTT assay-ben megfigyelt alacsony citotoxicitással.

Az MNi a kromoszóma törések vagy egész kromoszómavesztés biomarkere: az osztódó sejtekben az acentrikus kromoszómák vagy kromoszóma fragmentek visszamaradnak az anafázis során, és nem kerülnek a telofázis során keletkező leánysejtek sejtmagjának egyikébe sem. Tehát a mikronukleuszok sejtmaghátyával körülvevett, sejtmagon kívüli képződmények (Hintzsche és mtsai., 2017). Eredményeink alapján ezt a jelenséget tapasztaltuk az F-14/9-S12-4-A-01 kivonattal, és az MG GH787 és cyanostatin B variánsokkal kezelt HepG2 sejtekben.

Az NPB a genom károsodásra közvetlen bizonyítékul szolgál, gyakoriságával magyarázható a DNS száltörések következtében lezajló DNS misrepair, a kromoszóma újraszerveződés vagy a telomer-vég fúzió. Az NPB az anafázis során alakul ki, amikor a dicentrikus kromoszómák centromerjei a sejt ellentétes pólusai felé húzódnak (Fenech, 2000). Ezt a B-14-01 kivonat, valamint az MG 565+cyanostatin B és MG GH787 minták esetében figyelhettük meg.

Az NBUD a génamplifikáció, vagy az amplifikált DNS és/vagy DNS repair komplexek eliminációja során képződhet (Fenech, 2000). A nukleáris budding folyamatában, mely az S-fázis alatt játszódik le, az amplifikált DNS a sejtmagból kiválik. Az NBUD morfológiailag egyezik a mikronukleusszal, azt leszámítva, hogy a sejtmaghoz nukleoplazma anyaggal kapcsolódik (20. ábra).

11. táblázat. A mikronukleuszt tartalmazó binukleáris sejtek (MNed sejtek), mikronukleuszok (MNI), nukleoplazmahidak (NPB) és nukleáris rügek (NBUD) gyakorisága, és a citokinézis-blokkolt proliferációs index (NDI) a cianobakteriális kivonatok és mikrogininek hatására 24 órás expozíciót követően HepG2 sejtekben. A statisztikai szignifikanciát a kontroll és kezelt csoportok között χ^2 próbával határoztuk meg (* $p < 0,05$). A citokinézis-blokkolt proliferációs indexben (NDI) a kontroll és kezelt csoportok közti szignifikanciát 1-way ANOVA-val (* $p < 0,05$) határoztuk meg. Pozitív kontroll 2,5 mM BaP és 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CYN volt. A ≥ 2 -szeres emelkedést pozitív válasznak tekintettük, és vastag betűvel jelöltünk.

Minta	MNed sejtek/ 10^3 BNC	MNI/ 10^3 BNC	NPB/ 10^3 BNC	NBUD/ 10^3 BNC	NDI
Kontroll	26,33 \pm 2,08	30,33 \pm 3,06	1,67 \pm 1,53	15,33 \pm 7,64	1,88 \pm 0,05
B-14-01	35,33 \pm 6,66	40,67 \pm 8,14	5,67 \pm 2,89*	19,33 \pm 13,20	1,89 \pm 0,08
F-14/9-S12-4-A-01	34,67 \pm 16,62*	41,67 \pm 21,94*	2,00 \pm 2,65	11,33 \pm 2,08	1,80 \pm 0,08
MGL 402	34,67 \pm 4,93*	41,33 \pm 8,14*	3,33 \pm 2,08	16,00 \pm 9,17	1,83 \pm 0,03
Cyanostatin B	44,67 \pm 11,59*	51,67 \pm 16,74*	3,33 \pm 0,58	23,00 \pm 9,85	1,80 \pm 0,09
MG GH787	53,33 \pm 2,52*	65,33 \pm 7,23*	6,67 \pm 2,08*	25,67 \pm 8,62	1,82 \pm 0,06
MG FR3	37,33 \pm 3,79*	45,00 \pm 2,00*	4,33 \pm 1,53	18,00 \pm 8,19	1,85 \pm 0,10
MG 565 + cyanostatin B	27,00 \pm 17,00	32,00 \pm 20,66	5,67 \pm 2,89*	15,00 \pm 3,46	1,82 \pm 0,03
BaP	60,33 \pm 39,63*	63,33 \pm 36,95*	3,33 \pm 0,58	12,33 \pm 3,21	1,41 \pm 0,31*
CYN	67,67 \pm 10,02*	80,67 \pm 14,57*	3,00 \pm 2,65	38,00 \pm 2,65*	1,54 \pm 0,31*

Az NBUD gyakoriságának szignifikáns, biológiailag pozitív emelkedését azonban mindössze a cianotoxin kontroll, CYN esetében detektáltuk. Emellett a CYN növelte az MNed sejtek és az MNi gyakoriságát ≥ 2 -szeresen, és statisztikailag szignifikánsan csökkentette az NDI értékét HepG2 sejtekben. Több tanulmány összhangban van a megfigyelésünkkel (Hercog és mtsai., 2017; Humpage és mtsai., 2000; Štraser és mtsai., 2011). Ezzel ellentétben az MC-LR vizsgálata során igazolták, hogy nem indukál MNi képződést 1 μM koncentrációban (Hercog és mtsai., 2017), azonban 5 és 20 μM koncentrációban megfigyelték az MNi gyakoriság növekedését HepG2 sejtvonalon (Dias és mtsai., 2014). Mindamellett az MC-LR emlős sejteken kifejtett klasztogén és aneugén aktivitása alátámasztja a karcinogén hatásukat (Dias és mtsai., 2014; Žegura, 2016).

Összességében, vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a humán hepatocelluláris karcinóma HepG2 sejtekben a cianobakteriális kivonatok és mindegyik vizsgált MG variáns DNS károsodást indukált. Az MG GH787 indukálta az MNi és NPB képződését, míg a cyanostatin B a MNi képződését. Továbbá a B-14-01 kivonat, MG GH787 és MG 565+cyanostatin B az NPB képződését. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a mikrogininek veszélyt jelenthetnek a vízi ökoszisztémára és az emberre egyaránt. Az emberi szervezetben a genotoxikus metabolitok olyan súlyos krónikus betegségek kialakulásával hozhatók összefüggésbe, mint a karcinóma, míg a vízi környezetben a vízi szervezetek reprodukációs képességére vannak káros hatással. Ez rendkívül lényeges, ugyanis a mikrogininek termeléséért felelős *Microcystis* fajok világszerte előfordulnak. Ennek okán kulcsfontosságúak a további vizsgálatok a MG (geno)toxicitásának, valamint a környezeti előfordulásának megismerésére.

Ebben a fejezetben egy laboratóriumi, a mikrogininek *in vitro* toxicitását célzó tanulmányt ismertettünk. Tanulmányunkban a hatásai alapján kevésbé ismert MG-k toxicitásának mechanizmusáról kaptunk új információkat. A széleskörben vizsgált MC-ről már rengetegféle hatást leírtak, azonban a *Microcystis*ek által szintén viszonylag gyakran termelt MG-k hatásairól a szakirodalomban alig áll rendelkezésre információ. Munkánk során két *Microcystis* izolátumból azonosítottunk és tisztítottunk MG FR3, MGL 402, MG 565, MG GH787 és cyanostatin B variánsokat, amelyek közül az MGL 402 variánst elsőként írtuk le. A *Sinapis alba* csíranövény tesztrendszerben végzett vizsgálatunkkal először igazoltuk a MG tartalmú cianobakteriális kivonatok növényi növekedésgátló aktivitását, amely az MC tartalmú kivonathoz képest azonban kevésbé bizonyult toxikusnak.

Az MG tartalmú cianobakteriális kivonatok és tiszta MG-k kisebb mértékű citotoxicitását figyeltük meg a humán hepatocelluláris HepG2 sejtvonalon végzett vizsgálataink során. Igazoltuk, hogy a cianobakteriális kivonatok és tiszta mikrogininek 4 és 24 órás expozíciót követően DNS száltöréseket indukáltak, azonban 24 és 72 órás expozíciót követően nem indukálták a DNS kettős száltörést. Eredményeink azzal magyarázhatóak, hogy a mikrocisztinekhez hasonlóan, az MG-k hatására képződő DNS száltörések háttérben oxidatív stressz folyamatok állhatnak, amelynek kiderítésére további vizsgálatok szükségesek. Bizonyítottuk, hogy egyes MG variánsok a genomi instabilitásra is hatással vannak, illetve a cianobakteriális kivonatok hasonló aktivitást mutattak a kivonatban domináns MG variánsokkal. Az MG GH787 indukálta az MNi és NPB képződését, míg az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat és a cyanostatin B az MNi képződés gyakoriságát növelte. A B-14-01 kivonat és MG 565+cyanostatin B

indukálta a NPB képződését. Mindezen eredmények alátámasztják, hogy egyes MG variánsok genotoxikusak a HepG2 sejtvonalon.

Jelen tanulmány tanulsága, hogy a MG-ek potenciális káros hatásainak vizsgálata időszerű és szükséges, mivel még nem áll rendelkezésre elég információ, hogy a környezeti és közegészségügyi kockázatot felmérjük. Mivel ez egy komplex kérdéskör, sokféle módszertani megközelítésből szükséges tanulmányozni, beleértve a metagenomikai, metabolomikai, toxikogenomikai és proteomikai vizsgálatokat. Végző soron a legfőbb megválaszolásra váró kérdés, hogy hol helyezzük el ezt a bioaktív metabolit csoportot, érdemes-e a gyakran használt cianotoxin kifejezéssel definiálni.

Az értekezés új tudományos eredményei

- Komplex környezeti tanulmányban igazoltuk, hogy az eutróf vízterben (Bárdos-tó) a környezeti mintákban *mcy+* genotípusú populációk előfordulnak, és alátámasztottuk, hogy a vízterben megjelenő vízvirágzásokban a mikrocisztin termelésért a *Microcystis sp.* a felelős.
- A környezeti tanulmányban az eutróf vízterben jelentős mennyiségű intracelluláris és extracelluláris mikrocisztint mutattunk ki. Bizonyítottuk, hogy a toxikus vízterben egyértelműen megvalósult a MC bioakkumulációja az ott élő *Ceratophyllum submersum* alámerülő vízi makrofitában, mely magas koncentrációban akumulálta a toxint.
- Elsőként tisztítottunk, és írtuk le az MGL 402 mikroginin variánst.
- Igazoltuk, hogy mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok, valamint mikrogininek hatással vannak a HepG2 sejtek viabilitására és proliferációjára.
- Elsőként írtuk le, a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok és az MGL 402, MG FR3, cyanostatin B, MG GH787, MG 565+cyanostatin B tiszta mikrogininek genotoxikus aktivitását HepG2 sejteken. Bizonyítottuk, hogy indukálják a DNS száltörések képződését, azonban a DNS kettős száltörések képződését nem.
- Kimutattuk, hogy a MG GH787 és cyanostatin B variánsok, és a B-14-01 kivonat hatással vannak a genomi változások indukciójára HepG2 sejtekben.
- Igazoltuk, hogy a mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok gátló hatását a *Sinapis alba* csíranövény növekedésére.

Összefoglalás

Az édesvizekben világszerte megjelenő toxikus vízvirágzásokat gyakran alkotja *Microcystis*. Óriási változatosság jellemzi a *Microcystis* által termelt biológiailag aktív szekunder metabolitokat, amelyek közül a mikrocisztinek (MC) a legelterjedtebb cianotoxin csoport. Egy másik csoport, a mikrogininek (MG) szintén megjelennek vízvirágzásokban a MC-ekkel együtt, amelyek toxicitása általánosságban sokkal alacsonyabbnak vélt.

Jelen értekezésben aktuális globális környezeti problémát, a toxikus cianobakteriális vízvirágzások során előforduló biológiailag aktív szekunder metabolitok ökoszisztémában betöltött szerepét és potenciális káros hatásait tárgyaltuk. A dolgozat két részből áll, amely a *Microcystis* fajok által termelődött metabolit csoportokat tanulmányozza. Az első rész a MC-k toxicitását vizsgálja terepi körülmények között, míg a második rész, a MG-k káros hatásait kutatja *in vitro* tesztrendszerekben. A munka áttekinti a mikrocisztinek és a mikrogininek toxicitását molekuláris és sejtszinten, valamint növényi szövetekben.

- Az első, terepi tanulmány háttérében a 2000-es évek elején a Bárdostóban (Gyula) megfigyelt rendkívül toxikus, mikrocisztin termelő *Microcystis aeruginosa* alkotta vízvirágzás állt. Célunk az akkori megfigyelések ismeretére alapozva a toxintermelő fajok meghatározása, a toxin termelés dinamikájának, és toxinvariabilitásnak a vizsgálata, valamint a vízvirágzások toxicitásának növényi tesztrendszerekben történő vizsgálata, amely kiterjedt a valós környezetben történő, *in situ* bioakkumulációs és az *in vitro* fehér mustár (*Sinapis alba*) csíranövény növekedésgátló aktivitásának mérésére.

- A Bárdos-tóban 2011 és 2013 között megjelenő vízvirágzásokban két domináns, gyakori előfordulású cianobaktérium faj, *Microcystis sp.* és *Planktothrix agardhii* eltérő arányban váltakoztak. 2012 augusztusában óriási, *Microcystis sp.* domináns vízvirágzást tapasztaltunk. A fitoplankton biomassza peptidmintázatának analízise során a gyakran előforduló MC-LR, -YR, -LY és [Dha7] MC-RR variánsokat azonosítottunk. Mindamellett a MC bioszintézis gének vizsgálata igazolta a *mcy+* genotípusú populációk túlsúlyát a környezeti mintában és alátámaszotta, hogy a vízvirágzásokban a MC termelésért a *Microcystis* felelős.
- A víztérből (extracelluláris) és fitoplankton biomasszából (intracelluláris) meghatározott MC koncentrációkból kiderült, hogy a legtoxikusabb a 2012. augusztusi vízvirágzás volt, annál sokkal alacsonyabb MC-t tartalmazott a 2013. augusztusi minta. A cianotoxin koncentrációk erősen korreláltak a mustár csíranövénytesztben megfigyelt toxicitással, melyben a 2012. augusztusi kivonat gátolta a növekedést a legerősebben.
- Munkánk emellett egyike azon kevés számú tanulmánynak, amelyek valós élőhelyről származó MC bioakkumulációt vizsgálnak. A *Ceratophyllum submersum* alámerülő vízi makrofita magas koncentrációban akkumulált MC-t a toxikus víztérben. A növényi szövetekben való toxin felhalmozódás és a víztérben mért toxin koncentrációk ismeretében pontosabb képet kapunk a MC bioakkumulációs folyamatairól. Ez releváns, ugyanis a legtöbb MC bioakkumulációs tanulmány laboratóriumi körülmények között zajlik, ahol a kísérletek során a külső környezeti tényezők alig vagy egyáltalán nem érvényesülnek.

A második tanulmány háttérében olyan *Microcystis* laboratóriumi izolátumokkal dolgoztunk, amelyek mikroginin termelők. Munkánk során pontosabb képet kaptunk az MG-k toxicitásáról, humán sejt kultúrák és növényi tesztrendszerben.

- Két *Microcystis* izolátum oligopeptid mintázatának vizsgálata során a teljes kivonatok oligopeptid összetétele nagyon hasonló volt, a B-14-01 törzsből MGL 402, MG 565, MG FR3, cyanostatin B és MG GH787 variánsokat, míg az F-14/9-S12-4-A-01 törzsből cyanostatin B, MG GH787 és MG FR3 metabolitokat azonosítottunk LC-ESI-MS segítségével. Ezen MG variánsok közül elsőként írtuk le az MGL 402 variánst.
- Munkánkban az MG tartalmú cianobakteriális kivonatok növényekre gyakorolt hatását elsőként írtuk le, amelyet MC-re bizonyítottan érzékeny *Sinapis alba* mustár csíranövények növekedésével értékeltünk a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszék törzsgyűjteményéből származó, MC termelő BGSD 243 törzssel összevetve. A BGSD 243 kivonathoz képest az MG tartalmú kivonatok nagyságrendekkel magasabb koncentrációkban fejtették ki növekedésgátló hatásukat, ugyanakkor az F-14/9-S12-4-A-01 kivonatnak 3-szor alacsonyabb IC_{50} értéke volt, mint a B-14-01 kivonatnak. Továbbá a 0,8-1,6 mg mL⁻¹ koncentráció tartományban megfigyeltük a kivonatok kisebb mértékű biopozitív, növekedés serkentő hatását.
- A teljes cianobakteriális kivonatok és az oszlopkromatográfiával (anion-cserélő, méretkizárásos, és reverz fázisú) megtisztított MG monokomponensek citotoxikus és genotoxikus aktivitását *in vitro* humán hepatocelluláris HepG2 sejtvonalon vizsgáltuk. A teljes cianobakteriális kivonatok eltérő módon hatottak a sejtviabilitásra (24

óra) és proliferációra (72 óra). Az IC₅₀ értékük alapján az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat viabilitásra kifejtett hatása volt erősebb, a B-14-01 kivonat pedig hosszabb expozíciót követően toxikusabbnak bizonyult. Azonban a tiszta mikroginin variánsok relatíve alacsony citotoxicitását figyeltük meg, a legcitotoxikusabb az MGL 402 volt, míg az MG FR3 a legkevésbé volt hatással a sejtéletképességre.

- Elsőként szolgáltatunk bizonyítékot a mikrogininek HepG2 sejtekben bekövetkező genotoxikus aktivitására. A cianobakteriális kivonatok és tiszta mikrogininek 4 és 24 órás expozíciót követően a comet assay-ben DNS száltöréseket indukáltak. A legtoxikusabb az MGL 402 variáns volt. Azonban cianobakteriális kivonatok és MG-k 24 és 72 órás expozíciót követően nem indukáltak DNS kettős száltörést a γ H2AX tesztben.
- Továbbá az MG-k potenciális klasztogén aktivitását a HepG2 sejtekben a CBMN teszttel értékeltük. Az MG GH787 indukálta az MNi és NPB képződését, míg az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat és a cyanostatin B az MNi képződés gyakoriságát növelte. A B-14-01 kivonat és MG 565+cyanostatin B indukálta az NPB képződését. Eredményeink arra utalnak, hogy a MG-k képesek a genomi változások indukciójára.
- Vizsgálatainkból kiderült, hogy a cianobakteriális kivonatok és mindegyik MG variáns DNS károsodást indukált a HepG2 sejtekben. A növényi tesztrendszerben is befolyásolták a csíranövények növekedését. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a mikrogininek potenciális káros hatásainak vizsgálata időszerű, és szükséges, mivel még nem áll rendelkezésre elég információ, hogy a környezeti és közegészségügyi kockázatot felmérjük.

Summary

Toxic cyanobacterial blooms (cyanoHABs) are commonly formed by *Microcystis* in freshwater ecosystems. They produce a wide range of bioactive secondary metabolites from which the most ubiquitously present group is the microcystins (MC). Another group, the microginins (MG) is also present in co-occurrence with microcystins (MCs) and it is generally believed that toxicity of MGs is much lower than that of MCs.

The dissertation focuses on a relevant global problem: the production of bioactive metabolites occurring in cyanoHABs, and discusses their role in the ecosystem as well as their potential adverse effects. The present work includes two sections studying two oligopeptide groups produced by *Microcystis sp.* The first is studying the toxicity of MCs under field conditions and the second is studying *in vitro* the adverse effects of the MGs at molecular, cellular level as well as in the vascular plant.

- The first part, a field study, was based on the observations of a toxic, MC producing *Microcystis aeruginosa* waterbloom event detected in the early 2000s. Our aim, based on those previous observations, was to study the toxin producer species, as well as the dynamics and variability of the cyanotoxin MCs. We studied the toxicity of waterblooms in plant test systems including the *in situ* MC bioaccumulation in *Ceratophyllum submersum* in the real environment, as well as the *in vitro* inhibitory activity of phytoplankton samples on the growth of white mustard (*Sinapis alba*) seedlings.
- During the waterbloom events between 2011 and 2013 in Lake Bárdos (Gyula), *Microcystis sp.* and *Planktothrix agardhii*, two common bloom-forming species were detected in different ratios. During the

waterbloom of August 2012 *Microcystis sp.* was the dominant species. Oligopeptide pattern analyses showed that the phytoplankton sample from August 2012 contained the common MC congeners MC-LR, -YR, -LY and [Dha⁷] MC-RR. Further, the analyses of the biosynthesis genes proved *mcy+* population overgrowth in the phytoplankton sample of August 2012 which corroborated that *Microcystis sp.* was responsible for producing MCs.

- The measurements of the MC content of the cell-free water samples (extracellular MC) and phytoplankton samples (intracellular MC) showed that the waterbloom from August 2012 contained higher concentrations of MC than the sample from August 2013. There was a strong correlation between these results and the toxicity observed from mustard seedling growth test, as the sample from August 2012 exerted the highest activity on growth inhibition.
- Our work is one of the few studies where the MC bioaccumulation in aquatic macrophytes was investigated in the real environment. We demonstrated that *Ceratophyllum submersum*, a submerged aquatic macrophyte, is capable of accumulating MC in their tissues in higher concentrations. In view of the accumulation potential of MCs in vascular plants in relation to the toxin concentrations detected in their natural aquatic environments, we can understand better the MC bioaccumulation processes. This is relevant, as most of the studies focusing on the bioaccumulation of MC are under laboratory conditions where the plants are rarely or not at all influenced by the external environmental factors.

The second part of our study was focusing on microginin (MG) producer *Microcystis* isolated laboratory strains. This work investigates the toxicity of MGs and cyanobacterial extracts in human cellular and plant test systems.

- We demonstrated that the oligopeptid patterns of two *Microcystis* isolates showed similarity by LC-ESI-MS. The B-14-01 strain contained MGL 402, MG 565, MG FR3, cyanostatin B and MG GH787 microginins, while the F-14/9-S12-4-A-01 strain produced the congeners cyanostatin B, MG GH787 and MG FR3. Here, we reported the congener MGL 402 for the first time.
- Our work is the first to describe the effects of MG containing cyanobacterial extracts on plants. We used the well established MC-sensitive *Sinapis alba* seedling growth test and as a positive control we applied the MC producer, BGSD 243 strain originated from the culture collection of Department of Botany, University of Debrecen. Both of the cyanobacterial extracts containing MGs showed lower activity on growth inhibition compared to BGSD 234 extract. On the other hand, the IC₅₀ of the F-14/9-S12-4-A-01 extract was 3 times lower than that of B-14-01 extract. We also observed that both extracts at 0.8-1.6 mg mL⁻¹ concentration range stimulated the seedling growth.
- The complex cyanobacterial extracts and the compounds purified by chromatography (anion-exchange, size-exclusion, reverse-phase) were used for toxicity studies. Their cytotoxic and genotoxic activity was studied in the human hepatocellular HepG2 cell line. We observed differences in the effects of the complex extracts in the viability (24 h) and proliferation (72 h). While the extract F-14/9-S12-4-A-01 showed a lower IC₅₀ for the viability, after longer exposure, the extract B-14-01

resulted to be more potent. Pure MGs showed relatively low cytotoxicity after longer exposure, MGL 402 being the most cytotoxic and MG FR3 the least potent congener.

- Here, we provided evidence for the first time that MGs exert genotoxic activity in HepG2 cells. The cyanobacterial extracts and pure MGs induced DNA strand breaks after 4 and 24 h exposure in the comet assay. The most toxic congener was MGL 402. However, cyanobacterial extracts and MGs after 24 and 72 h exposure did not induce the formation of DNA double-strand breaks in the γ H2AX assay.
- Moreover, the potential clastogenic activity of MGs in HepG2 cells was evaluated with the CBMN assay. The congener MG GH787 induced the formation of MNi and NPBs, while the extract F-14/9-S12-4-A-01 and cyanostatin B increased the frequencies of MNi. The extract B-14-01 and MG 565+cyanostatin B induced only the formation of NPBs. These observations suggest that MGs are capable of inducing genomic alterations.
- Our investigations show that cyanobacterial extracts containing MGs and pure MGs induce DNA damage in HepG2 cells. The cyanobacterial extracts influenced seedling growth. Our results indicate that MGs may represent hazards for aquatic environments and humans, however further studies are required for the assessment of the potential risk.

Irodalomjegyzék

1. Agha, R., Lezcano, M.Á., Labrador, M. del M., Cirés, S., Quesada, A., 2014. Seasonal dynamics and sedimentation patterns of *Microcystis* oligopeptide-based chemotypes reveal subpopulations with different ecological traits. *Limnol. Oceanogr.* 59, 861–871.
2. Allen, M.M., 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4, 1–4.
3. Annala, A., Lehtimäki, J., Mattila, K., Eriksson, J.E., Sivonen, K., Rantala, T.T., Drakenberg, T., 1996. Solution structure of nodularin: An inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 271, 16695–16702.
4. Aráoz, R., Molgó, J., Tandeau de Marsac, N., 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon.* 56, 813–828.
5. Bácsi, I., Surányi, G., Gonda, S., Gyémánt, G., Vasas, G., 2011. Observation of sward destruction caused by irrigation with toxic *Microcystis* morphospecies containing water in Southern Hungary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 232–237.
6. Bafana, A., Krishnamurthi, K., Sivanesan, S., Naoghare, P.K., 2018. Mutagenicity and genotoxicity testing in environmental pollution control, in: Kumar, A., Dobrovolsky, V.N., Dhawan, A., Shanker, R. (Szerk.), *Mutagenicity: Assays and Applications*. Academic Press, 113–132.
7. Bagchi, S.N., Sondhia, S., Agrawal, M.K., Banerjee, S., 2016. An angiotensin-converting enzyme-inhibitory metabolite with partial structure of microginin in a cyanobacterium *Anabaena fertilissima* CCC597, producing fibrinolytic protease. *J. Appl. Phycol.* 28, 177–180.
8. Bazin, E., Mourot, A., Humpage, A.R., Fessard, V., 2010. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 251–259.
9. Beversdorf, L.J., Weirich, C.A., Bartlett, S.L., Miller, T.R., 2017. Variable cyanobacterial toxin and metabolite profiles across six eutrophic lakes of differing physiochemical characteristics. *Toxins (Basel).* 9, 62.
10. Bittencourt-Oliveira, M. do C., Cordeiro-Araújo, M.K., Chia, M.A., Arruda-Neto, J.D. de T., Oliveira, Ê.T. de, Santos, F. dos, 2016. Lettuce irrigated with contaminated water: Photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 83–90.
11. Bláha, L., Cameán, A.M., Fessard, V., Gutiérrez-Praena, D., Jos, Á., Marie, B., Metcalf, J.S., Pichardo, S., Puerto, M., Törökne, A., Vasas, G., Žegura, B., 2017. Bioassay use in the field of toxic cyanobacteria, in: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Szerk.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley and Sons Ltd., 272–279.
12. Blom, J.F., Baumann, H.I., Codd, G.A., Jüttner, F., 2006. Sensitivity and adaptation of aquatic organisms to oscillapeptin J and [D-Asp³,(E)-

- Dhb7]microcystin-RR. Arch. fur Hydrobiol. 167, 547–559.
- 13.Bober, B., Bialczyk, J., 2017. Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin. J. Appl. Phycol. 29, 1355–1362.
 - 14.Bober, B., Lechowski, Z., Bialczyk, J., 2011. Determination of some cyanopeptides synthesized by *Woronichinia naegeliana* (Chroococcales, Cyanophyceae). Phycol. Res. 59, 286–294.
 - 15.Briand, E., Bormans, M., Gugger, M., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., 2016. Changes in secondary metabolic profiles of *Microcystis aeruginosa* strains in response to intraspecific interactions. Environ. Microbiol. 18, 384–400.
 - 16.Bubik, A., Sedmak, B., Novinec, M., Lenarčič, B., Lah, T.T., 2008. Cytotoxic and peptidase inhibitory activities of selected non-hepatotoxic cyclic peptides from cyanobacteria. Biol. Chem. 389, 1339–1346.
 - 17.Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. Arch. Toxicol. 91, 1049–1130.
 - 18.Cao, Q., Wan, X., Shu, X., Xie, L., 2019. Bioaccumulation and detoxication of microcystin-LR in three submerged macrophytes: The important role of glutathione biosynthesis. Chemosphere. 225, 935–942.
 - 19.Carneiro, R.L., Dörr, F.A., Dörr, F., Bortoli, S., Delherbe, N., Vásquez, M., Pinto, E., 2012. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis sp.* FEMS Microbiol. Ecol. 82, 692–702.
 - 20.Castenholz, R.W., Garcia-Pichel, F., 2013. Cyanobacterial responses to UV radiation, in: Whitton B.A. (Szerk.), Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 481–499.
 - 21.Catherine, A., Bernard, C., Spooof, L., Bruno, M., 2017. Microcystins and Nodularins, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Wiley and Sons Ltd. Chichester, West Sussex, UK. 107–126.
 - 22.Chlipala, E.G., Mo, S., Orjala, J., 2011. Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – A Source for Drug Discovery. Curr. Drug Targets. 12, 1654–1673.
 - 23.Chorus, I., Niesel, V., Börner, T., Cadel, S., Christoffersen, K., Claussner, Y., Codd, G.A., Dietrich, D., Dittman, E., Fastner, J., Ferreira Ferreira, A.-H., Grummt, T., Heinze, R., Höger, S., Itean, I., Kurmayer, R., Lyck, S., Rohrlack, T., Rouhiainen, L., Schober, E., Sivonen, K., Tandeau de Marsac, N., Tonk, L., Utkilen, H., Visser, P.M., von Döhren, H., Warming-Svensden, T., Welker, M., 2006. Toxic and Bioactive Peptides in Cyanobacteria - PEPCY Final report., <https://www.uibk.ac.at/limno/files/pdf/final-report-pepcy.pdf>.
 - 24.Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E., 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, evolution, and manipulation. J. Bacteriol. 185, 564–572.
 - 25.Corbel, S., Mougín, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of

- actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*. 96, 1–15.
26. Cox, P.A., Kostrzewa, R.M., Guillemin, G.J., 2018. BMAA and Neurodegenerative Illness. *Neurotox. Res.* 33, 178–183.
 27. de Lima Cardoso, R., Carvalho-Neta, R.N.F., de Castro, A.C.L., Ferreira, C.F.C., Silva, M.H.L., de Jesus Azevedo, J.W., Sobrinho, J.R.S.C., Santos, D.M.S., 2018. Histological and genotoxic biomarkers in *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) for environmental assessment in a protected area in the Northeast of Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 101, 570–579.
 28. Dias, E., Louro, H., Pinto, M., Santos, T., Antunes, S., Pereira, P., Silva, M.J., 2014. Genotoxicity of microcystin-LR in *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Biomed Res. Int.* 949521, 1–9.
 29. Díez-Quijada, L., Llana-Ruiz-Cabello, M., Cătunescu, G.M., Puerto, M., Moyano, R., Jos, A., Cameán, A.M., 2019a. *In vivo* genotoxicity evaluation of cylindrospermopsin in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 132, 110664.
 30. Díez-Quijada, L., Prieto, A.I., Guzmán-Guillén, R., Jos, A., Cameán, A.M., 2019b. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food Chem. Toxicol.* 125, 106–132.
 31. Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., Fewer, D.P., 2015. Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the Cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 23, 642–652.
 32. Dolman, A.M., Rücker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., Wiedner, C., 2012. Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One*. 7, e38757.
 33. Elersek, T., Bláha, L., Mazur-Marzec, H., Schmidt, W., Carmeli, S., 2017. Other Cyanobacterial Bioactive Substances, in: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Szerk.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Wiley and Sons Ltd. Chichester, West Sussex, UK. 179–195.
 34. Falconer, I.R., 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts—More than microcystins! *Toxicon*. 50, 585–588.
 35. Farkas, O., Gyémant, G., Hajdú, G., Gonda, S., Parizsa, P., Horgos, T., Mosolygó, Á., Vasas, G., 2014. Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary. *Acta Biol. Hung.* 65, 227–239.
 36. Fastner, J., Erhard, M., Von Döhren, H., 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis spp.* (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5069–5076.
 37. Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 81–95.
 38. Fernandes, K., Gomes, A., Calado, L., Yasui, G., Assis, D., Henry, T., Fonseca, A., Pinto, E., 2019. Toxicity of cyanopeptides from two *Microcystis* strains on larval development of *Astyanax altiparanae*. *Toxins (Basel)*. 11, 220.

39. Fewer, D.P., Jokela, J., Paukku, E., Österholm, J., Wahlsten, M., Permi, P., Aitio, O., Rouhiainen, L., Gomez-Saez, G. V., Sivonen, K., 2013. New structural variants of aeruginosin produced by the toxic bloom forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. PLoS One 8, e73618.
40. Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Pourrut, B., Del Bo, C., Novak, M., Sramkova, M., Milić, M., Gutzkow, K.B., Costa, S., Dusinska, M., Brunborg, G., Collins, A., 2019. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 779, 82–113.
41. Garcia-Canton, C., Anadón, A., Meredith, C., 2012. γ H2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: Applications for the assessment of the *in vitro* genotoxicity of cigarette smoke. Toxicol. Vitro. 26, 1075–1086.
42. Garibo, D., Flores, C., Cetó, X., Prieto-Simón, B., del Valle, M., Caixach, J., Diogène, J., Campàs, M., 2014. Inhibition equivalency factors for microcystin variants in recombinant and wild-type protein phosphatase 1 and 2A assays. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 10652–10660.
43. Geada, P., Gkelis, S., Teixeira, J., Vasconcelos, V., Vicente, A.A., Fernandes, B., 2017. Cyanobacterial toxins as a high value-added product, in: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products. Woodhead Publishing, UK. 401–428.
44. Gehringer, M.M., Adler, L., Roberts, A.A., Moffitt, M.C., Mihali, T.K., Mills, T.J.T., Fieker, C., Neilan, B.A., 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc sp.* ISME J. 6, 1834–1847.
45. Gerić, M., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., 2014. γ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. Ecotoxicol. Environ. Saf. 105, 13–21.
46. Gesner-Apter, S., Carmeli, S., 2008. Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis sp.* Tetrahedron. 64, 6628–6634.
47. Gkelis, S., Lanaras, T., Sivonen, K., Tagliatalata-Scafati, O., 2015. Cyanobacterial toxic and bioactive peptides in freshwater bodies of Greece: Concentrations, occurrence patterns, and implications for human health. Mar. Drugs. 13, 6319–6335.
48. Greer, B., McNamee, S.E., Boots, B., Cimarelli, L., Guillebault, D., Helmi, K., Marcheggiani, S., Panaiotov, S., Breitenbach, U., Akçalan, R., Medlin, L.K., Kittler, K., Elliott, C.T., Campbell, K., 2016. A validated UPLC-MS/MS method for the surveillance of ten aquatic biotoxins in European brackish and freshwater systems. Harmful Algae. 55, 31–40.
49. Harrigan, G.G., Luesch, H., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., Nagle, D.G., Paul, V.J., 1999. Symplostatin 2: A dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*. J. Nat. Prod. 62, 655–658.
50. Hastie, C.J., Borthwick, E.B., Morrison, L.F., Codd, G.A., Cohen, P.T.W., 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1726, 187–193.
51. Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Jos, Á., Cameán, A.M., Žegura, B.,

2017. Genotoxic potential of the binary mixture of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin. *Chemosphere*. 189, 319–329.
52. Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., Žegura, B., 2019. Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Sci. Total Environ*. 687, 267–276.
53. Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J., Stopper, H., 2017. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat. Res.-Rev. Mutat*. 771, 85–98.
54. Huang, I.S., Zimba, P. V., 2019. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae*. 83, 42–94.
55. Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H., Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol*. 16, 471–483.
56. Humbert, J.-F., 2017. Molecular tools for the detection of toxigenic cyanobacteria in natural ecosystems, in: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Szerk.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Wiley, Wiley and Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK. 280–285.
57. Humbert, J.-F., Fastner, J., 2017. Ecology of Cyanobacteria, in: Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Szerk.), *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Wiley and Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK. 11–18.
58. Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 472, 155–161.
59. Humpage, A.R., Fontaine, F., Froscio, S., Burcham, P., Falconer, I.R., 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A*. 68, 739–753.
60. Ibelings, B.W., Bruning, K., De Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio Pires, L.M., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. *Microb. Ecol*. 49, 487–500.
61. Ikehara, T., Imamura, S., Sano, T., Nakashima, J., Kuniyoshi, K., Oshiro, N., Yoshimoto, M., Yasumoto, T., 2009. The effect of structural variation in 21 microcystins on their inhibition of PP2A and the effect of replacing cys269 with glycine. *Toxicon*. 54, 539–544.
62. Ishida, K., Kato, T., Murakami, M., Watanabe, M., Watanabe, M.F., 2000a. Microginins, zinc metalloproteases inhibitors cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*. 56, 8643–8656.
63. Ishida, K., Matsuda, H., Murakami, M., 1998. Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*. 54, 13475–13484.
64. Ishida, K., Nakagawa, H., Murakami, M., 2000b. Microcyclamide, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat.*

- Prod. 63, 1315–1317.
65. Ishida, K., Okita, Y., Matsuda, H., Okino, T., Murakami, M., 1999. Aeruginosins, protease inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*. 55, 10971–10988.
 66. Ishitsuka, M.O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., Watanabe, M.M., 1990. Microviridin: A novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8180–8182.
 67. Janssen, E.M.L., 2019. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Res.* 151, 488–499.
 68. Jia, J., Chen, Q., Lauridsen, T.L., 2016. A systematic investigation into the environmental fate of microcystins and the potential risk: Study in Lake Taihu. *Toxins (Basel)*. 8, 170.
 69. Kaur, R., Shah, T.K., Kaur, S., Rani, S., 2018. A review on genotoxicity in aquatic organisms and environment A review on genotoxicity in aquatic organisms and environment. *Pharma Innov. J.* 7, 353–359.
 70. Kodani, S., Suzuki, S., Ishida, K., Murakami, M., 1999. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 343–348.
 71. Komárek, J., Anagnostidis, K., 1998. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales, Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
 72. Kós, P., Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G., 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal. Biochem.* 225, 49–53.
 73. Kraft, M., Schleberger, C., Weckesser, J., Schulz, G.E., 2006. Binding structure of the leucine aminopeptidase inhibitor microginin FR1. *FEBS Lett.* 580, 6943–6947.
 74. Kurki-Helasma, K., Meriluoto, J., 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon*. 36, 1921–1926.
 75. Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., Chorus, I., 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis spp.* in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb. Ecol.* 43, 107–118.
 76. Lawton, L.A., Edwards, C., 2001. Purification of microcystins. *J. Chromatogr. A.* 912, 191–209.
 77. Lee, S., Jiang, X., Manubolu, M., Riedl, K., Ludsin, S.A., Martin, J.F., Lee, J., 2017. Fresh produce and their soils accumulate cyanotoxins from irrigation water: Implications for public health and food security. *Food Res. Int.* 102, 234–245.
 78. Lenz, K.A., Miller, T.R., Ma, H., 2019. Anabaenopeptins and cyanopeptolins induce systemic toxicity effects in a model organism the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 214, 60–69.
 79. Levizou, E., Statoris, G., Papadimitriou, T., Laspidou, C.S., Kormas, K.A.,

2017. Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143, 193–200.
80. Lifshits, M., Zafrir-Ilan, E., Raveh, A., Carmeli, S., 2011. Protease inhibitors from three fishpond water blooms of *Microcystis spp.* *Tetrahedron.* 67, 4017–4024.
81. Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* 23, 200–222.
82. Lodin-Friedman, A., Carmeli, S., 2018. Microginins from a *Microcystis sp.* bloom material collected from the Kishon reservoir, Israel. *Mar. Drugs.* 16, 78.
83. M-Hamvas, M., Máthé, C., Vasas, G., Jámbrik, K., Papp, M., Beyer, D., Mészáros, I., Borbély, G., 2010. Cylindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis. *Acta Biol. Hung.* 61, 35–48.
84. Machado, J., Campos, A., Vasconcelos, V., Freitas, M., 2017. Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health. *Environ. Res.* 153, 191–204.
85. MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264, 187–192.
86. Martin, C., Oberer, L., Ino, T., König, W.A., Busch, M., Weckesser, J., 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from *Microcystis sp* PCC 7806. *J. Antibiot. (Tokyo).* 46, 1550–1556.
87. de la Escalera, G.M., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I., Piccini, C., 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae* 62, 73–83.
88. Martins, J., Saker, M.L., Moreira, C., Welker, M., Fastner, J., Vasconcelos, V.M., 2009. Peptide diversity in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 951–961.
89. Máthé, Csaba, M-Hamvas, M., Vasas, G., 2013a. Microcystin-LR and cylindrospermopsin induced alterations in chromatin organization of plant cells. *Mar. Drugs.* 11, 3689–3717.
90. Máthé, C., Vasas, G., Borbély, G., Erdodi, F., Beyer, D., Kiss, A., Surányi, G., Gonda, S., Jámbrik, K., M-Hamvas, M., 2013b. Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biol. Hung.* 64, 71–85.
91. Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C., 2005. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 299–306.

92. McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C., 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicol.* 39, 1411–1420.
93. Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J., 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 345–352.
94. Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6353–6362.
95. Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A., Vasconcelos, V., 2013. Cylindrospermopsin: Occurrence, methods of detection and toxicology. *J. Appl. Microbiol.* 114, 605–620.
96. Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55–63.
97. Mulvenna, V., Dale, K., Priestly, B., Mueller, U., Humpage, A., Shaw, G., Allinson, G., Falconer, I., 2012. Health risk assessment for cyanobacterial toxins in seafood. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9, 807–820.
98. Murakami, M., Okita, Y., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K., 1994. Aeruginosin 298-A, a thrombin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). *Tetrahedron Lett.* 35, 3129–3132.
99. Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C., Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 15, 1239–1253.
100. Neumann, U., Forchert, A., Flury, T., Weckesser, J., 1997. Microginin FR1, a linear peptide from a water bloom of *Microcystis* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 475–478.
101. Novak, M., Hercog, K., Žegura, B., 2016. Assessment of the mutagenic and genotoxic activity of cyanobacterial toxin beta-N-methyl-amino-L-alanine in *Salmonella typhimurium*. *Toxicol.* 118, 134–140.
102. Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M., Yamaguchi, K., 1993. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* 34, 501–504.
103. Osborne, N.J.T., Webb, P.M., Shaw, G.R., 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ. Int.* 27, 381–392.
104. Paiva, F.C.R., Ferreira, G.M., Trossini, G.H.G., Pinto, E., 2017. Identification, *in vitro* testing and molecular docking studies of microginins' mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Molecules.* 22, 1884.
105. Pamplona-Silva, M.T., Gonçalves, L.C., Marin-Morales, M.A., 2018. Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 166, 223–230.
106. Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On

- the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar. Drugs*. 8, 1650–1680.
107. Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A., 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6370–6378.
 108. Pflugmacher, S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407–413.
 109. Pflugmacher, S., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1999. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environ. Toxicol.* 14, 111–115.
 110. Pham, T.L., Utsumi, M., 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *J. Environ. Manage.* 213, 520–529.
 111. Pichardo, S., Cameán, A.M., Jos, A., 2017. *In vitro* toxicological assessment of cylindrospermopsin: A review. *Toxins (Basel)*. 9, 402.
 112. Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.* 16, 535–542.
 113. Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., Heisterkamp, S., Willigen, B. Van, 2018. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-137. R Package. version.
 114. Ploutno, A., Carmeli, S., 2002. Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc sp.* *Tetrahedron*. 58, 9949–9957.
 115. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 11, 395.
 116. Portmann, C., Blom, J.F., Gademann, K., Jüttner, F., 2008. Aerucyclamides A and B: Isolation and synthesis of toxic ribosomal heterocyclic peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J. Nat. Prod.* 71, 1193–1196.
 117. Puschner, B., 2018. Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins, in: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*. Gupta R.C.(Szerk.). Academic Press. Cambridge, Massachusetts, USA. 763–777.
 118. R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. Software. Vienna. <https://www.R-project.org>.
 119. Raška, J., Čtveráčková, L., Dydowiczová, A., Sovadinová, I., Bláha, L., Babica, P., 2019. Cylindrospermopsin induces cellular stress and activation of ERK1/2 and p38 MAPK pathways in adult human liver stem cells. *Chemosphere*. 227, 43–52.
 120. Reshef, V., Carmeli, S., 2001. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*. 57, 2885–2894.

121. Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A.K., Krett, G., Borics, G., Ujvárosi, A.Z., Vasas, G., 2019. *Microcystis* chemotype diversity in the alimentary tract of bigheaded carp. *Toxins* (Basel). 11, 288.
122. Rich, D.H., Moon, B.J., Harbeson, S., 1984. Inhibition of aminopeptidases by amastatin and bestatin derivatives. Effect of inhibitor structure on slow-binding processes. *J. Med. Chem.* 27, 417–422.
123. Romero-Oliva, C.S., Contardo-Jara, V., Block, T., Pflugmacher, S., 2014. Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops - A case study from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102, 121–128.
124. Romero-Oliva, C.S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., 2015. Antioxidative response of the three macrophytes *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata* to a time dependent exposure of cell-free crude extracts containing three microcystins from cyanobacterial blooms of Lake Amatitlán, Guatemala. *Aquat. Toxicol.* 163, 130–139.
125. Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K., 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 686–692.
126. Rzymiski, P., Poniedzialek, B., 2012. Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (Cyanobacteria). *Postep. Dermatologii i Alergol.* 29, 47–50.
127. Sano, T., Kaya, K., 1997. A 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid-containing tetrapeptide from *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry.* 44, 1503–1505.
128. Sano, T., Takagi, H., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Kaya, K., 2005. Leucine aminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. *Phytochemistry.* 66, 543–548.
129. Sano, T., Usui, T., Ueda, K., Osada, H., Kaya, K., 2001. Isolation of new protein phosphatase inhibitors from two cyanobacteria species, *Planktothrix* spp. *J. Nat. Prod.* 64, 1052–1055.
130. Saqrane, S., Ghazali, I. El, Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V., 2008. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 43, 443–451.
131. Saqrane, S., Ouahid, Y., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F.F., 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon.* 53, 786–796.
132. Schmidt, E.W., Nelson, J.T., Rasko, D.A., Sudek, S., Eisen, J.A., Haygood, M.G., Ravel, J., 2005. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7315–7320.

133. Sedmak, B., Eleršek, T., Grach-Pogrebinsky, O., Carmeli, S., Sever, N., Lah, T.T., 2008. Ecotoxicologically relevant cyclic peptides from cyanobacterial bloom (*Planktothrix rubescens*) – A threat to human and environmental health. *Radiol. Oncol.* 42, 102–113.
134. Silva-Stenico, M.E., Silva, C.S.P., Lorenzi, A.S., Shishido, T.K., Etchegaray, A., Lira, S.P., Moraes, L.A.B., Fiore, M.F., 2011. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiol. Res.* 166, 161–175.
135. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175,184–191.
136. Song, H., Coggins, L.X., Reichwaldt, E.S., Ghadouani, A., 2015. The importance of lake sediments as a pathway for microcystin dynamics in shallow eutrophic lakes. *Toxins (Basel)*. 7, 900–918.
137. Spooft, L., Błaszczuk, A., Meriluoto, J., Cegłowska, M., Mazur-Marzec, H., 2016. Structures and activity of new anabaenopeptins produced by Baltic Sea cyanobacteria. *Mar. Drugs*. 14, 8.
138. Štern, A., Rotter, A., Novak, M., Filipič, M., Žegura, B., 2019. Genotoxic effects of the cyanobacterial pentapeptide nodularin in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 124, 349–358.
139. Stewart, A.K., Ravindra, R., Van Wagoner, R.M., Wright, J.L.C., 2018. Metabolomics-guided discovery of microginin peptides from cultures of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* 81, 349–355.
140. Strangman, W.K., Wright, J.L.C., 2016. Microginins 680, 646, and 612 - New chlorinated AhoA-containing peptides from a strain of cultured *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* 57, 1801–1803.
141. Štraser, A., Filipič, M., Novak, M., Žegura, B., 2013. Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells. *Mar. Drugs*. 11, 3077–3090.
142. Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B., 2011. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch. Toxicol.* 85, 1617–1626.
143. Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: An integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7, 753–764.
144. Tooming-Klunderud, A., Fewer, D.P., Rohrlack, T., Jokela, J., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Kristensen, T., Jakobsen, K.S., 2008. Evidence for positive selection acting on microcystin synthetase adenylation domains in three cyanobacterial genera. *BMC Evol. Biol.* 8, 256.
145. Turner, A.D., Dhanji-Rapkova, M., O'Neill, A., Coates, L., Lewis, A., Lewis, K., 2018. Analysis of microcystins in cyanobacterial blooms from freshwater bodies in England. *Toxins (Basel)*. 10, 1–29.
146. Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Yoshida, F., Suttajit,

- M., Mebs, D., Putsch, M., Vasconcelos, V., 1996. Survey of microcystins in environmental water by a highly sensitive immunoassay based on monoclonal antibody. *Nat. Toxins.* 4, 271–276.
147. Ujvárosi, A.Z., Hercog, K., Riba, M., Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B., 2020. The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Chemosphere.* 240, 124880.
148. Ujvárosi, A.Z., Riba, M., Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., M-Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C., 2019. Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure. *Sci. Total Environ.* 662, 735–745.
149. Vasas, G., Farkas, O., Borics, G., Felföldi, T., Sramkó, G., Batta, G., Bácsi, I., Gonda, S., 2013. Appearance of *Planktothrix rubescens* bloom with [D-Asp3, Mdha7]MC-RR in gravel pit pond of a shallow lake-dominated area. *Toxins (Basel).* 5, 2434–2455.
150. Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, G., 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.
151. Vasas, G., Szydłowska, D., Gáspár, A., Welker, M., Trojanowicz, M., Borbély, G., 2006. Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 66, 87–97.
152. Vichi, S., Buratti, F.M., Testai, E., 2016. Microcystins: Toxicological Profile, in: P, G., Haddad Jr., V., Tubaro, A., Kim, E., Kem, W.R. (Szerk.), *Marine and Freshwater Toxins.* Springer Science+Business Media Dordrecht, 219–238.
153. Violi, J.P., Mitrovic, S.M., Colville, A., Main, B.J., Rodgers, K.J., 2019. Prevalence of β -methylamino-L-alanine (BMAA) and its isomers in freshwater cyanobacteria isolated from eastern Australia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 72–81.
154. Welker, M., Brunke, M., Preussel, K., Lippert, I., von Döhren, H., 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studies by single-colony mass spectrometry. *Microbiology.* 150, 1785–1796.
155. Welker, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., von Döhren, H., 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides.* 27, 2090–2103.
156. Welker, M., Von Döhren, H., 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 530–563.
157. Wickham, H., 2007. Reshaping Data with the reshape Package. *J. Stat. Softw.* 21, 1–20.

158. Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs*. 8, 2185–2211.
159. World Health Organization, 2017. Chemical fact sheets, in: Geneva (Szerk.), *Guidelines for drinking-water quality*, 4th edition, incorporating the 1st addendum. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 307–442.
160. World Health Organization (WHO), 2003. *Guidelines for Safe Recreational Waters, Volume 1 - Coastal and Fresh Waters*, in: Geneva. WHO Publishing, Geneva. 136–158.
161. Yunes, J.S., 2019. Cyanobacterial toxins, in: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Szerk.), *Cyanobacteria: From basic science to applications*. Academic Press, United Kingdom. 443–458.
162. Žegura, B., 2016. An overview of the mechanisms of microcystin-LR genotoxicity and potential carcinogenicity. *Mini-Reviews Med. Chem.* 16, 1042–1062.
163. Žegura, B., Lah, T.T., Filipič, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*. 200, 59–68.
164. Žegura, B., Sedmak, B., Filipič, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol.* 41, 41–48.
165. Žegura, B., Štraser, A., Filipič, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 727, 16–41.
166. Žegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipič, M., 2008. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicol.* 51, 615–623.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Vasas Gábor tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette, valamint szakmai tapasztalatával támogatta, nyomon követte munkámat a kezdetektől.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá a DE TTK Növényteni Tanszék valamennyi dolgozójának, külön kiemelve Dr. Gonda Sándort, Barna Erzsébetet és Riba Milánt, a munkámhoz nyújtott szakmai segítségért.

Továbbá köszönettel tartozom a MALDI-TOF tömegspektrometriás mérésekben nyújtott segítségért Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek (DE TTK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék), és Dr. Kiss-Szikszai Attila egyetemi docensnek (DE TTK Szerves Kémiai Tanszék) az LC-MS mérésekben való közreműködéséért.

Köszönöm a lehetőséget Prof. Dr. Metka Filipič-nek, hogy a NIB intézet genotoxikológiai laborjában dolgozhattam. Köszönettel tartozom Dr. Bojana Žeguranak, aki témavezetésével és szakmai támogatásával lehetővé tette a humán sejtkultúrán végzett genotoxikológiai vizsgálatokat. Nagyon hálás vagyok Dr. Matjaž Novak, Klara Hercog és Martina Štampar szakmai és baráti támogatásának a Ljubljában töltött időszakom alatt.

Végezetül hálás vagyok a szüleimnek és a hozzám legközelebb állóknak, Ancsának és Bennek a hihetetlenül sok türelemért, biztatásért és támogatásért.

Kutatásainkat a következő pályázatok támogatták: NKFIH K119647, EFOP-3.6.1-16-2016-00022, GINOP-2.3.3-15-2016-00021, 20428-3/2018/FEKUTSTRAT, és COST Action ES1105 (CYANOCOST) és a Szlovén Kutatási Ügynökség (research core funding P1-0245 and MR-Khercog), valamint a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Publikációs lista

a. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Ujvárosi, A.Z., Hercog, K., Riba, M., Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B., 2020. The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Chemosphere 240, 124880.

Impakt faktor: 5,108

Ujvárosi, A.Z., Riba, M., Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., M-Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C., 2019. Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure. Sci. Total Environ. 662, 735–745.

Impakt faktor: 5,589

Ujvárosi A. Zs., 2014. Algatoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf víztérben. Hidrol. Közlöny. 94:(5-6): 104-106.

Konferencia kiadványok:

Ujvárosi A. Zs., Vasas G., 2013. Algatoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf víztérben. In: Akvatikus és teresztris kutatások kapcsolata: Hidrobiológus Napok programfüzete. Bíró P., Reskóné Nagy M., Kiss K. T. (szerk.). Magyar Hidrológiai Társaság Limnológiai Szakosztálya; Tihany: MTA Ökológiai Kutató Központ Balatoni Limnológiai Intézet; Veszprém: Veszprémi Területi Bizottsága. LV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2013. október 2-4. p: 48.

Ujvárosi A Zs., 2014. Hazai eutróf víztér mikrocisztin termelésének és akkumulációjának vizsgálata. In: XIV. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia. Kovács M., Schmidt P (szerk.). Publikon, PTE Pécs, 2014.április.23-25. p: 189.

Prezentációk, poszterek:

Ujvárosi A. Zs., Vasas G. (2013): Algatoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf vízterben, LV. Hidrobiológus Napok. Tihany, 2013. október 2-4.

b. Egyéb közlemények:

Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., **Ujvárosi, A.Z.**, Vasas, G.: Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp. Toxins. 11 (5), 1-27, 2019.

Impakt faktor: 3,895

Riba, M., Borsodi, A., **Ujvárosi, A.Z.**, Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata. Hidrol. Közlöny. 96, 79-82, 2017.

Konferencia kiadványok:

Riba, M., Borsodi, A., **Ujvárosi, A.Z.**, Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata. In: Genetikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a hidrobiológiában: LVII. Hidrobiológus Napok : Tihany, 2015. október 7-9. Szerk.: Tóth Viktor, MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet, Tihany, 40-41, 2015.