

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Magyarország vizeitereiben megjelenő algavirágzások domináns
cianobaktérium fajainak toxintermelés és toxinvariabilitás vizsgálata**

**Analysis of toxins and toxin production variability of dominant
cyanobacteria species of algae blooms in Hungarian water areas**

Farkas Oszkár

Témavezető: Dr. Vasas Gábor



**DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2016.**

1. Bevezetés és célkitűzések

A Föld vízkészleteinek hosszú évtizedek óta folyó szennyeződése a vízi élőhelyek megváltozását, élőlényközösségek átrendeződését, élőlények pusztulását, fajok eltűnését eredményezte. Az ember környezetszennyező tevékenysége jelentősen növelte a vizek tápanyag összetételét, különösen a foszfor- és a nitrogénformák tekintetében. A tápanyagtartalom emelkedése összekapcsolható a város, a mezőgazdaság, az ipar fejlődésével, és mindez az eutrofizációs folyamatok felgyorsulásához vezetett. Az eutrofizáció során gyakori jelenség a vízvirágzás, mely egyes fotoautótrof planktonszervezetek (eukarióta algák és prokarióta cianobaktériumok) tömeges elszaporodását jelenti. Az elmúlt néhány évtizedben a planktonikus szervezetek tömeges előfordulása az édesvizekben és a tengerekben egyaránt megnőtt. Az eukarióta algák főleg tengerekben dominálnak, a cianobaktériumok pedig elsősorban az édesvízi élőhelyekre jellemzőek.

Számos cianobaktérium képes termelni toxikus peptidokat és alkaloidokat, amelyek fő veszélyt jelentenek az édesvízi ökoszisztémák és a vízgyűjtő területek ivóvíz készletének felhasználóira, illetve az öntözési, halászási és rekreációs célokra igénybe vevők számára (Codd, 1995; Carmichael, 2001). Ezen toxinok legsúlyosabb esetben a vízi szervezetek halálát okozhatják vagy potenciálisan árthatnak azáltal, hogy az elfogyasztásuk után felhalmozódnak a szervezetben.

A cianobaktériumok fokozott elterjedése és a tápanyagok növekedése közötti kapcsolat jól alátámasztott, de emellett más környezeti változások is szerepet játszanak a virágzások elterjedésében, fellendülésében. A vízfelszín hőmérsékletének emelkedése a globális felmelegedés eredménye, amely jelentősen segíti az algavirágzások túlzott expanzióját (Paerl és Huisman, 2009). Fontos megállapítani, hogy a virágzások összetett esetek, amelyeket tipikusan nem egy tényező okoz, hanem inkább több környezeti faktor egyidejű előfordulása váltja ki (Heisler és mtsai., 2008).

A gyakori toxintermelő cianobaktériumok közé tartoznak a planktonikus nitrogén-fixáló *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* fajok, továbbá a nem nitrogén-fixáló *Microcystis*, *Planktothrix* fajok, illetve a bentikus környezetben előforduló nitrogén-fixáló *Lyngbya* genusz. A leggyakoribb toxikus algavirágzást okozó édesvízi cianobaktériumok a *Microcystis* genusz képviselői közül kerülnek ki. Ugyanakkor a leggyakrabban előforduló és a legtöbb problémát okozó cianobakteriális toxinok, a mikro-cisztinek is részben ezekhez a fajokhoz köthetők.

A munkánk célja:

- Magyarország különböző vizeitében tömegesen megjelenő mikrocisztin termelő *Microcystis aeruginosa* és *Planktothrix agardhii* toxintermelő képességének valamint toxinvariabilitásának a vizsgálata.
- Egy jellemzően alpesi rétegzett mélytavakban előforduló cianobaktérium, a *Planktothrix rubescens* szokatlan, sekélytavi megjelenése kapcsán a toxintermelő képességének vizsgálata.
- A *Planktothrix rubescens* virágzás terepi mintájából izolált BGSD-500 törzs toxintermelésének és mcy gének szerkezetének jellemzése.

2. Anyag és módszer

2.1. Mintagyűjtés

A mintákat 15 magyarországi víztér algavirágzásából gyűjtöttük össze. A mintagyűjtés helyeként szolgáló tavak vizeit szabadidős tevékenységekre, ivóvízként vagy halastóként használják. Az összes mintát a vízfelszínéről 50 μm hálószeles planktonháló segítségével gyűjtöttük be. Az algavirágzásokból származó vízminták egy részét liofilizáltuk a másik részét $-20\text{ }^\circ\text{C}$ tároltuk, míg további vizsgálatainkhoz fel nem használtuk.

2.2. A vízvirágzást okozó planktonikus szervezetek azonosítása

Az algavirágzást alkotó fajokat fordított (inverz) fénymikroszkóp (LEICA DEMIL) segítségével azonosítottuk. A virágzásokban *M. aeruginosa* és *P. agardhii* fajokat detektáltunk. Egyetlenegy esetben a Magyarország északkeleti részén található Kocka-tóból vett mintában nem az előbb említett két fajt, hanem a *P. rubescens* azonosítottuk vízvirágzást okozó fajként. A *P. rubescens* esetében a taxonómiai, filogenetikai azonosítást 16S rRNS és fikocianin operon (*cpcBA*-IGS) gének segítségével végeztük el.

2.3. A *Planktothrix rubescens* tenyésztése

A Kocka-tóból izolált *P. rubescens* BGSD-500 kódjellel láttuk el. A BGSD-500 tenyésztését BG-11 tápoldaton 22°C-on folyamatos megvilágítás ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) alatt tartottuk. A tenyészetet sterilre szűrt levegővel buborékolgatott 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban neveltük, megoldva így a tenyészet keverését. A sejtek növekedésének nyomon követésére szárazanyag, klorofill-a tartalmat mértünk. A felnevelt tenyészeteket késői exponenciális fázisban centrifugáltuk és a sejt üledéket -20°C-on tároltuk. A toxikus szervezetek vizsgálata során bevált általános tapasztalat, hogy az adott toxikus vízvirágzást okozó cianobaktériumot izolálják és laboratóriumi tenyésztése során tesztelik toxicitását.

2.4. Minták toxicitásának vizsgálata

A mintáink toxicitásának méréséhez a Kós és munkatársai által, a mikrocisztin kimutatására és toxikológiai tesztelésére kidolgozott mustár csíranövény tesztet használtuk (Blue-Green Sinapis Test).

A tesztet megelőzi a minták előkészítése. A minták előkészítése két lépésből áll, az első lépés a sejtek feltárása fagyasztás-olvasztásos módszerrel, majd ezt követi a minták centrifugálása. A centrifugálás során egy alsó és egy felső fázis jön létre, az utóbbi tartalmazza a roncsolt sejtek beltartalmát. A toxintesztet a felülúszó fázissal végeztük el. A vizsgálati tesztnövény a fehér mustár (*Sinapis alba* L.) volt. A toxicitási tesztekben H₂O₂-dal sterilizált magvakat alkalmaztunk steril körülmények között. A minták nagy számára való tekintettel, módosított csíranövény tesztet dolgoztunk, amelyet mikrotiter-lemezen hajtottunk végre. A vizsgálandó felülúszó fázist tartalmazó, agarral (1%) szilárdított tápoldat (0.5 × Allen) felületére helyeztük a steril előcsíráztatott mustármagot. A növényeket sötétben, három-négy napig 25°C-on neveltük. Inkubálási időszak után megmértük a növény teljes hosszát, a hipokotil és a gyökérzet méretét (Vasas és mtsai., 2002). A mérési eredményeinket a kontroll növény értékeivel hasonlítottuk össze. A toxicitás mértékét az IC₅₀ (50 %-os növekedés gátlás) értékkel jellemeztük.

2.5. Mikrocisztinek tisztítása és szerkezeti azonosítása

A toxintisztítás első lépéseként a planktonmintát centrifugáltuk Beckman Avanti TM-J-25 centrifugával 5000 rpm. fordulatszámon, majd az így kapott

sejtüledéket -20 °C-on fagyasztottuk, majd felolvasztottuk (háromszori ismétléssel) a sejt-beltartalom feltárásának érdekében.

A liofilizált mintából a nagyobb molekulájú anyagokat pl. fehérjéket metanolos kicsapással távolítottuk el. A centrifugálás (Beckman Avanti TM-J-10, 25 min., 8500 rpm) után leöntöttük a kapott csapadékról az oldatban maradt anyagokat, és a továbbiakban a felülúszó réteggel dolgoztunk. Az összegyűjtött felülúszót 40°C-on rotációs bepárlóval koncentráltuk (Büchi Rotavapor-R). A bepárlás után a lombik falán kivált anyagot 5 mM-os pH 7,5 Tris-HCl pufferben feloldottuk, és az így létrejött oldatot dietil-aminoetil (DEAE) ioncserélő oszlopra felvittük, amelyet előtte ún. induló pufferrel, az 5 mM-os pH 7,5 Tris-HCl pufferrel egyensúlyba hoztunk. A felvitt minta reverzibilis módon megkötődött az oszlopon, és a mintában található szennyező anyagok – amelyek nem kötődtek az oszlophoz – az induló pufferrel történő mosás során távoztak. A kötött molekulák deszorpcióját az eluáló puffer összetételének megváltoztatásával értük el. Az eluláló pufferként szolgáló NaCl oldat koncentrációját 0-0,2 M között változtattuk. Az elválasztott frakciók hatását csíranövény teszttel végeztük el. A növekedésgátló hatást mutató frakciókat összeöntöttük, metanolban feloldottuk és C-18 HPLC oszlopra vittük fel, a szétválasztott összetevők abszorbanciáját 239 nm UV-VIS detektorral ellátott Shimadzu LC-10AD spektrofotométerrel végeztük el. Az elváló csúcsok toxicitását a fent említett mustár csíranövény teszt segítségével követtük nyomon.

Ezt követően a toxikus formák szerkezetét MALDI-TOF MS és NMR analízisekkel azonosítottuk és az azonosított MC variánsok koncentrációját kapilláris elektroforézissel határoztuk meg.

2.6. Toxingének detektálása

A toxingének vizsgálatához szükséges DNS-t terepi és liofilizált mintából nyertük ki. A DNS tisztítást fenol-kloroform módszerrel végeztük el. A kinyert minta DNS spektrumát és koncentrációját Shimadzu UV1601 spektrofotométer segítségével határoztuk meg. Az ismert koncentrációjú DNS mintákat bidesztillált DN-áz mentes vízben oldottuk fel és felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A PCR reakciók beállításánál különböző hőprogramokat alkalmaztunk. A *P. rubescens* teljes mcY génklaszterének a vizsgálatához 2 kb hosszúságú szakaszokat lefedő primerpárokat használtunk. A *P. rubescens* teljes génklaszterének a vizsgálata során feltárt 2 kb-tól eltérő szakaszokat, 500 bp hosszúságú PCR terméket adó primerpárok (Christiansen és mtsai., 2006) segítségével vizsgáltuk tovább. Az eredmények kiértékelését követően a kiválasztott szakaszok szekvenálását a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte el, és ezután BLAST analízissel azonosítottuk a szekvenciákat.

3. Eredmények

3.1. A *Microcystis aeruginosa* toxicitásának és toxinvariabilitásának vizsgálata

Az öt éves periódus alatt Magyarország különböző vizeireiben előforduló algavirágzásokból mintákat gyűjtöttünk. A megvizsgált 14 mintában, 10 esetben a *M. aeruginosa* volt a domináns faj. Az izolált törzsek toxicitását mustár csíranövény teszt segítségével határoztuk meg. A IC_{50} értéket a 72 óra után mért 50%-os növekedésgátlást (teljes növényhossz) okozó koncentrációban adtuk meg. A csíranövény teszt egy esetben, az Ónod mintánál nem mutatott toxicitást és az IC_{50} érték sem volt meghatározható. Ennek ellenére az előbbi mintában CE mérésrel nagyon alacsony MC koncentrációt detektáltunk.

A legtoxikusabb minta IC_{50} érték $245 \mu\text{g mL}^{-1}$ volt, amit a Bárdos-tóból gyűjtöttünk. A kalkulált IC_{50} értékek jól korrelálnak a CE módszerrel mért MC tartalommal. A legmagasabb MC koncentrációt is a Bárdos-tóból származó mintában mértük. A növényi növekedésgátlást okozó komponens részletes vizsgálatához DEAE cellulóz oszlop kromatográfiát alkalmaztunk, majd ezt követően az aktív növekedésgátló frakciókat HPLC segítségével tisztítottuk tovább fordított fázisú (C-18) oszlopon 1% metanollal. A megtisztított mintákat MALDI-TOF analízissel vizsgáltuk. Összesen 10 különböző MC variánst azonosítottunk a 10 minta esetében. A leggyakoribb variáns a MC-LR volt, ami a minták 70%-ában előfordult. MC-LR 7, MC-RR 5, MC-YR 4, MC-WR 4, [Dha⁷] MC-RR 4, [Asp³] MC-LR 1 esetben került azonosításra. A MC variánsok közül három nem gyakori forma is megjelent a mintákban: a MC-LL, -LF, és a [Dha⁷] MC-FR. A MC termelő fajoknál előfordult, olyan ahol csak egy, de ahol öt variánst is ki tudtunk mutatni.

3.2. A *Planktothrix agardhii* toxicitásának és toxin variabilitásának vizsgálata

A begyűjtött minták vizsgálata során 4 mintában a *P. agardhii* tömeges elszaporodását figyeltük meg. A csíranövény teszt három esetben nem mutatott ki toxicitást, és így az IC_{50} értéket sem tudtuk meghatározni ennél a három mintánál: Hajdúhadház, Kis-Balaton (4T), Gyula. Ennek ellenére a Hajdúhadház és a Gyula mintánál CE mérésrel nagyon alacsony MC koncentrációkat detektáltunk.

A legtoxikusabb mintát a Bivalyos-tóból gyűjtöttük (Gyula), amelynél az IC_{50} érték $916 \mu\text{g mL}^{-1}$ volt. Összesen 3 különböző MC variánst

azonosítottunk a 4 minta esetében, amelyek a következők voltak: [Asp³] MC-LR; [Dha⁷] MC-RR; [Asp³, Dha⁷] MC-RR. A leggyakoribb variáns a [Asp³] MC-LR forma volt, amit a minták 75%-ban azonosítottunk.

3.3. A mikrocisztin azonosítása és analízise terepi virágzási mintákból

A Kocka-tóból gyűjtött terepi vízvirágzás nyers kivonatának toxicitását először csíranövény teszttel vizsgáltuk. A csíranövény teszt segítségével határoztuk meg az IC₅₀ értéket a terepi mintánál, amely 0,97 mg mL⁻¹volt.

A terepi minta metanolos tisztítását követően a DEAE oszloppal szétválasztott frakciók toxikusságát is növényteszttel vizsgáltuk. Ezt követően azon frakciókat, amelyek toxikusnak bizonyultak C-18 HPLC oszlopra vittük fel, és a szétválasztott összetevők abszorbanciáját 239 nm-en detektáltuk.

A HPLC tisztítás során kinyert tiszta anyag szerkezetét MALDI-TOF MS és NMR szerkezetvizsgáló módszerekkel vizsgáltuk. Fő toxinként [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR formát azonosítottuk.

3.4. A mikrocisztin azonosítása és analízise BGSD-500 virágzási mintákból

A Kocka-tóból gyűjtött terepi mintából izolált BGSD-500 törzs nyers kivonatának toxicitását hasonlóan végeztük el, mint a terepi mintánál. A csíranövény teszt segítségével meghatározott IC₅₀ érték 2,47 mg mL⁻¹volt ami azt mutatja, hogy a BGSD-500 törzs kevésbé volt toxikus, mint a terepi minta. A minták nyers kivonatainak metanolos tisztítását követően a toxikus frakciók kémiai szerkezetét MALDI-TOF MS és NRM módszerrel határoztuk meg. Hasonlóan a terepi mintához fő toxinként [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR formát azonosítottuk. A laboratóriumi mintában 1,85 mg g⁻¹ volt a MC tartalom. Ez az eredmény jól mutatja a BGSD-500 törzs csökkent MC termelését a terepi mintához képest. A BGSD-500 törzs DNS PCR vizsgálata, mind a nyolc *mcy* gén meglétére pozitív eredményt adott. Ez az eredmény nem magyarázza meg a toxincsökkenést. A toxincsökkenés magyarázatáért a génklaszter további még részletesebb genetikai vizsgálata vált szükségessé.

3.5. A BGSD-500 törzs *mcy* génklaszterének analízise

A BGSD-500 törzs DNS teljes *mcy* génklaszterének vizsgálatához 28 olyan primerpárt alkalmaztunk, amelyek páronként 2 kb hosszúságú PCR

terméket adtak, így lefedve az 55 kb hosszúságú klasztert. A PCR analízist követően öt esetben nem kaptunk pozitív jelet. A 2 kb-tól eltérő szakaszokat 500 bp hosszúságú terméket adó primerpárok segítségével vizsgáltuk tovább. Ezen vizsgálattal szűkíteni tudtuk azokat a részeket a klaszteren belül, ahol fellelhetőek azon genetikai elemek, amelyek okozhatják a csökkent mikrocisztin termelést a BGSD-500 törzsben.

Egy esetben találtunk a vártnál kisebb terméket egy deléció, amely *mcyE* és *mcyG* gének közötti spacer régióban lokalizálódott. A deléció mellett egy inszerciós szakaszt is azonosítottunk, amely a *mcyT* és *mcyD* gének közötti spacer régióban helyezkedett el. Az inszerciós régióknak hosszát a szekvenálással 1606 nt hosszúnak állapítottuk meg. Ezt követően az inszerciós szekvenciát BLAST analízisnek vetettük alá. Az inszerciós szekvenciánk egynegyed hosszán 98%-os szekvencia azonosságot mutatott a *P. rubescens* és a *P. agardhii* mikrocisztin szintézisében szerepet játszó tioészteráz (*mcyT*) génnel. A *mcyT* génbe beékelődött 1194 kb hosszúságú szakasz *Synechococcus sp.* (PCC 6312 törzs, GenBank leltári száma: CP003558) jelátvitelében szerepet játszó hisztidin kinázzal és a tRNS(Ile)-lizidin szintetázzal volt hasonló.

4. Eredmények összefoglalása

Munkánk során öt éven keresztül gyűjtöttünk mintákat Magyarország különböző vizeitében megjelenő algavirágzásokból. A virágzásokat két jól ismert cianobaktérium faj a *Microcystis aeruginosa* és a *Planktothrix agardhii* okozta. A csíranövény teszt segítségével kimutattuk a minták eltérő toxicitását. A minták közül négy esetben a csíranövényteszt nem mutatott toxicitást. A legtoxikusabb minta a Bárdos-tóból származott.

A mustártesztben feltűnő gyökér növekedésgátló komponenseket ioncserés kromatográfiával, HPLC-vel megtisztítottuk, és MALDI TOF, NMR szerkezetvizsgáló módszerekkel azonosítottuk.

A MALDI-TOF MS analízissel a 14 mintában összesen 12 MC variánst azonosítottunk. A *M. aeruginosa* virágzásokban minden esetben detektáltunk MC formákat. A *M. aeruginosa* virágzások leggyakoribb MC formái a MC-LR, MC-RR, és a MC-YR voltak. A *P. agardhii* virágzások kevésbé voltak toxikusak, mint a *M. aeruginosa* virágzások. A *P. agardhii* virágzások fő MC formája a [Asp³] MC-LR volt.

A mikrocisztinek koncentrációját CE-vel mértük. A MC tartalom 0,010 és 15,701 mg/szárazanyag MC-LR ekvivalens értékek között mozgott. A legnagyobb MC koncentrációt a Bárdos mintánál mértük, ami összhangban áll a csíranövény teszt eredményével.

A vízvirágzások mintáiból kinyert DNS-eket a MC bioszintéziséért felelős génekre tervezett primer sorozatokkal teszteltük. A 14 minta

mindegyike pozitív eredményt adott legalább egy *mcy* gén meglétére az elvégzett PCR reakciók során, ezzel jelezték a gének részvételét a MC termelésében. Ezek az eredmények összhangban álltak CE és MALDI-TOF MS analízisekkel. Ez alól a Kis-Balaton (4T) minta volt a kivétel, ahol egy *mcy* gént (*mcyT*) sikerült kimutatni, de a mintában nem volt detektálható mikrocisztin. Ezen eredmények összhangban állnak más országokban megfigyelt virágzások eredményeivel.

Az észak-magyarországi Kocka-tó felszínén vörös színű virágzást figyeltünk meg, amelyet a *P. rubescens* okozta. Megfigyelésünk egyedinek számít ebben a régióban, hiszen ilyen virágzásról még országunkban nem számoltak be. A szélmentes környezet és a vízben mért alacsony foszfor- és magas nitrogén koncentrációk kedveztek a faj megjelenésének. A faj azonosítását klasszikus morfológiai és molekuláris markerekkel (16S RNS gén, *cpcBA*-IGS operon) hajtottuk végre. A Kocka tóból izolált *P. rubescens* BGSD-500 kóddal ellátott törzsként laboratóriumban tenyésztettük.

A Kocka-tóban megjelenő *P. rubescens* virágzás nagy mennyiségű MC-t tartalmazott. A MALDI-TOF és a CE mérések feltárták, hogy a fő MC forma a terepi mintánál és az izolált BGSD-500 törzsnél a demetilált MC-RR variáns. A molekula pontos szerkezetének meghatározását az 1D és 2D HSQC NMR spektrumok analízise tette lehetővé. A fő MC forma a NRM vizsgálat követően: [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR variáns volt.

A CE analízissel mért MC koncentrációkat összehasonlítottuk, a terepi mintában ötször nagyobb MC koncentrációt kaptunk, mint az izolált BGSD 500 törzsből. Ez a különbség annak köszönhető, hogy a természetes populációk különböző toxikus potenciállal rendelkező egyedek keveréke.

A BGSD-500 törzs *mcy* génklaszterének tanulmányozásakor két mutációt tártunk fel. A deléción a *mcyE* és *mcyD* spacer régió között, az inszerción a *mcyT* és *mcyD* spacer régió között helyezkedett el. Nem mondhatjuk biztosra, hogy ezen elemek befolyásolják a MC bioszintézisét, de nem hagyhatjuk figyelmen kívül az IS elem egyes génrészletekkel hasonlóságot mutató szekvenciák termékeinek funkcióit. A hasonló szekvenciák termékeinek funkciói kapcsolatba hozhatók metabolit termelés szabályozásával.

Összegezve, az utolsó évtizedekben számos esetben beszámoltak Magyarország különböző vizeitereiben megjelenő toxikus cianobakteriális virágzásokról. Eddig fő MC termelő fajok a *M. aeruginosa* és a *P. agardhi* tartották számon. A mi eredményünk bizonyítja elsőnek a *P. rubescens* magyarországi előfordulását és MC termelését. Ezzel az MC termelő fajok száma eggyel növekedett az országban.

1. Introduction and objectives

Since long decades the contamination of water-supplies of Earth has resulted the changing of water habitats, rearranging of organism communities, destruction of organisms and disappear of species. The environmental polluter activity of humans has significantly increased the nutrient composition of waters with regard to phosphorous and nitrogen forms especially. The increase of nutrient content can be connected to the development of city, agriculture and industry, and results the acceleration of eutrophication processes. In the course of eutrophication algae bloom is a frequent manifestation indicating the multiplication of photo-autotrophic plankton organisations (eukaryote algae and prokaryote cyanobacteria) in large numbers. The multitudinous occurrence of planktonic organisations has increased in the same way in freshwater and sea. Eukaryote algae dominate especially in sea, cyanobacteria can be found primarily in freshwater habitat.

A number of cyanobacteria are able to produce toxic peptides and alkaloids, which mean significant danger for freshwater ecosystems and users of drinking water supply of water catchment areas, and for recipients using them for irrigation, fishing and recreation purposes (Codd, 1995; Carmichael, 2001). In the most dangerous case, these toxins can cause the death of aquatic organisms or potentially can be harmful because after eating up, they are accumulated in the organism.

The connection between the greater spread of cyanobacteria and increase of nutrients is properly reinforced but other environmental changes take part in the spread and development of bloom. Global warming results the increase of temperature of water surface that can significantly support extreme expansion of algae bloom (Paerl and Huisman, 2009). It is necessary to lay down that blooms are complex cases and cannot be caused by only one factor but they are triggered by simultaneous occur of several environmental factors (Heisler and his experts., 2008).

Planktonic nitrogen-fixative *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* species, and non-nitrogen-fixative *Microcystis*, *Planktothrix* species, moreover nitrogen-fixative *Lyngbya* genus can be found in benthic environment are classed among frequent toxin-producer cyanobacteria. The most frequent fresh water cyanobacteria causing toxic algae bloom originate from members of *Microcystis* genus. At the same time microcystins those cyanobacterial toxins occurring frequently and causing the most problems, can be attached to these species partly.

Purpose of our research:

- Analysis of toxin-producer ability and toxin variability of the microcystin producer *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* appearing in large numbers in different Hungarian water areas
- Analysis the unusual shallow lake appearance of *Planktothrix rubescens*, a cyanobacteria, which can be found typically in alpine layered deep lakes.
- Characterization of toxin production of BGSD-500 strain isolated from blooming area sample and mcy gene-cluster of *Planktothrix rubescens*.

2. Materials and method

2.1. Sampling

We collected the samples from algae bloom of 15 Hungarian water areas. Waters of lakes are used for recreation activities, drinking-water and fish-pond from where the samples had been collected. We collected all of the samples from the water surface with the help of a 50 μm mesh plankton-toil. One part of water samples originating from algae bloom had been lyophilised, the other part had been stored on -20°C until they had been used for our further analysis.

2.2. Classification of planktonic organisms

We classified algae blooms species with inverse light microscope (LEICA DEMIL). We detected *M. aeruginosa* and *P. agardhii* species in blooms. Just only one case *P. rubescens* had been classified algae bloom causing species, not the above mentioned two species, from a sample originating from Kocka-lake located on the northeast of Hungary. We made the taxonomic, phylogenetic analysis with the help of 16S rRNS and phycocyanin operon (*cpcBA*-IGS) genes in the case of *P. rubescens*.

2.3. Cultivation of *Planktothrix rubescens*

We supplied *P. rubescens* isolated from Kocka-lake with BGSD-500 code signal. We held the cultivation of BGSD-500 on BG-11 growth-medium on 22°C and with continuous illumination (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The culture had been raised in sterile-filtered, air-bubbled 500 ml Erlenmeyer test-tubes. We measured chlorophyll-a content for tracking the development of cells. Raised cultures had been centrifugalized in tardive exponential stage and sediment of cell had been held on -20°C. A common experience was proved in the course of the analysis of toxic organisations that the specific cyanobacterium causing toxic algae blooms is isolated and tested its toxicity during laboratory cultivation.

2.4. Toxicity analysis of samples

Measuring the toxicity of samples we used mustard seedling test for detecting microcystin and toxicology test elaborated by Kós and his experts (Blue-Green Synapsis Test).

Preparation of samples comes before testing. Preparation of samples consists of two steps; the first is the exploration of cells with freezing-melting method, and the second is the centrifugalizing of samples. A lower and a higher stage are established during centrifugalizing, the latter contains the contents of damaged cells. We made the toxin test with supernatant phase. The analytical test plant was white mustard (*Sinapis alba* L.). Seeds sterilized with H_2O_2 were used in toxicity tests in sterile circumstances. We worked with modified seedling test in consideration of numerous samples, which had been executed on microtiter plate. The sterile germinated mustard seed was placed on the surface of growth-medium (0.5 x Allen) stabilized with the examined agar (1%) containing supernatant phase. We raised these plants till three or four days on 25°C. After incubation we measured the entire length, the size of hypocotyl and root structure of the plant (Vasas and his experiments, 2002). The scale of toxicity was described with IC_{50} (50 % inhibition of growth) parameter.

2.5. Purification and structure classification of microcystin

The first step of toxin purification was the centrifugalizing of plankton samples with Beckman Avanti TM-J-25 centrifuge with 5000 rpm. revolutions per minute, after the sediment of cells arising from this

procedure had been frozen on -20°C and melt (at three times) in order to explore the content of cells.

Larger molecular substances were removed from the lyophilised sample with methanol precipitation. After centrifugalizing Beckman Avanti TM-J-10, 25 min., and 8500 rpm) we poured off substances remaining in substance and we worked with supernatant layer in further. The collected supernatant was concentrated with rotary evaporator on 40°C (Büchi Rotavapor-R). After evaporation, substance formed on test-tube surface, was dissolved in 5 mM pH 7,5 Tris-HCl buffer, and the established solution was applied on diethyl-aminoetil (DEAE) exchange column, which was equilibrated with so called starter buffer, 5 mM pH 7,5 Tris-HCl buffer. The applied sample fixed in reversible way on the column, and contaminants that cannot link to the column, leaved in the course of washing with starter buffer. Desorption of fixed molecules could have been reached with changing the composition of eluent buffer. The concentration of NaCl solution used an eluent buffer was changed between 0-0,2 M. Effect of separated fractions was made by seedling test. Fractions indicating inhibition of growth effect were mixed, dissolved in methanol and applied on C-18 HPLC column, the absorbance of separated components was determined by Shimadzu LC-10AD spectrophotometer with 239 nm UV-VIS detectors. Toxicity of separate peaks was tracked by the above mentioned mustard seedling test.

After that we classified the structure of toxic forms with MALDI-TOF MS and NMR analysis, and determined the concentration of identified MC variations with capillary electrophoresis.

2.6. Detection of toxigenes

DNA required for toxigene analysis was extracted from ground and lyophilized samples. DNA purification was made by phenol-chloroform method. The DNA spectrum and concentration of extracted samples were determined by Shimadzu UV1601 spectrophotometer. Well-known concentrated DNA samples were dissolved in bi-distilled DNase free water and held on -20°C till utilisation. We applied different heat-programmes at the configuration of PCR reactions. For the analysis of the entire *mcY* gene-cluster of *P. rubescens* we used primer pairs covering 2 kb length sections. Those sections which were different from 2 kb and were extracted in the course of the analysis of the entire *mcY* gene-cluster of *P. rubescens* were analysed further with the help of 500 bp length PCR produced primer pairs (Christiansen and his experts 2006). After appraising the results, the sequencing of selected sections was completed by Biomi Kft (Gödöllő), and then we classified the sequences with BLAST analysis.

3. Results

3.1. Analysis of the toxicity and toxin variability of *Microcystis aeruginosa*

We collected samples from algae blooms occurring in different water areas of Hungary during five years period. *M. aeruginosa* was the dominant species in 10 times from the analysed 14 samples. Toxicity of isolated strains had been determined with the help of mustard seedling test. IC₅₀ value was determined in concentration causing 50 % inhibition of growth (entire length) measured after 72 hours. Seedling test didn't show toxicity in one case, Ónod samples, and IC₅₀ value couldn't have been determined. In spite of this, we detected very low MC concentration in the former sample with CE measures.

The IC₅₀ value of the most toxic sample was 245 µg mL⁻¹ collected from Bárdos-lake. Calculated IC₅₀ values correlate well with MC content measured by CE method. The highest MC concentration was measured from Bárdos-lake samples. DEAE cellulose column chromatography had been applied for detailed analysis of component causing floral inhibition of growth, after that we purified active inhibition of growth fractions with the help of HPLC on inverse phased (C-18) column with 1% methanol. Purified samples were analysed with MALDI-TOF analysis. Altogether 10 different MC variants were classified from 10 samples. The most frequent variant was MC-LR which could have been found in 70% of the samples. MC-LR 7, MC-RR 5, MC-YR 4, MC-WR 4, [Dha⁷] MC-RR 4, [Asp³] MC-LR were classified in 1 case. Three uncommon samples from MC variants have appeared: MC-LL, -LF, and [Dha⁷] MC-FR. In MC producing species were happened to show somewhere only one, but elsewhere five variants.

3.2. Analysis of the toxicity and toxin variability of *Planktothrix agardhii*

During the analysis of collected samples massive growth of *P. agardhii* could have been observed in four samples. Seedling test didn't show toxicity in three cases; therefore we couldn't have determined IC₅₀ value from these three samples: Hajdúhadház, Kis-Balaton (4T), and Gyula. In spite of that we detected very low MC concentration with CE measures from Hajdúhadház and Gyula samples.

The most toxic sample was collected from Bivalyos-lake (Gyula); its IC₅₀ value was 916 µg mL⁻¹. Altogether 3 different MC variants were classified from 4 samples: Asp³] MC-LR; [Dha⁷] MC-RR; [Asp³, Dha⁷] MC-

RR. The most frequent variant was [Asp³] MC-LR which could have been found in 75% of the samples.

3.3. Classification and analysis of microcystin from bloom samples

Toxicity of crude extracts of ground bloom collected from Kocka-lake was analysed with seedling test at the first time. IC₅₀ value was determined with seedling test in ground samples which was 0,97 mg mL⁻¹.

After methanolic purifying of ground sample, fractions separated by DEAE column were analysed with plant test. Thereafter fractions, which were toxic, were applied on HPLC column, and the absorbance of separated components was detected on 239 nm.

Construction of clean substance extracted during HPLC purifying, was analysed by MALDI-TOF MS and NMR structural analysis methods. We classified the major toxin is [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR form.

3.4. Classification and analysis of microcystin from BGSD-500 bloom samples

Toxicity of crude extracts of BGSD-500 strain isolated from Kocka-lake ground samples was analysed the same as ground sample. IC₅₀ value determined by seedling test was 2,47 mg mL⁻¹, indicating that BGSD-500 strain was lesser toxic than ground sample. After methanolic purifying of crude extracts, chemical structure of toxic fractions had been determined by MALDI-TOF MS and NMR methods. Similarly to ground samples, we classified the major toxin is [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR form. In the laboratory sample, MC content was 1,85 mg g⁻¹. This result clearly shows the decreasing MC production of BGSD-500 strain. DNS PCR analysis of BGSD-500 strain is resulting positive result about the existence of each eight *mcy* genes. This result cannot demonstrate toxin decrease. Because of the explanation of toxin decrease, further and more detailed genetic analysis of gene-cluster has been required.

3.5. Analysis of *mcy* gene-cluster of BGSD-500 strain

For the entire analysis of BGSD-500 strain DNA, we used 28 primer pairs giving 2 kb PCR product in pairs. After PCR analysis we didn't have positive sign in five cases. We longer analysed sections different from 2 kb with the help of primer pairs giving 500 bp lengths. With this analysis

we could narrow down those parts in the cluster, which can cause decreased microcystin production in BGSD-500 strain.

We found a smaller product than expected only in one case, a deletion, which was located in spacer region between *mcyE* and *mcyG*. Beside deletion, an insertional section also had been detected, which was located in spacer region between *mcyT* and *mcyD*. We determined the length of insertional region with sequencing and the result was 1606 nt. After that the insertional sequence had been analysed by BLAST method. The insertional sequence showed 98% sequence identity on quarter length with thioester (*mcyT*) participating in the synthesis of *P. rubescens* and *P. agardhii* microcystin. 1194 kb length section, impacted in *mcyT* gene and participating in the signal transmission of *Synechococcus* sp. (PCC 6312 strain, GenBank accession number: CP003558), was similar to histidine kinase and tRNS (Ile) - lysine synthetase.

4. Summary of results

During our research we had been collecting algae bloom samples appearing in Hungarian water areas through five years. Blooms were caused by two well-known cyanobacterium species *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii*. We detected the different toxicity of the samples with seedling test. Seedling test didn't show toxicity in four cases. The most toxic sample was collected from Bárdos-lake.

Root inhibition of growth components appeared in mustard test, had been purified with ion-exchange chromatography HPLC and classified with MALDI-TOF MS and NMR structural analysis methods.

We classified altogether 12 MC variants from 14 samples with the help of MALDI-TOF MS analysis. MC variants were detected in *M. aeruginosa* blooms in every case. The most frequent MC forms of *M. aeruginosa* blooms were MC-LR; MC-RR and MC-YR. *P. agardhii* blooms were less toxic than *M. aeruginosa*. The major MC form of *P. agardhii* blooms was [Asp³] MC-LR.

The concentration of microcystin had been measured with CE. MC content was between equivalent value of 0,010 and 15,701 mg/dry matter MC-LR equivalent. The highest MC concentration was measured from Bárdos-lake samples that are in accordance with seedling test results.

DNA, extracted from the samples of water blooms, had been tested by primer series designed for MC biosynthesis gene. During PCR reactions, all of the 14 samples are resulting positive result about the existence of at least one *mcy* gene, and showed the existence of genes in MC production. These results were in accordance with CE and MALDI-TOF MS analysis. Kis-Balaton (4T) samples were the exception where one *mcy* gene (*mcyT*)

could have been analysed, but in the samples there wasn't any microcystin, which could have been detected. These results were in accordance with the results of algae blooms of other countries.

We detected red coloured blooms causing *P. rubescens* on the surface of Northern Hungarian Kocka-lake. Our observation is unique in this region because any of this kind of blooms hasn't been detected in our country. Windless environment and low phosphorus and high nitrogen concentration of the water were favourable the appearance of this species. We made the classification of species with classic morphologic and molecular markers (16S rRNS gen and *cpcBA*-IGS operon). *P. rubescens*, isolated from Kocka-lake and supplied with BGSD-500 code signal, had been cultivated like *strive* in laboratory.

P. rubescens blooms appearing in Kocka-lake contained MC in large quantities. MALDI-TOF and CE measures revealed that the major MC form was demethylated MC-RR variant isolated from BGSD-500 strain and ground samples. Analysis of 1D and 2D HSQC NMR spectrums enabled the classification of exact structure of molecule. We classified the major MC form is [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR variant after NRM analysis.

MC concentrations measured by CE analysis were compared, and MC concentration was five times higher in ground samples than in isolated BGSD-500 strain. This difference is due to that natural population are the compound of individuals having different toxic potential.

We revealed two mutations during the research of *mcy* gene cluster of from BGSD-500 strain. Deletion was located between *mcyE* and *mcyD* spacer regions; our insertional region was located in spacer region between *mcyT* and *mcyD*. We are not sure that these elements influence the biosynthesis of MC, but we cannot leave functions of sequences indicating similarity to gene-parts of IS element out of consideration. Functions of products of similar sequences can be in connection to the control of metabolite production.

In summary, toxic cyanobacterial blooms in Hungarian different water areas were reported in many cases. *M. aeruginosat* and *P. agardhii* were the major producer species. *P. rubescens* Hungarian appearance and MC production had been proved by our research first. Herewith the number of MC producer species increased with another one in the country.

Felhasznált irodalom/ References

- Codd, G. A. (1995) Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci Technol* 32: 149–156.
- Carmichael, W. W. (2001) Health effects of toxin producing cyanobacteria: the ‘CyanoHABS’. *Hum Ecol Risk Assess* 7: 1393–1407.
- Christiansen, G., Kurmayer, R., Liu, Q., Börner, T. (2006) Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 117-123.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H. G., Sellner, K., Stockwell, D. A., Stoecker, D. K., Suddleson, M. (2008) Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*. 8: 3-13.
- Paerl, H. W., Huisman, J. (2009) Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*. 1 (1): 27-37.
- Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, Gy., Batta, Gy., Gyémánt, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., 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). *Analytical Biochemistry*. 302: 95-103.

Publikációs lista/ List of publications

1. Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények / List of publications related to dissertation

Farkas O, Gyemant Gy, Hajdu G, Gonda S, Parizsa P, Horgos T, Mosolygó Á, Vasas G(2014)Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary. ACTA BIOLOGICA HUNGARICA 65(2): 1-10.

IF2012: 0.504

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 (12): 2434-2455.

IF2013: 2.129

Farkas O, Mosolygó Á, Horgos T, Vasas G(2011)Toxintermelő *Planktothrix* cyanobaktérium fajok és *Prymnesium parvum* (Haptophyta) azonosítása molekuláris markerekkel. HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY 91(6): 39-42.

Vasas G, Bácsi I, Gonda S, Gyémánt Gy, **Farkas O**(2009)Magyarországi *Planktothrix rubescens* vízvirágzás vizsgálata és toxintermelésének jellemzése. HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY 89(6): 76-78.

2. Egyéb megjelent vagy közlésre elfogadott közlemény/ List of other publications

Szabó S, Roijackers R. M. M, Scheffer M, Braun M, Borics G, **Farkas O**(2007)A szubmerz növények békalencsére gyakorolt gátlóhatásai. HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY 87(6): 126-129.

Farkas O, Szabó S, Borics G(2007)Új módszer a békalencsék intraspecifikus kompetíciójának vizsgálatához. HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY 87(6): 34-36.



Jelölt: Farkas Oszkár
Neptun kód: HGA91V
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemény(ek) hazai folyóiratban (1)

1. **Farkas O.**, Mosolygó Á., Horgos T., Vasas G.: Toxintermelő Planktothrix cionobaktérium fajok és a *Prymnesium parvum* (Haptophyta) azonosítása molekuláris markerekkel.
Hidrol. Kozlony. 91 (6), 39-41, 2011. ISSN: 0018-1323.

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) hazai folyóiratban (1)

2. **Farkas, O.**, Gyémánt, G., Hajdú, G., Gonda, S., Parizsa, P., Horgos, T., Mosolygó, Á., Vasas, G.: Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary.
Acta Biol. Hung. 65 (2), 227-239, 2014. ISSN: 0236-5383.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/ABiol.65.2014.2.10>
IF: 0.589

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (1)

3. Vasas, G., **Farkas, O.**, Borics, G., Felföldi, T., Sramkó, G., Batta, G., Bácej, I., Gonda, S.: Appearance of *Planktothrix rubescens* Bloom with [D-Asp³, Mha⁷]MC-RR in Gravel Pit Pond of a Shallow Lake-Dominated Area.
Toxins. 5 (12), 2434-2455, 2013. EISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins5122434>
IF: 2.48





Magyar nyelvű konferencia közlemény(ek) (1)

4. Vasas G., Bácsi I., Gonda S., Gyémánt G., **Farkas O.**: Magyarországi Planktothrix rubescens vízvirágzás vizsgálata és toxintermelésének jellemzése.
Hidrol. Közlöny. 89 (6), 70-78, 2009. ISSN: 0018-1323.

További közlemények

Magyar nyelvű konferencia közlemény(ek) (2)

5. Szabó S., Scheffer M., Roijackers R., Braun M., Borics G., **Farkas O.**: A szubmerz növények békálcenszékre gyakorolt gátló hatásai.
Hidrol. Közlöny. 87 (6), 126-129, 2007. ISSN: 0018-1323.
6. **Farkas O.**, Szabó S., Borics G.: Új módszer a békálcensék intraspecifikus kompetíciójának vizsgálatához.
Hidrol. Közlöny. 87 (6), 34-36, 2007. ISSN: 0018-1323.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,069

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,069

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.05.04.





Candidate: Oszkár Farkas
Neptun ID: HGA91V
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

List of publications related to the dissertation

Hungarian scientific article(s) in Hungarian journal(s) (1)

1. **Farkas O.**, Mosolygó Á., Horgos T., Vasas G.: Toxintermelő Planctothrix cionobaktérium fajok és a Pymnesium parvum (Haptophyta) azonosítása molekuláris markerekkel.
Hidrol. Kozlony. 91 (6), 39-41, 2011. ISSN: 0018-1323.

Foreign language scientific article(s) in Hungarian journal(s) (1)

2. **Farkas, O.**, Gyémánt, G., Hajdú, G., Gonda, S., Parizsa, P., Horgos, T., Mosolygó, Á., Vasas, G.: Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in Microcystis and Planctothrix waterblooms in shallow lakes of Hungary.
Acta Biol. Hung. 65 (2), 227-239, 2014. ISSN: 0236-5383.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/ABiol.65.2014.2.10>
IF: 0.589

Foreign language scientific article(s) in international journal(s) (1)

3. Vasas, G., **Farkas, O.**, Borics, G., Felföldi, T., Sramkó, G., Batta, G., Báncsi, J., Gonda, S.: Appearance of Planctothrix rubescens Bloom with [D-Asp³, Mha⁷]MC-RR in Gravel Pit Pond of a Shallow Lake-Dominated Area.
Toxins. 5 (12), 2434-2455, 2013. EISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins5122434>
IF: 2.48





Hungarian conference proceeding(s) (1)

4. Vasas G., Bácsi I., Gonda S., Gyémánt G., **Farkas O.**: Magyarországi Planktothrix rubescens vízvirágzás vizsgálata és toxintermelésének jellemzése.
Hidrol. Kozlöny. 89 (6), 70-78, 2009. ISSN: 0018-1323.

List of other publications

Hungarian conference proceeding(s) (2)

5. Szabó S., Scheffer M., Roijackers R., Braun M., Borics G., **Farkas O.**: A szubmerz növények békalencsére gyakorolt gátló hatásai.
Hidrol. Kozlöny. 87 (6), 126-129, 2007. ISSN: 0018-1323.
6. **Farkas O.**, Szabó S., Borics G.: Új módszer a békalencsék intraspecifikus kompetíciójának vizsgálatához.
Hidrol. Kozlöny. 87 (6), 34-36, 2007. ISSN: 0018-1323.

Total IF of journals (all publications): 3,069

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 3,069

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóster have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

04 May, 2016

