

Magyarország víztereiben megjelenő algavirágzások domináns cianobaktérium fajainak toxintermelés és toxinvariabilitás vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Farkas Oszkár

Témavezető: Dr. Vasas Gábor

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2016.

Nyilatkozatok

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia Programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2016.05.05.

..... Farkas Oszkár

Tanusítom, hogy **Farkas Oszkár** doktorjelölt 2008-2016 között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2016.05.05.

.....

Dr. Vasas Gábor

Magyarország víztereiben megjelenő algavirágzások domináns cianobaktérium fajainak toxintermelés és toxinvariabilitás vizsgálata

Értekezés a doktori (Ph.D)fokozat megszerzése érdekében a biológia tudományágban Írta: Farkas Oszkár okleves biológia szakos tanár Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola (biológus doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Vasas Gábor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Grigorszky István	
tagok:	Dr. Máthé Csaba	
	Dr. Borics Gábor	

A doktori szigorlat időpontja: 2014. december 29.

Az értekezés bírálói:

Dr	
Dr	
Dr	

A	bíráló	bizottság:
---	--------	------------

elnök:	Dr	
tagok:	Dr	
	Dr	
	Dr	
	Dr	

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A vízvirágzások	3
2.2. A cianobaktériumok	5
2.3. A Microcystisekről	7
2.4. A Planktothrixekről	12
2.5. A cianobakteriális toxinok	
Neurotoxinok	16
Citotoxinok	18
Dermatotoxinok	20
Az irritáló hatású toxinok	20
Hepatotoxinok	21
A mikrocisztin(MC)	23
3. Anyag és módszer	
3.1. Mintagyűjtés	
3.2. A vízvirágzást okozó planktonikus szervezetek azonosítása	
3.3. A Planktothrix rubescens tenyésztése	
3.4. A Kocka-tó fizikai és kémiai paramétereinek meghatározása	
3.5. Minták toxicitásának vizsgálata	
3.6. Mikrocisztin tisztítás	
3.7. Mikrocisztin formák azonosítása	
MALDI-TOF MS analízis	
NMR analízis	40
Kapilláris elektroforézis (CE)	41
3.8. Toxingének detektálása	41
DNS izolálás	41
PCR analízis	
4. Eredmények	
4.1. A Microcystis aeruginosa toxicitásának és toxinvariabilitásának vizsgálata	44
4.2. A Planktothrix agardhii toxicitásának és toxin variabilitásának vizsgálata	
4.3. A Planktothrix rubescens vízvirágzásának vizsgálata	
A Kocka-tó fizikokémia jellemzői	

A Planktothrix rubescens morfológiai azonosítása49
A Planktothrix rubescens molekuláris filogenetikai analízise
A mikrocisztin azonosítása és analízise terepi virágzási mintákból
A BGSD-500 törzs mcy génklaszterének analízise54
5. Eredmények megbeszélése
6. Összegfoglalás
7. Summary
8. Köszönetnyilvánítás
9. Irodalomjegyzék
10. Függelék
1. függelék A PCR reakciók hőprogramjainak paraméterei
 függelék <i>Planktothrix rubescens</i> teljes mcy génklasztrét lefedő primerpárok (Kurmayer és mtsai., 2005)
 függelék <i>Planktothrix rubescens</i> mcy génklasztrében talált deléciók és inszerciók a vizsgálatához használt primerpárok
4. függelék Különböző országokban megjelenő <i>M. aeruginosa</i> MC koncentrációi és formái
5. függelék Különböző országokban megjelenő P. agardhii és P. rubescens MC formái96
11. Publikációs lista

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
ADDA	3-Amino-9-methoxy-2,6,8-	3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-
	trimethyl-10-phenyldeca-4,6-	10-fenildeka-4,6-diénsav
	dienoic acid	
BMMA	β -N-methylamino-L-alanine	β-metilamino-alanin
С	carbon	szén
CE	capillary electrophoresis	kapilláris elektroforézis
C. raciborskii		Cylindrospermopsis raciborskii
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid	2,5-dihydroxybenzoesav
Dhb	Dehydrobutyrine	dehidrobutirin
D-Measp	D-erythro-β-methylaspartic acid	D-eritro-β-metil-aszparginsav
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
HPLC	high pressure liquid	nagynyomású
	chromatography	folyadékkromatográfia
IC ₅₀	inhibitory concentration, 50%	a növények növekedésének 50%-
		os gátlását előidéző
		toxinkoncentráció
IS	insertion sequence	inszerciós elem
kb	kilobase	kilobázis
LD ₅₀	lethal dose, 50%	50%-os letális dózis, az a
		toxinkoncentráció, amely a
		kísérleti állatok legalább 50%-
		ának az elhullását okozza
M. aeruginosa		Microcystis aeruginosa
MC-LR	microcystin-LR	mikrocisztin-LR
mcyA	microcystin A gene	mikrocisztin A gén
MCS	microcystin synthetase complex	mikrocisztin szintetáz enzim
		komplex
Mdha	N-methyl-dehydroalanine	N-metil-dehidroalanin

Mdhb	N-methyl-dehydrobutirine	N-metildehidrobutirin
MEKC	micellar electrokinetic	micelláris elektrokinetikus
	chromatography	kromatográfia
MALDI	matrix-assisted laser	mátrix-segítette lézer
	desorption/ionization	deszorpció/ionizáció
TOF	time-of-flight	repülési idő
MS	mass spectrometry	tömegspektrometria
Ν	nitrogen	nitrogén
NMR	nuclear magnetic resonance	mágneses magrezonancia
NOD-R	nodularin-R	nodularin-R
NRPS	nonribosomal peptide	nem-riboszómális peptid szintetáz
	synthetases	
nt	nucleotide	nukleotid
OATP	organic anion transporter	organikus anion transzporter
	polypeptide	polipetid
P. agardhii		Planktothrixagardhii
P. rubescens		Planktothrix rubescens
Р	phosporus	foszfor
PCR	polimerase chain reaction	polimeráz láncreakció
TE	Tris-EDTA	Tris-EDTA
PKS	polyketide synthase	poliketid szintetáz
РР	protein phasphatase	protein foszfatáz
SDS	sodium dodecyl sulfate	nátrium-dodecil-szulfát

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 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. A 20. század végére a virágzásokkal összekapcsolható közegészségügyi, természetvédelmi problémák és gazdasági veszteségek jelentős mértékűvé váltak (Chorus és Bartram, 1999; Heislerés mtsai., 2008; Paerl, 2008; Paerl és Huisman, 2009).

A cianobaktériumok figyelemre méltó ökofizológiai alkalmazkodóképességgel rendelkeznek, így képesek dominálni oligotróf óceánoktól eutróf tavakig, a trópusoktól a sarki régiókig (Pinckney és Paerl, 1998; Potts és Whitton, 2000; Stomp és mtsai., 2007). Az eutróf tavakban, víztározókban, lagúnákban és sós vizekben tömegesen megjelenő cianobaktériumok elnyomják a vízi makrofiták növekedését, ezáltal negatívan hatnak számos gerinctelen és halfaj vízi élőhelyére (Scheffer, 1998). A vízterekben a cianobaktériumok robbanásszerű elszaporodása oxigénhiányt okozhat, amely a halak pusztulásához vezethet. Továbbá, határozott szagproblémát okoz a geosmin és más dohos kemikáliák termelődése (Uwins és mtsai., 2007).

Végül, számos cianobaktérium képes termelni toxikus peptideket 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 elfogyasztásuk után felhalmozódnak a szervezetben. A cianobaktériumok nagy veszélyt jelentenek, a Föld legnagyobb ivóvízkészletével rendelkező víztömegek ökológiai állapotára és fenntarthatóságára. Ennek a veszélynek van kitéve például az afrikai kontinens legnagyobb tava, a Viktória-tó (Verschuren és mtsai., 2002); az Észak-Európában található Balti-tenger (Kanoshina és mtsai., 2003), a kínai Taihu-tó (Guo, 2007), a Japánban fellelhető Biwa-tó (Maeda és mtsai., 1992) és még számtalan más ökológiailag és gazdaságilag fontos tó, folyó, és torkolat (Huisman és mtsai., 2005; Paerl és Fulton, 2006).

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 nitrogénfixáló *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 mikrocisztinek is részben ezekhez a fajokhoz köthetőek.

A munkánk célja:

- Magyarország különböző víztereiben 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 toxintermelő képességének vizsgálata.
- A *Planktothrix rubescens* virágzás terepi mintájából izolált BGSD-500 törzs toxintermelésének és mcy génklaszterének jellemzése.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A vízvirágzások

A vízvirágzás kifejezés alatt részben a planktonszervezetek tömeges elszaporodását értjük a felszíni vizekben, mely a víz intenzív elszíneződéséhez (zöld, kékeszöld, sárgászöld, sárga, vörös, barna) és zavarosodásához vezet.

A vízvirágzás (waterbloom) a tudományos irodalomban napjainkban kevésbé használatos, sokkal inkább elterjedtebb az algavirágzás (algal bloom) megnevezés. Az algavirágzások témakörbe a cianobaktériumok által okozott virágzásokat is beleérti a tudományos szakirodalom. Az ártalmas vagy mérgező algavirágzások (Harmful Algal Bloom, HAB) kifejezés alatt tehát a cianobakteriális virágzásokat is érti a szakirodalom, néhány esetben cianobakteriális mérgező algavirágzásként (Cyanobacterial Harmful Algal Bloom, CyanoHAB) különbözteti meg (Paerl és Ustach, 1982). A dolgozatunkban az algavirágzás kifejezés alatt értjük a cianobakteriális (alga)virágzásokat is, de ahol tehetjük, főként az édesvizekben előforduló jelenségek esetében, a jelenség előidézőjének tárgyalása során a cianobaktérium elnevezést használjuk, vagy a szóban forgó eukarióta algára hivatkozunk.

Súlyos algavirágzásokról egyre sűrűbben számolnak be a világ számos országából. A cianobaktériumok cianotoxinokat juttatnak a vízbe a virágzás alatt, vagy közvetlenül utána, amelyek károsan hatnak az emberi egészségre és a vizek ökológiai állapotára.

Számos olaszországi tóban gyakori problémát jelent az egyre nagyobb számban megjelenő toxikus cianobakteriális virágzás. A Közép-Olaszországban, Róma közelében elhelyezkedő vulkanikus eredetű kráter tavak egyikében az Albano-tóban hat különböző mikrocisztin variánst mutattak ki. A vizsgáltok kiterjedtek az Albano-tó területén elhelyezkedő 13 kútra is, és megerősítették, hogy ezek a toxinok képesek a talajvízen keresztül eljutni az ivóvízforrásokig (Messineo és mtsai., 2006).

A toxikus cianobaktériumok a tavak és a víztározók által nyújtott szórakozási tevékenységeket igénybevevő emberek számát nagyban csökkentik, és a vízi élőhelyek degradációját idézik elő. Ilyen eset fordult elő Közép-Spanyolország legnagyobb víztározójánál, az El Altazarnál. Ezt a víztározót az emberek ivóvízforrásként, valamint üdülési és szórakozási célból használják. A víztározóban 2003 tavaszán *Planktothrix rubescens* tömeges megjelenését figyelték meg. A vizsgálatok a legtöbb mintában több mikrocisztin variánst mutattak ki. Az emberek a szabad vizekben való fürdőzésük és a csapvíz fogyasztásával vannak kitéve a toxinok káros hatásainak: súlyos gyomor-bélhurutos

megbetegedést idézhetnek elő. Súlyosabb, emberi áldozatot követelő esetről is beszámoltak, ilyen szomorú eset fordult elő Brazíliában, ahol a cianotoxint tartalmazó vizet használták a dialízis elvégzésére (Azevedo, 2002).

Az algavirágzások nem kímélték Európa nagy szubalpin tavait, mint például: Bourget tó, Genfi tó, Garda tó, Zürichi tó, Bodensee tó. Az előbb felsorolt tavak fontos ivóvízforrásként, valamint fő turisztikai látványosságként szolgálnak országuknak. A 20. század második felében az eutrofizáció egyik káros következménye az, hogy a tavakban egyre nagyobb mértékben terjedtek el a mikroalgák és/vagy baktériumok, beleértve a toxikus cianobaktériumokat. A toxinok jelenlétével hozható összefüggésbe számos állati, például hal, ló, tehén, sertés, bárány és kutya pusztulás (Rodger és mtsai., 1994; Carmichael, 1992). Hasonlóan a szubalpin tavakhoz, az ugandai édesvizekben és az oroszországi Néró-tóban a toxikus cianobaktériumok megjelenése a vizek tápanyagmennyiségének növekedéséhez köthető (Babanazarova és mtsai., 2011).

Hazánkban megjelenő tömeges cianobaktérium elszaporodásról 1934-ben számoltak be elsőként. Sebestyén Olga a tihanyi Biológiai Kutatóintézet előtti Kis-öbölben 1934. augusztus 11-én zöldessárga Microcystis aeruginosa és Microcystis flos-aquae tömeges megjelenését figyelte meg (Entz és Sebestyén, 1942). A második közlés 1960. július 30-ról való, amiben leírják, hogy világoszöld, sávos elszíneződést észleltek Balatonbogláron a part közvetlen közelében egy védett beöblösödés felszínén, melyet az Anabaena flos-aquae idézett elő. A következő beszámolót Hortobágyi közölte 1960. augusztus 23-án, a balatonboglári part menti részeken kisebb-nagyobb M. flos-aquae csomók úsztak a vízben. A M. flos-aquae további szórt előfordulásáról tettek jelentést 1960. augusztus 19-én és 1961. szeptember 17-19. között (Hortobágyi, 1962). Az első magyarországi fokozott mértékű és hosszan tartó cianabaktérium megjelenésre 1966. szeptember 2-án figyeltek fel. A jelenség a Keszthelyiöbölben mutatkozott 6 km széles és 11 km hosszú területen, a Zala torkolatához közel, melyet egyetlen cianobaktérium faj okozott, az Aphanizomenon flos-aquae. A hetvenes években ez a faj fordult elő a Balatonban nagy mennyiségben. A Cylindrospermopsis raciborskii is megjelent a Balatonban a nyári hónapokban, de nem rendszeresen (Padisák, 1995). A Velencei-tavon elsősorban a M. aeruginosa okozott jelentős algavirágzást (Kós és mtsai., 1995). A hazai cianobakteriális tömegprodukciók kutatása kapcsán feltétlenül említést kell tennünk Kiss István munkásságáról, aki többek között a Szeged környéki szikesek algáival foglalkozott (Kiss, 1985).

2.2. A cianobaktériumok

A mai cianobaktériumok ősei több mint 3,4 milliárd évvel ezelőtt nagy mennyiségben voltak jelen a Földön. Evolúciós jelentőségüket az adja, hogy fotoszintézisük révén nagy mennyiségű oxigént juttattak a légkörbe és így lehetővé tették az élet magasabb szervezettségű formáinak a kialakulását.

A legújabb rendszertani osztályozás az élőlényeket három doménbe sorolja. A prokarióták csoportjában két nagy domén található: az archeabacteria ("ősbaktériumok") és azeubacteria ("valódi baktériumok"). Az élővilág harmadik nagy doménjét az eukarióták alkotják. A filogenetikai vizsgálatok alapján a cianobaktériumok a prokarióta baktériumokhoz sorolhatóak (Skulberg és mtsai., 1993), mivel az eukariótákkal szemben valódi sejtmaggal nem rendelkeznek. Közel 250 genusz és körülbelül 2000 faj tartozik ebbe az osztályba. A cianobaktériumok Gramm-negatívak, széleskörű toxintermelő képességgel (Codd, 1994). Megtalálhatóak az élőhelyek széles spektrumában, a jégmezőktől a meleg forrásokon át a sivatagokig. A cianobaktériumok a prokarióták csoportjai közül morfológiailag, fizológiailag és anyagcseréjük szerint az egyik legsokrétűbb csoportot alkotják (Codd, 1994). Alakjuk alapján elkülöníthetünk egysejtű, fonalas és kolóniát alkotó formákat. Az egyes sejtek átmérője 3-10 µm között változhat. A sejtjek lehetnek ovális vagy gömb alakúak, amelyek rendszerint egyesével fordulnak elő. A kolóniákat ezernél is több sejt alkotja, és ezeket nyálkaréteg veszi körül (Van den Hoek és mtsai., 1995). A kocsonyás vagy nyálkás tokkal körülhatárolt sejtfalakat peptidoglikán és lipopoliszacharid rétegek építik fel. (Ressom és mtsai., 1994). A kocsonyás tok jelenléte lehetővé teszi, hogy túléljék a szárazságot és más extrém környezeti tényezőket (Van den Hoek és mtsai., 1995). A fehérjeszintetizáló apparátus felépítésében 70S riboszómák vesznek részt (Fay, 1965; Bryant, 1994). A citoplazmájuk két részből, a külső, színes citoplazmából (kromatoplazmából) és a belső, színtelen, rekeszes centroplazmából áll. Közöttük a határ nem éles, nem választódnak el kettős határhártyával.

A cianobaktériumok fotoszintetizáló szervezetek, a fotoszintetikus pigmentek tilakoid membránrendszerbe szerveződtek, ezek a protoplazma külső részén a kromatoplazmában találhatóak meg. A színüket a klorofill-a, a karotinoidok és járulékos pigmentek, mint a fikocianin, allofikocianin és a fikoeritrin (fikobiliproteinek) alakítják ki. A fotoszintetikus apparátusukban az oxigéntermelő szervezetekre jellemző mindkét reakciócentrum (PS I és PS II) megtalálható. A színanyagok a sejtekben nagyon változatos arányban lehetnek jelen, így azok színe is sokféle: olívazöld, szürkészöld, sárgásbarna, lila és piros (Ressom és mtsai., 1994). A sejtek színe a megvilágítási viszonyok szerint módosul, így képesek alkalmazkodni környezetük fényviszonyaihoz, ezt a jelenséget nevezzük kromatikus adaptációnak (Bryant, 1994).

Sok fajnál megfigyelhetőek a gáz vezikulumok, amelyek lehetővé teszik a vízben való vertikális mozgást és a fényviszonyokhoz való alkalmazkodást.

A cianobaktériumokban a különböző tápanyagok és anyagcseretermékek zárványok formájában jelennek meg a sejtekben. Megfigyelhetünk glikogén szemcséket, lipidcseppeket, cianoficin granulumokat és karbixószómákat. Tartalék tápanyagokként jelenlévő glikogén szemcsék nincsenek membránba zárva, szabadon vannak a citoplazmában. A cianoficin szemcsék csak a cianobaktériumokban találhatók meg, nitrogén- és energiaraktárként működnek. A karboxiszómák a CO₂ felvételében játszanak szerepet és tartalmazzák a CO₂fixáció (Kalvin-ciklus) kulcsenzimét, a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenázt (RUBISCO) (Fay és Van Baalen, 1987).

Vannak fajok, amelyek képesek megkötni a légköri nitrogént, így a nitrogénhiány növekedésüket nem korlátozza. Ez a képesség általánosan előfordul a fonalas, heterocisztát képző fajokban. A nitrogénfixáció egy speciális sejtben, a heterocisztában zajlik, itt található a nitrogénfixációért felelős nitrogenáz enzimkomplex. Mivel az oxigén az enzim irreverzibilis inaktivációját okozza, a nitrogénkötést és a fotoszintézist szét kell választani egymástól. A nitrogénkötő sejtek (heterociszták) speciális nyálkaburokkal rendelkeznek, ami a szabályos sejtláncolatot megszakítja, és így az oxigén diffúzióját megakadályozza. A nitrogénfixálás képessége általánosan előfordul a fonalas, heterocisztát képző nemzetségekben (*Anabaena, Nostoc*).

A heterocisztás *Nostocales* rend képviselőinek másik jellemző tulajdonsága az akinéta képzés. Az akinéta spóraanalóg, kiszáradás-rezisztens képlet, gazdag glikogén-készlettel és nitrogénraktárral. Az akinéta lehetővé teszi a faj légkörben való elterjedését is.

Az Oscillatoriales rendbe tartozó egyes fonalas fajok a fonalak végén ún. hormogóniumot fejlesztenek, mely vékony nyálkaburokkal körülvett szaporító képlet, fiziológiai egységeket képező sejteket tartalmaz. A hormogóniumok jól elhatárolható reproduktív részei a fonalnak, melyek szabadulásuk után aktív sikló mozgásra képesek, a szülői fonalról leválva a szétterjedést szolgálják (Whitton, 1992). A fenti képletek (heterociszta, akinéta, hormogónium) а multicelluláris, fonalas morfológiájú cianobaktériumok sajátjai. A fonalat alkotó sejtláncolatot trichomának nevezik. Mind a heterociszta, mind pedig az akinéta és a hormogónium a vegetatív sejtek differenciálódásával jön létre (Chorus és Bartam, 1999). Az unicelluláris formák sejtjei gömb, henger vagy ovális alakúak (pl. Croococcales rend). A sejtek rendezetlen kolóniákba aggregálódhatnak,

amelyekben a sejtfalat borító poliszacharid nyálkaburok tartja össze őket. Tok vagy hüvely szekretálásával rendezettebb telepek alakulhatnak ki. A *Pleurocapsales* rend bizonyos fajainál pszeudoparenchimatikus telepfelépítés figyelhető meg (Chorus és Bartam, 1999).

A cianobaktériumok szaporodása aszexuális. Az unicelluláris sejtek izopolárisak vagy heteropolárisak lehetnek (utóbbi esetben a sejtek megnyúltak, az utódsejtek az anyasejt meghatározott részéről válnak le - pl. az ún. exospórák a *Chamaesiphonales* rend esetében). Egyes csoportoknál megfigyelhető az anyasejt sok apró leánysejtté való feldarabolódása egymást követő kettéosztódásokkal (baeociták vagy endospórák).

A fonalas formák reprodukciója történhet a trichoma fragmentációjával vagy az előbbiekben tárgyalt hormogóniumok segítségével. A trichomás szerveződésűek kitartó szaporítóképletei az akinéták (Bryant, 1994).

Az előzőekben számos olyan cianobaktérium tulajdonságot mutattunk be, amelyek alkalmassá teszik őket, hogy bizonyos körülmények között a többi szervezettel szemben domináns helyzetbe kerüljenek, így azokat háttérbe szorítva elszaporodjanak, és toxikus virágzásokat hozzanak létre. A cianobaktériumok szimbiotikus kapcsolatokat is alkothatnak más élőlényekkel. Szimbiotikus viszonyban állnak például gombákkal, mohákkal, harasztokkal, nyitvatermőkkel és zárvatermőkkel egyaránt.

2.3. A Microcystisekről

Toxikus cianobakteriális vízvirágzások gyakran előfordulnak az eutrofizált ökoszisztémákban a meleg hónapok alatt, és jelentős globális közegészségügyi és környezeti problémát okoznak. Az eutróf tavak toxikus vízvirágzásainak túlnyomórészét a *Microcystis* fajok által okozott virágzások adják, amelyekben a leggyakoribb *Microcystis* faj a *Microcystis aeruginosa*. A *M. aeruginosa* a *Cyanophycea* osztályon belül a *Chroococcales* rend, *Microcystoideae* család, *Microcystis* genusz tagja. A *M.aeruginosa* egysejtű planktonikus cianobaktérium. A sejtek átmérője néhány µm nagyságú és az alakjuk gömbölyű vagy tojásdad lehet. A sejtek rendszerint kolóniákba rendeződnek, amit a sejtfaluk által termelt nyálkás kocsonyaburok tart össze. A nagyméretű kolóniákat szabad szemmel is láthatjuk. Számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, ami más fajokkal szemben kompetitív előnyt jelent: gáz vezikulumok, kromatikus adaptációs képesség, granulumok.

A mérsékelt régiókban a *Microcystis* fajok erőteljes szaporodása tavasszal kezdődik, amikor a vízfelszín hőmérséklete eléri a 15 °C-ot (Reynolds és mtsai., 1981). A *Microcystis* populáció exponenciálisan növekszik a nyár elejétől kezdve, és nyár végén eléri a stacioner fázist. Nyár végén szélcsendes időszakban, a vízfelszínen úszó *Microcystis* kolóniák gyakran uralják a fitoplankton közösségket. A *Microcystis* kolóniák kiülepedése általában július közepétől kezdődik (Fallon és Brock, 1981). A különböző tanulmányok azt mutatják, hogy a süllyedés nyári időszakban általában alacsony (Reynolds és mtsai., 1981). A szedimentáció gyakran az őszi időszakban növekszik, ettől kezdve az aljzaton megfigyelhető kolóniák száma egyre nagyobb, míg a vízoszlopban számuk csökken (Reynolds és mtsai., 1981). A legtöbb *Microcystis* kolónia ősszel lesüllyed az üledékbe és a tó alján telel (Reynolds és mtsai., 1981). Az áttelelőképességre irányuló vizsgálatok azt mutatják, hogy a *Microcystis* kolóniák fotoszintetikusan aktívak maradnak (Takamura és mtsai., 1984). Teljesen még nem ismert, hogy a sötét és gyakran anoxikus körülmények között hogyan képesek életben maradni. A legtöbb esetben ez a nagy áttelelő kolóniaszám lesz az oltóanyaga a következő év tavaszától meginduló *Microcystis* virágzásnak (Preston és mtsai., 1980). A sejtek lecsökkenő sűrűsége, a turbulencia, a megváltozott környezeti viszonyok mind elősegítik a sejtek vízoszlopba, valamint a felszínre történő migrációját.

Tápanyag és hőmérséklet hatása a toxikus és nem toxikus *Microcystis* fajok növekedésére

A vizsgálatok alapján a nem toxikus és toxikus *Microcystis* fajok dinamikájának változásánál figyelembe kell venni a rendszer specifikus fizikai és környezeti kondícióit. A vizsgált édesvizekben a *Microcystis*ek által termelt toxinok molekuláris meghatározása (*mcyD* gén meglétével) során jobban megbecsülték a mikrocisztin koncentrációkat, mint a teljes cianobaktérium számot a klorofill-*a* mennyiség vagy más faktorok. Általánosan elfogadott, hogy az év legmelegebb periódusaiban a mérsékelt öv édesvizeiben a cianobaktériumok dominanciája figyelhető meg, különösen a *Microcystis*eké a fitoplankton közösségben (Paerl és Huisman, 2009).

Laboratóriumban elvégzett kísérletek 83%-ában kimutatták, hogy a körülbelül 4 °C-os emelkedés a kísérleti hőmérsékletekben a toxikus *Microcystis* sejtek (*mcyD* gént tartalmazó) növekedési rátájának szignifikáns növekedéséhez vezet (22-115%). Ezzel szemben a nem toxikus *Microcystis* sejtek növekedési rátájának jelentős emelkedését magasabb hőmérsékleten csak a kísérletek egyharmadánál mutatták ki. A megemelkedett hőmérséklet több toxikus *Microcystis* sejtet és/vagy több *mcyD* másolatot eredményez, amelyek együttesen potenciálisan toxikusabb vízvirágzáshoz vezetnek a vízi ökoszisztémákban (Tillet és mtsai., 2000). Elmondható az eredmények alapján, hogy a jövőben a mérsékelt övi vízi rendszerek felmelegedése hosszabb ideig tartó toxikus *Microcystis* dominanciát vált ki.

A virágzások alatt a nitrogén képes elősegíteni a *Microcystis* növekedését és toxin termelését. A hőmérséklet emelkedésével egyidejűleg megnövelt tápanyag (N és P) koncentrációk szintén a toxikus *Microcystis* sejtek növekedésének kedveztek.

Összegezve, a legtöbb kísérletben az egyidejűleg végrehajtott hőmérséklet emelkedés és P koncentráció növelés a toxikus *Microcystis* sejtek legnagyobb növekedési rátáját eredményezte. Ennek következtében a jövőbeli eutrofizáció és globális felmelegedés, jobban elősegíti a toxikus *Microcystis* sejtek növekedését, mint a nem toxikus sejtekét, és így a megjelenő virágzások magasabb mikrocisztin tartalommal fognak előfordulni.

Mikrocisztin termelő és nem termelő *Microcystis* fajok eloszlása az európai édesvízi tavakban

Kilenc európai országban *Microcystis* kolónikat analizáltak a következő módszerek segítségével: morofológiai jellemzők vizsgálata, PCR alkalmazása a *mcy*A és *mcy*B gének kimutatására, valamint MALDI-TOF tömekspektroszkópiás mérések a mikrocisztin koncentrációk meghatározására. A vizsgálatok során összesen hét morfospeciest azonosítottak: *M.aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. panniformis*, *M. viridis és M. wesenbergii*. Ezek a morfospeciesek különböztek a kolóniák alakjában, sejtek elrendeződésében és átmérőjében.

A mintákban leggyakrabban előforduló morfospeceisek: a *M. aeruginosa* és a *M. ichthyoblabe*. Kisebb gyakorissággal előforduló morfospeciesek: *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. panniformis*, *M. viridis* és *M. wesenbergii*. Finnországból származó minta kivételével az összes többi *Microcystis* populációját a *M. aeruginosa* és *M. ichthyoblabe* fajok keveréke adta. Finnországban található Tuusulanjä-tóban főleg a *M. viridis* fajt figyelték meg. Portugáliában és Szicíliában *M. panniformis*t azonosították egyedüli *Microcystis* fajként az édesvizekben, és ez megegyezik azzal a leírással, amelyben a *M. panniformis*t trópusi fajként tartják számon, mely Európa déli részein fordul elő (Komerák és Komárkova, 2002).

A *Microcystis* kolóniákban a mikrocisztin termelő genotípusok meghatározására több génpróba kombinációját alkalmazzák, amely így megbízható eredményt nyújt. Tehát fontos, hogy a kontroll és *mcy* gének primerei azonos amplifikációs hatékonyságot mutassanak (Kurmayer és Kutzenberger, 2003). Közeli kapcsolatot állapítottak meg a *mcy* gének PCR eredményei és a tömegspektroszkópiás módszerrel detektált mikrocisztinek között.

M. wesenbergii kivételével az összes többi morfospeciesben megtalálhatóak voltak a *mcy* gének. A *M. aeruginosa* (72%) és a *M. botrys* (90%) kolóniákban fordultak elő legnagyobb mennyiségben a *mcy* gének és a mikrocisztin formák. A *M. flos-aquae* (50%) és a

M. panniformis (53%) kolóniáknak csak a felénél tudták kimutatni a mikrocisztin termelést. Ezzel ellentétben a *M. ichthyoblabe* és *M. viridis* kolóniákban eléggé kis mértékben voltak jelen a mikrocisztin termelő genotípusok (20% és 17%). Az eredmények jól tükrözik, hogy Európában néhány *Microcystis* morfospeciesnél (*M. aeruginosa*, *M. botrys*) nagyobb arányban fordulnak elő mikrocisztin termelők, mint más morfospeciesnél (*M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*). Idáig Európában még nem találtak mikrocisztin termelő *M. wesenbergiit*.

Az összes kolóniát együttvéve, pozitív kapcsolatot figyeltek meg a kolóniák mérete és a mikrocisztin termelés között. A legkisebb méretű kolóniák (<200µm) mutatták a *mcy* gének és a mikrocisztin termelők legalacsonyabb arányát (13% és 19%). A legnagyobb méretű kolóniákban pedig a *mcy* gének (83%) és a mikrocisztin termelők aránya (90%) maximális volt. Ez magyarázható a kolóniák törékenysége közti eltéréssel, amit alátámaszt, hogy *M. aeruginosa* nagy kolóniákban nő (Parker, 1982). A MALDI-TOF analízisek 8 különböző mikrocisztin variáns jelenlétét mutatták ki. A leggyakrabban előforduló mikrocisztinek a következőek voltak: MC-LR, MC-RR, MC-YR, valamint ezek ritkán előforduló demetilált változatai. A kolóniák hasonló mikrocisztin profilt mutattak a vizsgált tavakban. A HPLC analízissel megerősítették az előbb felsorolt fő mikrocisztin variánsok előfordulását.

Ezzel ellentétben, a finnországi tóban a demetilált MC-LR, -RR variánsok voltak többségben. A metiláció során fellépő különbségek a fiziológiai hatásoknak köszönhetőek, a demetilált variánsok hőmérséklet függését az *Anabaena* fajokban kimutatták. Az eredmények alapján elmondható, hogy szoros kapcsolat van a *mcy* gének előfordulása és a mikrocisztinek jelenléte között, valamint a jelenlévő fajok és a mikrocisztin termelés között.

Toxikus Microcystis formák azonosítása terepi mintákból multiplex PCR-rel

Az utolsó néhány évben a különböző laboratóriumokból származó adatok megnyitották a lehetőséget a toxikus és nem toxikus fajok elkülönítésére, a *mcy* gének jelenlétének vagy hiányának detektálásával. Sikerült azonosítani a mikrocisztin termelő *Microcystis* fajokat öt DNS szekvencia egyidejű amplifikációjával, amelyek hat *mcy* gén (*mcy*A, -B, -C, -D, -E és *mcy*G) specifikus régiójának feleltek meg.

A vizsgálatokhoz tervezett hat primerpár teszi lehetővé a kulcs *mcy* szekvenciák amplifikálását, ilyen például a TE domén (PSCF3/PSCR3) amely, az oligopeptid ciklikusságáért felelős (Nishizawa és mtsai., 1999). A PKS egység megerősítését két primerpárral végezték el (PKGF1/PKGR2 és PKDF1/PKDF2), ez az egység játszik szerepet a mikrocisztin jellegzetes aminosavának, az *Adda*-nak a kialakításában. Az *Adda*

bekapcsolódását a növekvő peptidláncba a GSA-TA domén biztosítja, és az erre a doménre tervezett primerpár (PKEF1/PKER1) pozítiv PCR reakciója jelzi a GSA-TA domén jelenlétét. A multiplex vizsgálatokban a siker kulcsa a primerpárok megegyező olvadáspontja, és a primerpárok eltérő optimumú koncentrációinak alkalmazása volt. Az új módszer alkalmassága a mikrocisztin termelő *Microcystis*ek kimutatására a MALDI-TOF tömegspektroszkópiás módszerrel ellenőrizhető.

Számos esetben számoltak már be olyan *Microcystis* fajokról, amelyekben megtalálhatóak voltak a *mcy* gének és ennek ellenére sem termeltek mikrocisztint (Kurmayer és mtsai., 2002). A multiplex módszerrel párhuzamosan folytatott mikrocisztin analízisek megerősítették, hogy a multiplex vizsgálat alkalmas a toxintermelő *Microcystis*ek azonosítására a vízvirágzásokban. A multiplex PCR vizsgálatokról bebizonyosodott, hogy alkalmas más mikrocisztin termelő fajok vizsgálatára is (*Planktothrix*).

Befejezésül elmondható, hogy a PCR eszközök alacsony költsége felveti annak a lehetőséget, hogy a vízminőségért felelős vállalatok alkalmazzák a multiplex vizsgálatokat.

2.4. A *Planktothrix*ekről

Eredetileg az *Oscillatoria* nemzetséghez sorolták őket növekedési tulajdonságaik miatt, később azonban sikerült különválasztani a két genuszt, figyelembe véve az eltérő megjelenésüket, életformájukat, feno- és genotípus sajátságaikat. Ma a *Planktothrix*ek jól megkülönböztethető filogenetikai ágat képviselnek az *Oscillatoriales* rend *Phormidiacea* családján belül.

Európa számos országából számoltak be fonalas szerveződésű *Planktothrix* fajok vízvirágzásairól (Belgium, Németország, Finnország, Norvégia, Spanyolország, Magyarország, Franciaország). A *Planktothrix* genusz két leggyakoribb faja az északi félteke víztereiben a *Planktothrix rubescen s*és a *Planktothrix agardhii*. A két fajt pigment összetételük és élőhelyük szerint tudjuk megkülönböztetni. A *P. rubescens* vörösen pigmentált, fikoeritrinben gazdag fenotípus, mély rétegzett, oligo- és mezotrofikus vizekben fordul elő. A *Planktothrix agardhii* zölden pigmentált, fikocianinban gazdag forma, sekély, felkevert, mezo- és hipertrofikus vizekben jelenik meg (Olivier és Ganf, 2000).

A *P. rubescens*ről tudott, hogy gyenge fényviszonyokhoz alkalmazkodott jól, míg a *P. agardhii* jobban tolerálja a nagy fényintenzitású élettereket (Oberhaus és mtsai., 2007). Az alacsony fényintenzitás kedvez a *P. rubescens*nek, mivel ezeknek a prokariótáknak kisebb a fenntartási költségük, mint a zöld algáknak (Oliver és Ganf, 2000). A *P. rubescens* a benne található fikoeritrinnel képes abszorbeálni a beérkező zöld fényt. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy 2 és 120 µmol quanta m⁻² s⁻¹ fényintenzitás értékek között tud növekedni a *P. rubescens*. Maximális növekedési rátáját 26 µmol quanta m⁻² s⁻¹körüli értéknél mérték. A *P. rubescens* a tiszta vizek mélyebb rétegeiben dominál, a *P. agardhii* a zavaros vizek felszínén fordul elő inkább. A piros és a zöld pigmentált faj eltérő gázvezikulumot alakít ki, ez a köztük lévő szelektív különbséget mutatja, mert amíg pirosan pigmentált ökotípus a mély élőhelyeken dominál, addig a zöld ökotípus a sekély vizeket preferálja. Fontos a gáz vezikulumok ellenálló képessége a hidrosztatikai nyomással szemben, legfőképpen akkor, amikor a mély tavakban végbemegy a keveredés és a fonalas egyedek a hipolimnion rétegbe kerülnek (Walsby és mtsai., 1998).

A *P. rubescens* toxin termelése erőteljesebb, mint a *P.agardhii* toxin termelése (Fastner és mtsai., 1999). A *P. agardhii* fő MC formái a [Asp³] MC-LR, [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR, és a [Asp³] MC-HtyR, a *P. rubescens* MC variánsai pedig a [D-Asp³, Dhb⁷] MC-RR és [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR.

A *P.rubescens* vízvirágzása gyakran késő ősztől korai tavaszig tart, ezzel szemben a *P*. agardhii tömeges megjelenése a nyári hónapokra tehető. A mélyebb prealpin tavakban, sajátos hőrétegződés figyelhető meg, amelyek ezeknek a fikoeritrinben gazdag planktonikus szervezeteknek tipikus élőhelyei. A vízfelszíntől a tófenékig haladva három élőhely típust különíthetünk el. A legfelső vízréteg a fedőréteg (epilimnion), amelyre a gyors környezeti ingadozások jellemzőek. A víz legmélyebb rétege (hipolimnion) hideg, hőmérséklete általában az alapkőzet hőmérsékletétől függ. A két típus között helyezkedik el a vékony átmeneti réteg (metalimnion), amelyet a P. rubescens kedvel. Tehát a populáció fejlődéséhez nagyon fontos a vízoszlop hőrétegződése és annak stabilitása. Az emelkedő turbulencia a rétegződés megszűnéséhez vezet, ami negatívan hat a fonalas egyedek növekedésére . A P. rubescens populáció télen a felszín közeli rétegben helyezkedik el, nyáron pedig a 20-30 m mélységben található középső rétegben fordul elő. A populáció mérete április végétől kora novemberre drasztikusan lecsökken (80-86%), mert ebben az időszakban szűnik meg a víz rétegződése. A fonalas egyedek gáz vezikulumok segítségével képesek változtatni és szabályozni saját pozíciójukat a metalimnikus és epilimnikus réteg között (Reynolds, C. S., 1987). A mély tavakban gyakori P. rubescens erősebb gáz vezikulumokat alakít ki, így képes a mélyebb rétegekben megnövekvő hidrosztatikai nyomásnak ellenállni (Bright és Walsby, 1999).

A *P. rubescen s*a vízben megtalálható nitrogénforrások közül a nitrátot preferálja az ammóniummal szemben, még akkor is, ha az ammónia asszimilációja kedvezőbb lenne számára (Ohmori, 1978). Képes felhasználni egyes aminosavakat (arginin, szerin, glicin) szerves nitrogén forrásként, hogy egy adott szinten növekedni tudjon. Előbbiekből kiindulva a *P. rubescens* foto-heterotrófikus képességekkel rendelkezik, így előnyben van több fajjal szemben (Zotina és mtsai., 2003). Alkalikus foszfatáz kiválasztására képes, amelynek segítségével foszfát hiányában képes felhasználni a jelenlevő foszfort. A foszfornak kitüntetett szerepe van a populáció méretének változtatásában, ha a foszfor koncentráció 10 μ g L⁻¹-nél kisebb, akkor ez a *P. rubescens* populáció csökkenéséhez vezet. Az élőhely pH és oxigénkoncentráció változásai is hatással vannak a populáció növekedésére.

A Planktothrix genusz mikrocisztin szintetáz génklaszterének variabillitása

A tapasztalatok jól mutatják, hogy a PCR egy ígéretes módszer, amelynek segítségével vizsgálhatjuk a mikrocisztin termelő fajok eloszlását a cianobaktérium populációkban. Azonban, a nem megfelelő észlelés kockázatára figyelnünk kell. Erre két okunk van: az egyik a *mcy* génekben megfigyelhető DNS polimorfizmus, a másik a *mcy* gének jelenléte a nem termelő fajokban. A *Planktothrix* genusz *mcy* génklaszterének nyolc régióját a klaszterben való elhelyezkedésük alapján két csoportra bonthatjuk: az egyik csoportba tartoznak a génekben előforduló régiók (*mcy*T, *mcy*E, *mcy*A, *mcy*B), a másik csoportot pedig a két gén határán elhelyezkedő szakaszok alkotják (*mcy*TD, *mcy*EG, *mcy*HA és a *mcy*CJ) (6. ábra). Erre a nyolc régióra terveztett primerpárok tervezésénél alapul vették a már meglévő *P. agardhii mcy* génklaszterét.

Az eredmények azt mutatják, hogy a *myc* gének nemcsak kizárólagosan a mikrocisztin termelő *Planktothrix* fajokban fordulnak elő. A *myc* gének jelenléte a mikrocisztin termelőkben elég változatos lehet. Két hipotézissel lehet megmagyarázni a *mcy*T és *mcy*TD részeknek előfordulását a nem termelő fajokban. Első feltevés alapján ezek a régiók talán egy másik génklaszterhez tartoznak, mivel tudomásunk van a *Planktothrix*ekben előforduló más nem-riboszómálisan szintetizált peptidek különböző csoportjairól (Welker és mtsai., 2004), de ez nem bizonyíték arra, hogy a *mcy*T nem szükséges mikrocisztin bioszintéziséhez. A *mcy*T elhelyezkedése talán véletlen lehet *Planktothrix*ekben, mert a *Microcystis*ben és az *Anabaena*ban ez a pozíció eltűnt (Rouhiainen és mtsai., 2004). Második hipotézis szerint, a *mcy*T és *mcy*TD jelenléte a nem termelő fajokban a természetes mutánsok jelenlétét jelzik. A *mcy* gének valójában elég ősi gének, a nem mikrocisztin termelő fajok talán a mikrocisztin termelő fajokból fejlődtek ki a *mcy* gének ismétlődő elvesztésével (Rantala és mtsai., 2006).

Két említett hipotézis közül a második, ami elfogadható. A mcyT és mcyTD régiók alkalmatlanok a mikrocisztin termelő *Planktothrix* fajok kimutatására, mivel ezek előfordulnak nem termelő fajokban is. Ezeknek a régióknak a használata maga után vonja annak a kockázatát, hogy túlbecsüljük a mikrocisztin termelőket. A mikrocisztin termelő *P. rubescens*ben a mcyA szakasz hiányát valószínűleg a primerek pontatlanságával magyarázhatjuk, amit a *P. agardhii* és *P. rubescens mcy* génklasztere között meglévő szekvencia variabilitás eredményez. A mcyA gén a legnagyobb valószínűséggel fordul elő a *P. rubescens*ben, mivel a ciklikus peptid 1. pozíciójában elhelyezkedő L-Ala és 7. pozíciójában található *Mdha* egyesítésében vesz részt (Tillet és mtsai., 2000). A mcyA változékonysága tükrözheti a mikrocisztin izoformák változatosságát (Welker és mtsai.,

2004). A *mcy*A, *amcy*TD, és a *mcy*EG régiók elég változatos formában fordulnak elő ahhoz, hogy a mikrocisztin termelők azonosítására használhatnánk fel, mivel ezek alkalmazása a termelők alulbecsléséhez vezetne.

A mikrocisztin termelő *Planktothrix* megbízható azonosítása csak azokkal a gén régiókkal lehetséges, amelyek változatlan hosszúsággal fordulnak elő az összes mikrocisztin termelő fajban: *mcy*B, *mcy*E, *mcy*CJ vagy *mcy*HA. A *mcy*B katalizálja a mikrocisztin molekula 2. pozíciójában lévő L-aminosav és a 3. pozíciójában lévő aszparginsav egyesítését (Tillet és mtsai., 2000), a *mcy*E régió pedig az *Adda* összeszerelésében játszik szerepet.

Az eredményekből jól látható, hogy a mikrocisztin termelő fajok detektálásánál gondosan le kell ellenőrizni a markereket, amelyeket a mikrocisztin és nem mikrocisztin termelő fajok azonosítására használunk.

2.5. A cianobakteriális toxinok

A cianobaktériumok által termelt toxinok szekunder metabolitok, amelyek nagy diverzitást mutatnak (Welker és von Döhren, 2006). A toxin szintézisért felelős gének a cianobaktérium genomjában helyezkednek el, amelyek valószínűleg rekombinációs és duplikációs folyamatok révén alakították ki jelenlegi strukturális diverzitásukat. A toxinokat hatásuk alapján a következő csoportokba sorolhatjuk: neurotoxinok (anatoxin-a, szaxitoxin), hepatotoxinok (mikrocisztinek, nodularin), citotoxinok (cilindrospermopszin), dermatotoxinok (aplysiatoxin, lynbyatoxin) és az irritáló hatású toxinok (lipopoliszacharidok).

Neurotoxinok

A neurotoxinokat szerkezeti felépítésük alapján két csoportba sorolhatjuk. Az egyik csoportot az alkaloid típusú vegyületek alkotják, mint például az anatoxin-a (1. ábra), homoanatoxin-a, anatoxin-a(s), valamint a bénulásos kagylómérgezés toxinjai (szaxitoxin, gonyautoxin) (1. ábra). A másik csoportot a lipopetidek alkotják, ahová az antillatoxin A és B, kalkitoxin és a jamaicamidek tartoznak. Az alkaloid toxinokat az *Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis, Cylindrospermopsis*, és *Planktothrix* fajokból (Sivonen és Jones, 1999), a lipopeptideket a *Lyngbya majuscula* fajból sikerült izolálni (Orjala és mtsai., 1995; Wu és mtsai., 2000; Edwards és mtsai., 2004).

Az anatoxin-a egy alkaloid vegyület, amelynek a bioszintézisét teljesen még nem írták le, de a bioszintézisért felelős géneket már azonosították (Mejean és mtsai., 2010). Az anatoxin-a vízben jól oldódik, de pH >10 értéknél instabillá válik, a fénysugárzás nem toxikus formává alakítja. A homoanatoxin-a szerkezetileg nagyon hasonló az anatoxin-a felépítéséhez, mivel bioszintézisekor az anatoxin-a keto csoportjához egy metil csoport kapcsolódik. Az anatoxin-a(s) fomát a ciklikus N-hidroxiguanidin szerkezet foszfatátésztereként írták le.

A szaxitoxinok triciklikus vegyületek, molekuláris vázuk szerkezetileg kapcsolatban áll a két guanidin csoporttal rendelkező tetrodotoxinnal. A szaxitoxinoknál előfordul nem szulfatált, egyszeresen szulfatált vagy kétszeresen szulfatált típus is. A vízben oldódó szaxitoxinok 90 napnál tovább is képesek perzisztálni az édesvízekben, de a magas hőmérséklet hatására átalakulnak kevésbé toxikusabb formává.

A β-metilamino-alanin (BMMA) újonnan felfedezett neurotoxikus cianobakteriális nem-protein aminosav (1. ábra), amelyet eredetileg a *Cycas circinalis* cikászból izoláltak. A

BMMA összekapcsolható a Guam-szigeten előforduló neurodegeneratív betegségek nagyszámú eseteivel, úgymint az amiotrófiás laterálszklerózissal és a Parkinson kórral (Cox és mtsai., 2003). A *Nostoc* fajok a cikászok gyökereivel élnek szimbiózisban és termelik a BMMA-t, ami felhalmozódik a növények magjaiban. A guami bennszülöttek étrendjük részeként fogyasztották a cikászok magvait, valamint ezzel etették malacaikat, ennek révén a BMMA a táplálékláncban felhalmozódott. Néhány évvel ezelőtt mutatták ki a BMMA megjelenését a brakkvizek táplálékláncában is, amit a Balti-tengeren tömegesen megjelenő *Nodularia* és *Aphaznizomenon* genuszok BMMA termelése eredményezett (Jonasson és mtsai., 2010).

Neurotoxins



1. ábra Neurotoxinok kémiai szerkezete (Dittman és mtsai., 2013)

Az emlősökben az anatoxin-a és a homoanatoxin-a az ingerületátvivő acetilkolint utánozzák, irrevelzibilisen bekötődnek a nikotin acetilkolin kötő receptorokhoz. A nyitott nátrium csatornákon keresztül áramló nátrium ionok akciós potenciált hoznak létre, ezáltal az izomsejtek túlzott stimulációját érik el, ami izomrángásokat, konvulzív görcsöket, fulladást vált ki. A szaxitoxinok, a jamaicamidek és a kalkitoxin az ingerület átvitelt blokkolják azzal, hogy az idegsejtek nátrium csatornáihoz kapcsolódnak, így a nátrium ionok nem tudnak belépni a csatornákon át a sejtekbe, s ez izombénuláshoz, végül halálhoz vezet (Strichartz és mtsai., 1986). Az anatoxin-a(s) egy organofoszfát, mely az acetilkolinészteráz enzimblokkolásával fejti ki hatását. Az acetilkolin felhalmozódik a szinapszisokban, és a folyamatosan küldött idegi impulzus izom túlműködéséhez, fulladáshoz vezet. Az antillatoxinok a nátrium csatornák stimulációjával érik el hatásukat.

A neurotoxinok hatását kellően tanulmányozták az emlősökben. Az egerek segítségével meghatározták az LD_{50} értékeket: 375 µg kg⁻¹ (anatoxin-a), 250 µg kg⁻¹ (homoanatoxin-a), 20 µg kg⁻¹ (anatoxin-a (s)), és 10 µg kg⁻¹ (szaxitoxin) (Kuiper-Goodman és mtsai., 1999). A tisztított szaxitoxin 10 µg L⁻¹ koncentrációban a zebrahal (*Danio rerio*) ikráinak kikelését késleltette, addig a legnagyobb 500 µg L⁻¹ koncentrációnál elváltozást és

halált okozott. Az anatoxin-a 400 μ g L⁻¹ mennyiségnél a zebrahal szívverésére volt hatással, de ennél kisebb koncentrációnál (40 és 200 μ g L⁻¹) nem észleltek változást (Oberemm és mtsai., 1999). Az *Anabaena sp.*e gész sejtjei (10⁻⁷ sejt ml⁻¹, 970 μ g g⁻¹anatoxin-a) toxikusak voltak a fiatal pontyokra (*Cyprinus carpio*), amelyek 26-29 óra után elpusztultak. A kisebb sűrűségű sejtszámnál (10⁻⁵ sejt ml⁻¹) a toxin nem okozott halált, de hasonló reakciókat váltott ki, mint amit a nagyobb sűrűségű kezelésnél tapasztaltak (Nogueira és mtsai., 2004). Az alkaloid neurotoxinok gyorsan felhalmozódnak a zooplanktonokban, halakban, rákokban, kagylókban, ezáltal megnyitják a lehetőséget, hogy ezek a toxinok bekerüljenek a táplálékláncba (Negri és Jones, 1995). A kalkitoxin valamint a jamaicamid C a tengeri rákok specifikus toxinjai (Wu és mtsai., 2000; Edwards és mtsai., 2004). A kalkitoxin gátolja a tengeri fiatal rákembriók sejtjeinek elkülönülését.

Citotoxinok

A cilindrospermopszin ciklikus guanidin alkaloid (2. ábra), amelynek termelését legalább nyolc, fonalas cianobaktérium faj esetében, a *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans, Anabaena bergeii, Aphanizomenon flos-aquae, Aphanizomenon issatschenkoi, Aphanizomenon ovalisporum, Raphidiopsis curvata,* és *Lyngbya wollei* írták le (Falconer és Humpage, 2006). A *C. raciborskii* a leginkább vizsgált faj. Széles elterjedését bizonyítja, hogy egyaránt fellelhető, Amerikában, Afrikában, Európában, Ázsiában és Ausztráliában. A cilindrospermopszin tartalmaz egy uracil magot, ami hozzákapcsolódik egy szulfatált guanidin maghoz. Cilindrospermopszin származékokat fedeztek fel, amelyeket 7-epi-cilindrospermopszinként és a deoxicilindrospermopszinként izoláltak (Norris és mtsai., 1999). A hőstabil cilindrospermopszin a természetes alga extraktumokban napfény hatására lebomlik, de tisztán a vízben nem bomlik le (Chiswell és mtsai., 1999). Mérgezőképességéhez szükséges az ép pirimidin gyűrű. Amint bekövetkezik a proton klórra történő cseréje vagy a szén oxidációja, akkor a nem toxikus cilindrospermopszin forma jön létre. A *C. raciborskiiban* a deoxicilindrospermopszin analóg fordul elő, ami sokkal kevésbé mérgező, mint a cilindrospermopszin (Li és mtsai., 2001).



2. ábra Cilindrospermopszin (7R) kémia szerkezete (Dittmann és mtsai., 2013)

A cilindrospermopszin és analógjai, a 7-epi-cilindrospermopszin és a deoxicilindrospermopszin legjobban a májat károsítják, de megfigyelhető hatásuk más szervekben is. A sejt felvételi mechanizmusa még nem ismert, de szükséges hozzá az epesavat szállító rendszer (Chong és mtsai., 2002). Felvételi mechanizmusként felmerült a diffúzió, azonban az elektromosan töltött molekuláknak ez az út valószínűtlen segítő transzporter molekulák vagy pórusok nélkül (Chong és mtsai., 2002). A cilindrospermopszinnak való kitettség celluláris nekrózist, sorvadást, DNS töredezést és tumor kialakulást vagy mutagenezist eredményez (Wiegand és Pflugmacher, 2005).

A cilindrospermopszin nem inhibitora a protein foszfatáz enzimnek, de jelentős irreverzibilis protein bioszintézis gátló hatással bír (Froscio és mtsai., 2003). Bizonyítást nyert, hogy a cilindrospermopszin aktiválásában a citokróm-P450 enzimrendszer vesz részt, ami szükséges a cilindrospermopszin citotoxikusságához, de nem szükséges a protein szintézis gátlásához (Froscio és mtsai., 2003). Az ausztáliai Queenslandben előforduló Cylindrospermopsis virágzások tehenek pusztulását és emberi mérgezéseket egyaránt okoztak (Griffiths és Saker, 2003). A tisztított cilindrospermopszin 2860 μ g L⁻¹ koncentrációnál az Artemia salina populáció 50%-os halálozását okozta 48 órán belül. A 200-232 µg L ¹koncentrációban cilindrospermopszint tartalmazó *C. raciborskii* épsejtek toxikusnak bizonyultak Bufo marinus ebihalak (White és mtsai., 2007) és a Melanoides tuberculata embrióik (Kinnear és mtsai., 2007) esetében. A lizált sejtes kezelések kevésbé voltak toxikusak, mint az ép sejtes kezelések, ami azt sugallja, hogy az ép sejtek bejutása megakadályozza a szabad toxin abszorpciót, így elősegíti a nagyobb fokú mérgezést. A természetes tavakban lévő C. raciborskii populációnak kitett rákok (Cherax quadricarinatus) középbéli mirigyében és hasüregi izomzatában több cilindrospermopszin akkumulálódott, mint a laboratóriumi tenyészetnek kitett rákokban. Szövettani rendellenességek nem voltak megfigyelhetőek ezeknél a rákoknál (Saker és Eaglesham, 1999). A természetes tavakból

összegyűjtött szivárvány hal belső szöveteiben 1,2 μ g g⁻¹ (nedves tömegre) cilindrospermopszin halmozódott fel. A 16 napos kitettség után az *Anodonte cygnea* édesvízi kagyló szöveteiben 2,52 μ g g⁻¹ (nedves tömegre) cilindrospermopszin akkumulálódott, aminek a fele két hét után is a szövetekben maradt (Saker és mtsai., 2004).

Dermatotoxinok

A tengeri *Lyngbya majuscula* által termelt lyngbyatoxinok és az aplysiatoxinok, gyulladást és daganatos betegségeket előidéző metabolitok (Fujiki és mtsai., 1983). Míg a lyngbyatoxin A, B és C indol alkaloidok, addig az aplysiatoxin, a debromoaplysiatoxin és ezek kevésbé toxikusvariánsai fenolos bilakton vegyületek (3. ábra). A debromoaplysiatoxint két másik bentikus tengeri cianobaktérium fajból, az *Oscillatoria nigroviridisből* és a *Schizothrix calcicolaból* izolálták.

Dermatotoxins



3. ábra Dermatoxinok kémiai szerkezet (Dittmann és mtsai., 2013)

Az egerekbe intraperitoneálisan beadott lyngbyatoxin A vagy az aplysiatoxin bélvérzést, gyomorfekélyt és végül halált okozott (Ito és Nagai, 2000; Ito és mtsai., 2002a). A lyngbyatoxin és a debromoaplysiatoxin három tengeri csupasz csiga fajban, a *Stylocheilus striatusban, Bursatella leachiiben*, és a *Diniatys dentiferben* akkumulálódott (Capper és mtsai., 2005). A dermatotoxinok hatása a halakra és vízi gerinctelenekre nem kellően vizsgált, pedig fontos lenne, mivel képesek a vízi táplálékláncban felhalmozódni.

Az irritáló hatású toxinok

A cianobakteriális lipopoliszacharidokat az endotoxinok közé sorolhatjuk. Felépítésüket tekintve egy szénhidrát polimer, egy oligoszacharid mag és egy acilált glikolipid (lipid A) vesz részt, az utóbbi rész kapcsolható össze a lipopoliszacharidok endotoxikustulajdonságával (Stewart és mtsai., 2006). A *Microcystis, Anabaena, Spirulina*, és *Oscillatoria* cianobaktérium genuszokból toxikus lipopoliszacharidokat izoláltak.

Keveset tudunk a cianobakteriális lipopoliszacharidok mérgezési mechanizmusairól, ezért a feltételezéseinket a Gramm-negatív baktériumok lipopoliszachardjainak hatásaira alapozzuk. Az utóbbiak az emlősökben közvetlenül hőemelkedést, szeptikus sokk szindrómát, gyulladást, májkárosodást és a méregtelenítésben szerepet játszó enzimek aktivitásának csökkenését okozzák (citokróm-P450 és a glutation-S-transzferáz). A cianobakteriális lipopoliszacharidok számos emberi betegséggel hozhatóak kapcsolatba, amely elég széles skálán mozog, akár kiterjedhet a bőr irritációjától a béltraktusi és légzési gondokig (Stewart és Raziuddin és munkatársai mtsai.. 2006). kimutatták, hogy a cianobakteriális lipopoliszacharidok toxikusabbak, mint a Gramm-negatív baktériumok lipopoliszacharidjai: a Microcystis és Gleotrichia által termelt lipopoliszacharidok hatásosabban gátolták a glutation-S-transzferázt a halak embrióiban, mint a Gramm-negatív Salmonella tsyphimurium és Escherichia coli baktériumok lipopoliszacharidjai (Best és mtsai., 2002). A cianobakteriális lipopoliszacharid és mikrocisztin-LR variáns egyidejű alkalmazása azt eredményezte, hogy a hepatotoxin hatását a lipopoliszacharid lecsökkentette az Artemia salina, a Daphnia magnaés a Daphnia galeata fajokban (Lindsay és mtsai., 2006).

Hepatotoxinok

A vízvirágzásokból leggyakrabban kimutatott cianotoxinok a ciklikus peptidek köréből, a mikrocisztin és nodularin családból kerülnek ki (Carmichael, 1992). A ciklikus peptidek a sejtben általánosan előforduló oligo- és polipeptideknél kisebb méretű vegyületek (molekulatömeg: ~800-1100 Da). Vízoldhatók és - sok hidrofób csoportot tartalmazó mikrocisztin kivételével - nem képesek közvetlenül áthatolni az állati, növényi és bakteriális sejtmembránon. A környezetbe ezek a toxinok csak a cianobakteriális sejtek pusztulása után, azok lízise során kerülhetnek. Kémiai stabilitásuk és vízoldhatóságuk következtében kiszabadulásuk után hosszabb-rövidebb ideig jelen lehetnek a felszíni vizekben (Falconer, 1993b).

A nodularint Rinehartnak és munkatársainak sikerült elsőként szerkezetileg azonosítani a brakk vizekben élő *Nodularia spumigena* fajból. A nodularin ciklikus pentapeptid, szerkezete nagy hasonlóságot mutat a mikrocisztinekkel (4. ábra), de csak egyetlen variálható aminosav található (Z) a szerkezetben, így variánsainak száma is sokkal kevesebb. A variánsok száma kilencre tehető. A leggyakrabban előforduló variáns a NOD-R,

ahol arginin található a variábilis helyen. (Rinhart és mtsai., 1988). A nodularin gyűrűjét az *Adda*, a D-eritro-β-metil-aszparginsav (*D-Masp*), valamint N-metildehidrobutirin (*Mdhb*) alkotja, mely hasonlít a mikorcisztinekben lévő *Mdha*-ra.



4. ábra Heptatoxinok kémiai szerkezet (Dittmann és mtsai., 2013)

A mikrocisztinek és nodularinok a gerincesek szervezetében a máj sejtjeiben halmozódnak fel. Bejutásuk aktív membrán transzporttal zajlik, mely az organikus anion transzporter polipeptidek (OATP-ek) segítségével történik (Runnegar és mtsai., 1995; Fischer és mtsai., 2005). Az OATP felelős az epesavak, a szteroidok és más fehérjék aktív membránon át történő transzportjáért (Hagenbuch és Meier, 2003). A hepatotoxinok a májon kívül még a vesében, a szívben, az ivarmirigyekben, az emlősök és a halak izomzatában, a vízi gerinctelenek izomszöveteiben is felhalmozódhatnak (Chen és Xie 2005a,b; Kankaanpää és mtsai., 2005). Ez felveti az előbb felsorolt szervekben OATP-ek jelenlétét, habár eddig csak a máj és az agysejtekben lett megerősítve az OATP-ek hatása. A mikrocisztinek és nodularinok gátolják a proteinfoszfatáz 1 és 2A enzimeket, ezáltal a sejtben lezajlódó foszforilációs/defoszforilációs folyamatok egyensúlya megbomlik, és végül a sejtszerkezet megszűnik. Az enzimek irreverzibilis gátlása akkor jön létre, amikor a mikrocisztin Mdha egysége és az enzim között kovalens kötés alakul ki. A hepatotoxinok oxidatív stresszt is kiváltanak azáltal, hogy növelik a káros reaktív oxigénformákat és/vagy csökkentik a sejt antioxidáns képességét (detoxifikációs enzimekgátlásával), mely a DNS degradációját és/vagy a sejt pusztulását okozza (apoptózis és nekrózis). A mikrocisztinek növelik a káros szabadgyök termelését, az antioxidáns enzim aktivitást, a lipid peroxidációt, a sejtek pusztulását és a DNS károsodást (Ding és mtsai., 2001). A nodularinok csökkentik a glutation-peroxidáz, a szuperoxid-dizmutáz, és a kataláz enzim aktivitását (Lankoff és mtsai., 2002). Továbbá elmondható, hogy a hepatotoxinok jelentős tumor promótereknek számítanak.

A hepatotoxinok hátrányosan hatnak a vízi gerincesekre és gerinctelenekre laboratóriumi és terepi körülmények között. A nodularin a tengerben élő Salmo trutta m. trutta L. pisztráng májának szöveti károsodását eredményezte. A vízi gerinctelenekben a mikrocisztin a Chasmagnathus granulata rák elülső kopoltyújában felborította az ozmoregulációt a Na⁺, K⁺-ATPáz gátlásával (Vinagre és mtsai., 2002), továbbá a középbéli mirigy szöveti károsodását okozta, és oxidatív stresszt idézett elő. Az édesvízi és a tengeri kagylók néhány napig igen magas hepatotoxin koncentrációnak voltak kitéve (2,5-300 µg L⁻ ¹), amit túléltek. Ez azt mutatja, hogy ezek a fajok toleránsak rövid ideig. A vízi élőlények máj- és a középbéli mirigykárosodása visszafordítható, ha eltávolítjuk őket a toxikus környezetből, azonban ha nem távolítjuk el vagy nagymértékű dózisnak tesszük ki őket, akkor elpusztulnak. A gerincesekben a hepatotoxin LD_{50} értéke 50 µg kg⁻¹ és 300 µg kg⁻¹ között változik. Ez az érték fajtól függő. Továbbá a hepatotoxinok negatív hatással vannak az akvakultúrák termelékenységére, ahol a tenyésztett fajok növekedése nagyban függ a kisebb trofikus szintek populációinak (vízi növények, mikroalgák, mikróbák, és más ehető fitoplanktonok) gyarapodásától. Tehát ökológiailag lényeges a mikrocisztin-LR variáns koncentrációja (0,5 μ g L⁻¹ és 1,0 μ g L⁻¹), mivel ezen értékeknél a vízi növények és mikroalgák fotoszintézise és/vagy növekedése jelentősen lecsökken. A nodularint tartalmazó kivonat a Fucus vesiculosus mikroalgánál oxidatív stresszt váltott ki (Pflugmacher és mtsai., 2007). A hepatotoxinok felhalmozódnak a természetes vizekben és az akvakultúrákban előforduló pelagikus és bentikus állatokban egyaránt. Embert ért direkt mérgezési esetek nagyon ritkák. A legtöbb halált okozó esetről a brazíliai Caruaru városából egy hemodialízis központból számoltak be, ahol legalább 50 páciens halt meg neurotoxikus és hepatotoxikus mérgezésben (Jochimsen és mtsai., 1998). Az ausztráliai Armidaleben bekövetkezett máj- és bélrendszeri megbetegedések sorozatát is a mikrocisztineknek tulajdonították (Chorus és Bartram, 1999).

A mikrocisztin (MC)

A mikrocisztinek a cianotoxinok legfontosabb családja, ezért a vizsgálatok leggyakrabban a mikrocisztinekre irányulnak. A mikrocisztinek bioszintézisét elsőnek a *Microcystis* genusszal kapcsolták össze, és elnevezésük is innen ered. A *Microcystis*eken kívül még az *Anabaena*, a *Planktothrix* (*Oscillatoria*), az *Anabaenopsis*, a *Nostoc*, és a *Hapalosiphon* genuszokról tudott, hogy mikrocisztin termelők (Carmichael, 1992; Skulberg

és mtsai., 1993). A mikrocisztinek monociklikus heptapeptid vegyületek (4. ábra), gyűrűjüket két L- és három D-aminosav, valamint két ritka aminosav származék, a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav (*Adda*) és N-metil-dehidroalanin (*Mdha*) alkotja (Botes és mtsai., 1984). A mikrocisztinek stabil, vízben oldódó molekulák. A tudományos irodalomban eddig több mint 90 variánsát írták le, ezek főleg a két L-aminosavban tértek el egymástól (Sivenon és Jones, 1999) (4. ábra).

A mikrocisztin bioszintézise és génklasztere

A mikrocisztinek bioszintézisét a mikrocisztin szintetáz enzim komplex (MCS) végzi, amely egy nem-riboszómális peptid szintetáz (NRPS) és egy poliketid szintetáz (PKS) egységből áll (Tillet és mtsai., 2000). Mindkét egység különböző modulokból épül fel, az általános domének szükségesek egy peptid vagy egy ketid egység vázhoz történő kapcsolásához, más domének pedig felelősek a peptid/ketid váz módosításáért (Ansari és mtsai., 2004). A M. aeruginosa PCC 7806 (Tillet és mtsai., 2000) és a K-139 (Nishizawa és mtsai., 1999) törzsekben megszekvenálták a mikrocisztin bioszintézisét kódoló génklasztert, ezzel lehetővé vált a nem-riboszómálisan szintetizált cianobakteriális toxinok génjeinek detektálása. A Planktothrix agardhii NIVA-CYA (Christiansen és mtsai., 2003) és Anabaena90 (Rouhiainen mtsai., 2004) törzsekben is azonosították a mikrocisztin szintetáz enzimeket, továbbá kimutatták a nodularin bioszintézisében résztvevő NPRS és PKS géneket. A M. aeruginosa mcy génklasztere körülbelül 55 kb hosszúságú, kromoszómális DNS szakasz, amely 10 gént tartalmaz. A gének két ellentétes irányban átíródó operonba rendeződnek. A mcyA-C operon három NRPS egységet kódol, amelyek ötféle domént tartalmaznak. A mcyD-J operon egy PKS egységet (mcyD), hibrid enzimeket (mcyE, G), tailoring enzimeket (mcyF, I, J) valamint egy ABC transzporternek vélt komponenst kódol (mcyH) (5. ábra) (Tillett és mtsai., 2000; Kaebrenick és mtsai., 2002).



5. ábra. A mikrocisztin szintetáz egységeinek szerepe a bioszintézisben

A mikrocisztin szintézist a mcyG hibrid enzim kezdi el a fenilacetát aktivációjával, ezt követően a fenilacetát átkerül a legelső 4'-foszfopantetein szállító egységre. Majd a mcyG, D és E enzimek PKS moduljai kialakítják az Adda még hiányzó részét. A mcyJ szükséges az Ometilációs lépéshez. A mcyE egy hibrid protein, ami NRPS és PKS modulokból áll. A legvalószínűbb, hogy a mcyE aminotranszferáz domén szolgáltatja az Adda β-amino csoportját. Végül a mcyE első kondenzációs doménja az Adda-t a PKS egységhez tartozó aktivált glutamáthoz és a NRPS részhez kapcsolja, így a lánc hossza tovább növekedhet. A mcyA, B és C enzimek NRPS moduljai a többi öt aminosavat aktiválják, és hozzákapcsolják a növekvő peptidlánchoz. A mcyC tioészteráz doménje a mikrocisztin gyűrűs szerkezetének kialakításában, valamint a szintetáz komplextől történő elszakadásában játszik fontos szerepet (Christiansen és mtsai., 2003). A mcvF aszpartát racemáz (Sielaff és mtsai., 2003) és a mcvI 2-hidroxi sav dehidrogenáz (Pearson és mtsai., 2007) aktivitása szükséges, hogy D-eritro-βmetil-aszparginsav bekapcsolódjon a peptidláncba. A mcvH jelentős hasonlóságot mutat az ABC transzporterek családjával, ezért talán szerepet játszik a mikrocisztinek szekréciójában (Pearson és mtsai., 2004). A M. aeruginosa PCC 7806 és K-139, a P. agardhii NIVA-CYA és Anabaena 90 törzsek mcy génklasztereinek teljes nukleotid szekvenciái elérhetőek az adatbázisokban. A nodularin bioszintéziséért felelős nda génklasztert Nodularia spumigena NSOR10 fajból szekvenálták meg (6. ábra).



6. ábra. A mikrocisztin és nodularin bioszintézist kódoló génklaszterek

A multi-enzim elemeket kódoló génklaszterek hasonlóak, de a modulok tartalma, elrendezése, és az egymást követő domének sem azonosak a négy genuszban. A Microcystis, az Anabaena és a Nodularia genuszban a gének átíródása a központi promoter régiótól két irányba történik (Kaebernick és mtsai., 2002). A Planktothrix fajok esetében a mcyT gén kivételével az összes mcy gén egy irányban íródik át a mcyD génnél elhelyezkedő promoter régióról. Az NRPS és PKS gének rendszerint követik a kolineáris szabályt, azaz a gének sorrendje megegyezik a bioszintézis enzimatikus lépéseinek sorrendjével (Marahiel és mtsai., 1997). Ez az Anabaena és a Nodularia génklaszterében megfigyelhető. A Microcystis és a Planktothrix génklaszterben azonban az első három gén sorrendje (mcyD, E, G) tisztán mutatja az eltérést a kolineaáris szabálytól. A tailoring gének pozíciójában és az ABC transzportert kódoló génben eltérés figyelhető meg a Planktothrix és a Microcystis esetén. A Microcystis ugyanazokat a tailoring géneket hordozza, mint az Anabaena és a Nodularia, csak eltérő sorrendben. A *Planktothrixmcy* génklaszterében két tailoring gén (mcyF, I) teljesen hiányzik, valószínűleg a mcyT korrigál a peptidlánc összeszerelési folyamata alatt. (Christiansen és mtsai., 2008a). Habár a mikrocisztin és nodularin multi-enzimek hasonlósága nagy, van egy feltűnő különbség a két génklaszter között. A nodularin génklaszterből hiányzik két NRPS modul, amelyek minden mikrocisztin klaszterben jelen vannak. A Nodulariaban a mcyA és mcyB gének ndaA génné egyesülnek, és közben két NRPS modult

elveszítenek, mely azt eredményezi, hogy kevesebb aminosavból épül fel a nodularin a bioszintézis során (Annila és mtsai., 1996).

Mikrocisztin szintézis szabályozása

Tillet és munkatársai (2000) által leírt *mcy* génklaszter elsőnek tette lehetővé a mikrocisztin-szabályozás vizsgálatát molekuláris szinten. A *M. aeruginosa* fajban a *mcy* gének transzkripciója a *mcy*A és *mcy*D között elhelyezkedő központi kétirányú promoteren megy végbe. Ez a *myc* génklaszter központi szabályzó régiója magába foglal olyan szekvenciákat, amelyek kódolják a Fur (vas felvételt szabályzó) és NtcA (teljen nitrogén szabályzó) DNS kötő fehérjéket. Három NtcA kötőhelyet azonosítottak a *mcy*A/D promoter régióban és ezt *in vitro* kísérletekkel is megerősítették (Ginn és mtsai., 2010). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vas és a nitrogén fontos szerepet játszik a mikrocisztin bioszintézis kontrollálásában.

Kaebernick és munkatársai kimutatták, hogy a vörös fény a transzkripció fokozódását, míg a kék fény annak csökkenését eredményezi. A szerzők két fényküszöböt határoztak meg, az egyik a gyenge fényviszonyok között, a másik a magas fényviszonyok között helyezkedett el, ahol jelentős transzkripciós aktivitásbeli növekedést figyeltek meg. Érdekes módon változó starthelyeket azonosítottak mindkét operonban, amikor a sejteket magas vagy alacsony fényintenzitás alatt tenyésztették. A magas fényintenzitású körülmények összefüggésben vannak a P. agardhiiban észlelt transzkripciós szint emelkedésével, valamint a toxintermelés növekedésével. A celluláris mikrocisztin tartalom állandó maradt az egész kísérlet alatt, azonban a mikrocisztin izoformák aránya megváltozott (demetilált MC-LR, -RR) válaszolva az eltérő fényintenzitásra (Tonk és mtsai., 2005). Sevilla és munkatársai valós idejű polimeráz-láncreakciókkal (qPCR) vizsgálták a vas elérhetőség hatását *M. aeruginosa* fajban. Azt állapították meg, hogy a vaséhezés a *mcy*gének transzkripciójában és a toxintermelésben növekedést okozott. A vas szerepén kívül a nitrogén elérhetőség hatásait is vizsgálták, és kimutatták, hogy a nitrogén-többlet előmozdítja a sejtnövekedést, de nincs közvetlen hatása a mcy gének transzkripciójára és a toxintermelésre. Továbbá a mcyA és mcyD gének transzkripciós start helyei nem változnak eltérő vas vagy nitrát szinteknél.

Alexova és munkatársai egy átfogó vizsgálatot végeztek (2011), ahol a vaséhezés alatt a toxin bioszintézis növekedését detektálták, de vizsgálataik során nem tapasztalták a toxingének transzkripciójának fokozódását. Összefoglalva, a következő vizsgálatoknak meg kell célozniuk a még komplexebb kapcsolat feltárását a kémiai-fizikai paraméterek és a toxinszabályozás között. Genetikai szinten a fényintenzitás és a vas-elérhetőség játszik fontos szerepet a mikrocisztin transzkripciójában. Ezek a tényezők azonban nem vezetnek a mikrocisztin termelés on-off szabályozásához. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a különböző fényintenzitás, a vas-elérhetőség, a CO₂ hatással van a cianobakteriális virágzások közösségeire, és hatásukat a genotípusok arányának megváltoztatásával érik el. A mikrocisztin termelés talán a jellemező vonásoknak csak az egyike, amely visszatűkrözi a különböző ökotípusok elkülönülését a cianobakteriális közösségekben. Az kétségtelen tény, hogy a nitrogén és a foszfor által előidézett eutrofizáció elősegíti a toxikus algavirágzások előfordulását, azonban jelenleg nem bizonyíték arra, hogy a növekvő makrotápanyagok szintjei direkt módon fejtik ki hatásukat a mikrocisztin expresszióra, vagy megkülönböztető hatásuk van a toxikus és nem toxikus genotípusokra. Ezek a környezeti faktorok összességében serkentik a virágzásban résztvevő közösség összetételét.

Mikrocisztin variánsok és toxicitásuk

Ahogy már említettük, a mikrocisztinek monociklikus peptidek, amelyek hét aminosavból épülnek fel. Gyűrűjűket két L- és három D-aminosav, valamint két ritka aminosav származék, a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav (*Adda*) és N-metil-dehidroalanin (*Mdha*) alkotja (7. ábra) (Botes és mtsai., 1984). A cianobakteriális ciklikus peptidek kémiai szerkezetének felderítése a nyolcvanas években kezdődött. Azóta több mint 90 strukturális variánst azonosítottak a különböző cianobaktérium fajokból. A szerkezeti eltérés a mikrocisztinben előforduló hét aminosav bármelyikét érintheti.



7. ábra Mikrocisztin-LR kémiai szerkezete (Dittmann és mtsai., 2013)

A mikrocisztin 2. és 4. pozíciójában lévő variábilis L-aminosavak cseréje legalább 21 ismert elsődleges mikrocisztin variánst ad (Botes és mtsai., 1985). Például az egyik legáltalánosabb forma a MC-LR, ahol ezekben a pozíciókban leucin (L) és arginin (R) található (Carmichael, 1992; Kotak és mtsai., 1995; Sivonen és Jones, 1999). A mikrocisztin többi pozíciójában található aminosavakban bekövetkező változások további számos változat megjelenését eredményezik. Például a 3. és 7. pozícióban található *D-MeAsp* és/vagy *Mdha* demetilációja 15 demetilált variánst ad. További változások lehetnek, amelyek tartalmazzák a *D-Glu* metil észterifikációját (6.) vagy a *Mdha* cseréjét (módosulását) (7.), a *D-MeAsp* demetilációját vagy annak hiányát. Ezek 25 további változatot adnak. Az *Adda* szerkezetében is bekövetkezhetnek változások: történhet geometriai izomerizáció a C-7 pozícióban, metoxicsoport demetilációja vagy helyettesítése acetoxicsoporttal a C-9 pozícióban, továbbá az 1.,3. és/vagy 7. pozícióban jelenlévő aminosavak variációival vagy ezek hiányával még 12 analógot kapunk.

A mikrocisztin variánsok toxicitása nagyon változatos. A legtöbb csere a 2. és 4. aminosavaknál, a legtöbb demetiláció pedig a 3. és/vagy 7. aminosavaknál figyelhető meg (Sivonen és Jones, 1999). Ha a 2. pozícióban lévő L-Leu hidrofób aminosavat egy másik hidrofób aminosavval helyettesítik (alanin, fenilalanin vagy triptofán), akkor toxikussága nem változik. Azonban ha hidrofil aminosavval megy végbe a csere (arginin), akkor a toxicitás drasztikusan lecsökken (Stotts és mtsai., 1993). Tehát azoknak a mikrocisztineknek a legkisebb a mérgezőképessége, amelyeknek a két variábilis pozíciójában hidrofil aminosavak találhatóak, mint például MC-RR (arginin, arginin) és a MC-M(O)R (metionin szulfoxid, arginin).
A nem változó alkotórészek megváltozása nem feltétlenül okoz eltérést a toxicitásban. Például a *D-MeAsp* vagy a *Mdha* demetilációja kis hatással van a toxicitásra, azonban a *D-Glu* szabad karboxilcsoportjának észterifikációja lecsökkenti a toxicitást (Stotts és mtsai., 1993). Továbbá, ha a *Mdha* helyettesítése N-metilalaninnal (L- és D-), N-metilszerinnel, *Mdhb*-val vagy dehidrobutirin (*Dhb*) geometriai izomerjeivel történik, akkor a toxicitás mértéke nem változik, ellenben ha a csere N-metillanthioninnel megy végbe, a toxicitás lecsökken.

Még fontosabb, hogy az *Adda* szerkezetében bekövetkező egyes módosulások is idézhetnek elő változást a toxicitásban. Például ha az *Adda* C-9 pozicíójában a metoxicsoport demetilációja vagy acetoxicsoporttal történő helyettesítése megy végbe, akkor az így bekövetkező változás kis mértékben hat a toxicitásra (Namikoshi és mtsai., 1990, 1992a). Azonban ha az *Adda* C-7 pozíciójának az izomerizációja következik be, az a toxicitás megszűnését eredményezi (Harada és mtsai., 1990).

Mérgezési mechanizmusok

A mikrocisztinek komoly elváltozásokat képesek okozni, mint a plazmamembrán szabálytalan kitüremkedését, illetve a sejtmembrán szabályos kitüremkedéseinek elvesztését (Runnegar és mtsai., 1986). Vizsgálatokat végeztek ¹²⁵I izotóppal megjelölt mikrocisztinnel, melyek megerősítették a toxin szervspecifikusságát. A radioaktív izotópokkal megjelölt mikrocisztinek a patkányoknál és egereknél is főleg a májban koncentrálódtak (Runnegar és mstai., 1986). Emellett kimutatták, hogy a multispecifikus epesav szállító rendszernek fontos szerepe van a mikrocisztinek felvételében, mert enélkül a mikrocisztinek nem tudnának átjutni a setjmembránon.

Sejtszinten a mikrocisztinek hatásukat elsősorban a citoszkelton alkotórészein (mikrofilamentumok, köztes filamentumok és mikrotubulusok) keresztül fejtik ki (Wickstrom mtsai., 1995). Ezek a fehérjékből felépülő filamentumok megszabják a sejt alakját, részt vesznek a sejt mozgásában, a sejtosztódásban valamint a sejtadhézióban (Malhotra és Shnitka, 1996). A mikrocisztin kezelést követően az aktin mikrofilamentumok újraszerveződése a tapasztalatok alapján idő és dózisfüggő. Az intermedier filamentumoknak fontos szerepük van a sejt belső vázának, és a sejtek kapcsolódásának kialakításában, ezért is lehetnek a mikrocisztin által okozott foszforilációs folyamatok célpontjai. Például a mikrocisztinnel kezelt sejtekben a citokeratin 8 és 18 hiperfoszforilációja a citokeratin intermedier filamentum

átrendeződéséhez vezetett. Továbbá a májsejtek elveszítették sejtek közötti adhéziót a mikrocisztin kezelést követően (Hooser és mtsai., 1991).

A citoszkeleton felbomlását gyakran kíséri a normál sejtek tumor sejteké történő átalakulása. Tekintettel arra, hogy a mikrocisztinek a májsejtek citoszkeletonjában változásokat okoznak, ezáltal daganatos betegségeket eredményeznek. A nyers mikrocisztin kivonat szájon át történő adagolása az egerek bőrén és a patkányok májában daganatok kialakulásához vezetett. Számos esetben számoltak be arról, hogy az ivóvizekbe került mikrocisztinek emberek daganatos betegségeit okozták, ezért az Egészségügyi Világszervezet (WHO) indítványozta, hogy az ivóvizekben a mikrocisztin koncentrációnak kisebbnek kell lenni, mint 1 μg L⁻¹ (Sivenson és Jones, 1999).

A mikrocisztinek a citoszkeleton komponenseinek átrendeződésén keresztül a májsejtek elkülönülését és a májban lévő erek endothel sejtjeinek a felbomlását eredményezik, ily módon májelváltozások kialakulásához vezetnek. A máj szerkezetének felbomlása és a májsejtek nekrózisa miatt a máj megnagyobbodása és az artériás vérnyomás csökkenése következik be. Ez okból a vér a sejtközötti térbe szivárog, így komoly májon belüli vérzést okoz, végül a kialakult hipovolémiás sokk halálhoz vezet (Dabholkar és Carmichael, 1987).

Hasonló, de kevésbé súlyos hatással vannak a gasztrointesztinális traktusra és a vesékre. A gasztrointesztinális hatások körébe tartozik a felszívóhám deformációja, a gasztroenteritisz és vérzés kialakulása. A vesét érő hatások valószínűleg közvetett módon kapcsolhatók össze a máj mérgezésével. A nefronok károsodását a vérben megnövekvő urea, kreatin és kálium szint kíséri. Runnegar és munkatársai (1986) elsőnek figyelték meg a májsejtekben a foszforiláz-a aktivitását a mikrocisztin kezelést követően. Ez azt jelezte, hogy a mikrocisztin toxicitását a protein foszfatáz (PP) gátlásán keresztül fejti ki. Ezt követő eredmények kimutatták, hogy a mikrocisztinek erős PP1 és PP2A gátlók. Az egészséges eukarióta sejtekben a protein kinázok és protein foszfatázok aktivitása között nagyon fontos az egyensúly, amit a mikrocisztin a defoszforilációs folyamatok gátlásával képes megbontani. A fehérjék magasabb foszforiláltsági állapota kóros sejtelváltozásokat idéz elő.

Mikrocisztin termelés sajátosságai

Terepi megfigyelések, tapasztalatok

A természetes fitoplankton közösségekben a mikrocisztin koncentrációk kapcsolatban állnak a toxinok celluláris termelésével és a toxintermelők biomasszájával. Az itt kapott eredmények ellentétben állnak sok esetben a laboratóriumban kapott eredményekkel, így a kísérleti eredményekből következtetni a természetes környezetre nem reális. Ráadásul a természetes fitoplankton közösségekben a teljes mikrocisztin koncentrációt a fitoplankton fajok összetétele erősen befolyásolja. A terepi vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megállapítsuk a kevert fitoplankton közösségekben a környezeti változók és a toxinkoncentrációk kapcsolatait.

A mikrocisztin koncentráció rendkívül dinamikus tud lenni térben és időben a természetes fitoplankton közösségekben. A virágzásokban egy vagy két faj dominál, a toxicitás a fő toxintermelők biomasszájával kapcsolható össze. Kotak és munkatársai (1995) a kanadai Közép-Albertában található három hipereutróf tóban hasonlították össze térben és időben a MC-LR előfordulását. A szezonális és az éves MC-LR koncentráció minden tóban erősen változott, ez összefüggésben állt a *M. aeruginosa* mennyiségével, biomassza térfogatával. A MC-LR koncentráció több mint 24 óra alatt változott. A Dél-Koreában található víztározóban a mikrocisztin koncentráció, a fitoplanktonok száma és a klorofill-a koncentráció között pozitív kapcsolat található. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a virágzásokban a toxin koncentráció becslését a domináns faj biomasszájára lehet alapozni (Oh és mtsai., 2000).

Amikor toxikus és nem toxikus fajok is vannak a fitoplankton közösségben, nehéz előre jelezni a toxin koncentrációt a fitoplankton biomasszából. Carmichael és Gorham beszámoltak arról, hogy a Hastings-tóban a toxin koncentráció napi és éves szintű változást idézett elő júliustól szeptemberig tartó periódusban. Ezt a fajösszetétel térbeli és időbeli változásával, és a toxikus/nem toxikus egyedek arányával magyarázták. Mások a fitoplankton minták HPLC analízisével kimutatták, hogy a mikrocisztin koncentrációk szezonális és éves szinten hasonlóan változnak. Vézie és munkatársai (Vézie és mtsai., 2002) megfigyelték, hogy a tó eltérő helyeiről vett minták mikrocisztin koncentrációi széles határok között változtak (0-2300 µg g⁻¹ száraz tömeg). Ezt a toxikus és nem toxikus fajok térbeli eltérésével magyarázták.

A környezeti faktorok fontos szerepet játszanak az édesvizekben zajló toxintermelés szabályozásában. A mérsékelt övi eutróf tavakban élő fitoplankton közösségek toxintermelése összekapcsolható a N és P koncentrációk változásával. Az Albertai-tavakban a teljes P-tartalom szoros kapcsolatban volt a *M. aeruginosa* biomasszájával és a celluláris MC-LR koncentrációval. Ezekben a tavakban a szervetlen N koncentrációk, a *M. aeruginosa* biomasszája és a celluláris MC-LR koncentráció között negatív kapcsolatot állapítottak meg.

Maximális toxin koncentráció akkor fordult elő, amikor a szervetlen N koncentráció a legalacsonyabb volt (Kotak és mtsai., 2000).

Nagymértékű csökkenést figyeltek meg a MC-LR koncentrációban, amikor a teljes N (TN) és teljes P (TP) arány meghaladta az 5:1 arányt (Kotak és mtsai., 2000). A TN:TP egyváltozós regressziós modellje magyarázta a változást a MC-LR koncentrációban a kevert fitoplankton közösségekben. *M. aeruginosa* biomassza és MC-LR koncentráció negatívan kapcsolódott a TN:TP arányhoz. A TN:TP aránynak a hatása a toxin koncentrációra bizonyított volt a *M. aeruginosa* biomasszájára kifejtett hatásán keresztül. Ezeket a megállapításokat megerősítették laboratóriumban végzett kísérletekkel.

Összességében elmondható, hogy az édesvizekben a toxintermelésre három fő tényező hat: a fitoplankton dinamikája (relatív mennyiség vagy a toxintermelő fajok biomasszája), a toxikus/nem toxikus cianobaktérium fajok változó jelenléte, és a környezeti tényezők hatása (Kotak és mtsai., 1995; 2000).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintagyűjtés

A mintákat 2005-2010 között gyűjtöttük magyarországi tavak algavirágzásaiból (8. ábra). A mintagyűjtés helyeként szolgáló tavak vizeit szabadidős tevékenységekre, ivóvízként vagy halastóként használják. Az összes mintát a vízfelszínéről 50 μm hálószemes planktonháló segítségével gyűjtöttük be. Az algavirágzásokból származó vízmintákat 13000 rpm fordulaton 10 percen keresztül centrifugáltuk, a sejtüledék egy részét liofilizáltuk csökkent nyomáson, a másik részét -20 °C tároltuk, míg további vizsgálatainkhoz fel nem használtuk.



8. ábra Mintavételi helyek

jelölés mutatja azokat a helyeket, ahol *M. aeruginosa* mintákat gyűjtöttük [1. Velenceitó; 2. Bárdos; 3. Nagycsécs Csécsi-tó; 4. Kis-Balaton (3T); 5. Ónod; 6. Békés; 7. Balaton; 8. Gyulai; 9. Dobozi; 10. Kis-Balaton (2T)].

o jelölés mutatja azokat a helyeket, ahol *P. agardhii* mintákat gyűjtöttük [11. Várpalotai;
12. Gyula; 13. Hajduhadház; 14. Kis-Balaton (4T)].

■ jelölés mutatja azt a helyet, ahol *P. rubescens* mintát gyűjtöttük [15. Szirmabesenyő].

3.2. 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*t azonosítottuk vízvirágzást okozó fajként. A *P. rubescens* esetében a taxonómiai, filogenetikai azonosítást 16S rRNS és fikocianin operon (*cpcBA*-IGS) gének segítségével végeztük el.

3.3. A Planktothrix rubescens tenyésztése

A Kocka-tóból izolált *P. rubescens*t BGSD-500 kódjellel láttuk el. A BGSD-500 tenyésztését BG-11 tápoldaton 22°C-on folyamatos megvilágítás (50 μ mol m⁻² s⁻¹) alatt tartottuk. A tenyészetet sterilre szűrt levegővel buborékoltatott 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 (Beckman Avanti J-25 12 000 × g) 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.

3.4. A Kocka-tó fizikai és kémiai paramétereinek meghatározása

A mintavételt követően a víz hőmérsékletét higanyos hőmérővel mértük meg. Az összes többi változót laboratóriumban határoztuk meg magyar szabványoknak megfelelően. A mintákat sötétben, 4°C-on tartottuk, amíg a méréseket végre nem hajtottuk. A pH mérést üveg elektródás pH mérővel (WTW pH 539), a víz fajlagos vezetőképességét vezetőképesség mérő műszerrel mértük (WTW LF 539). A pH-t és a vezetőképességet 20°C-os vízhőmérsékletnél határoztuk meg.

A kémiai oxigénigény (KOI) meghatározására vonatkozó szabványosított eljárások közül a kálium-permanganátos vizsgálatot végeztük el. Egy 300 cm³-es Erlenmeyer lombikba kimértünk mérőhengerrel 100 cm³ vízmintát. Hozzáadtunk 5 cm³ 1:2 hígítású kénsavat, néhány darab forrkövet és az oldatot forrásig melegítettük. A forró oldathoz hozzámértünk bürettából 20 cm³ 0,002 M kálium-permanganát mérőoldatot és pontosan 10 percig forraltuk. A forró oldathoz hozzáadtunk pipettából 20 cm³ 0,005 M nátrium-oxalát oldatot és a

színtelenné vált keveréket forrón (80-90 °C hőmérsékleten) a 0,002 M permanganát mérőoldattal addig titráltuk, amíg éppen halvány rózsaszínű nem lett. Három párhuzamos mérést végeztünk és az így kapott fogyások átlagával számoltunk. A vízminta analízise után vakpróbát kellett végeznünk 100 cm³ ioncserélt vízzel.

Az ammóniumion meghatározása indofenol reakcióval, spektrofotometriás eljárással történt. Az ammóniumion hipokloritok jelenlétében lúgos közegben fenollal illetve fenolvegyülettel reakcióba lép és kékes (a reagens sárga színe miatt zöld) színű indofenol keletkezik. A színezék kialakulását a Na₂[Fe(CN)₅NO]+2H₂O (nitroprussid-nátrium) katalizálja (ez van a szalicilát reagensben). A vegyület-származék színintenzitása az ammóniumion-koncentráció függvénye és ez spektrofotométerrel 680 nm hullámhosszon meghatározható. A méréshez kalibráló oldatsorozatot készítettünk. Az ammóniumnitrogén standardoldat 1 ml-je 1 μ g ammóniumnitrogént tartalmazot. Kalibráló sorozathoz a munkaoldatból 1ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml és 25 ml standardoldatot mértünk ki 50 ml-es mérőlombikba. Az ismeretlen vízmintából 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba bemértünk 40 ml vízmintát (mérőhengerrel), majd hozzáadtunk 4 ml színképző reagenst, majd alapos összekeverés után 4 ml nátrium-diklór-izocianurát oldatot adtunk hozzá és ismét alaposan elkevertük. Egy órányi várakozás után fotométerrel 680 nm hullámhosszon megmértük. A fotométerről megfelelő kalibrálás után közvetlenül leolvashattuk a minta NH4⁺ -N tartalma mg/L mértékegységben.

A nitrátokból forró tömény kénsavas közegben felszabaduló salétromsav és nátriumszalicilát reakciója során nitro-származék keletkezik. A nitro-származék nátriumsójának oldata lúgos közegben sárga színű. Az oldat színintenzitása, mely arányos a vízminta nitrát koncentrációjával, fotométerrel mérhető. A 100 cm³-es mérőlombikban lévő mintából törzsoldatot készítettünk. 100 cm³-es mérőlombikokban elkészítettük a standard oldat-sorozat törzsoldatait. A standard oldatok elkészítése után az egyes, ismert koncentrációjú oldatokból, a vizsgálandó mintából illetve a vakpróbának megfelelő desztillált vízből is 10- 10 cm³-t kristályosító csészébe pipettáztunk és előkészítettük a vizsgálatra. A vizsgálandó mintához illetve a standard oldatokhoz és a vakpróbához 2 cm³ frissen készített Na-szalicilát oldatot adtunk, majd vízfürdőn szárazra pároltuk. A száraz maradékot lehűlés után 2 cm³ cc. H₂SO₄val átnedvesítettük. 10 perc várakozás után az oldatot kb. 60 cm³ desztillált vízzel óvatosan hígítottuk, majd a bepárló csésze tartalmát 100 cm³-es mérőlombikba mostuk. A mérőlombikba 14 cm³ 400g/dm³-es NaOH oldatot adtunk. A lombik tartalmát lehűtöttük és desztillált vízzel jelig töltöttük. 20 perc múlva, de legkésőbb 1 órán belül fotometráltunk 405 nm hullámhosszon. A kalibrálást a vakpróbával végeztük.

A nitrit ionok ecetsavas, savanyú közegben szulfanilsavval és α-naftilaminnal (Gries – Ilosvay reagens) ibolyásvörös színű vegyületet hoznak létre. Az ecetsav által szabaddá tett salétromossav (HNO₂) a szulfanilsavat diazotálja és a keletkező diazóniumsó a jelenlévő αnaftilaminnal piros azofestékké kapcsolódik. A reakció rendkívül érzékeny, és szelektív. Elsőnek a kalibrációs sorozatot készítettük el. Az 50 cm³-es mérőlombikokba a törzsoldatból bemértünk 0; 1; 2; 5; 10; és 20 cm3-t, hozzáadtunk 1 cm3 szulfanilsav oldatot, majd 2 perc elteltével 1 cm³ α-naftil-amin oldatot és 1 cm³ nátriumacetát oldatot. A lombikot desztillált vízzel jelig töltöttük és homogenizáltuk. Az oldatokat 20 perc elteltével fotometrálhattuk 530 nm-es hullámhosszon. A vizsgálandó mintából 10 cm3-t az 50 cm3-es mérőlombikba pipettáztunk, hozzáadtunk 1 cm³ szulfanilsav oldatot, majd kb. 2 perc elteltével 1 cm³ αnaftil-amin oldatot és 1 cm³ nátriumacetát oldatot. A lombikot desztillált vízzel jelig töltöttük és homogenizáltuk. Az oldatot 20 perc elteltével, (a kalibráló oldatok mérése után) de maximum 1 órán belül fotometrálhattuk 530 nm-es hullámhosszon. Elkészítettük a kalibrációs görbét, és a mért abszorpcióból a kalibrációs görbe segítségével meghatároztuk a hígított ismeretlen mintában a nitrit koncentrációját. Az összes szervetlen nitrogén mennyiséget az ammóniumion, a nitrátion és a nitrition mennyiségéből kalkuláltuk.

A reaktív foszfáttartalom meghatározásának elve, hogy az ortofoszfát-ionok a molibdenát-ionokkal reagálva foszformolibdenát komplexet képeznek, amelyek kénsavas közegben kék színű vegyületté redukálódnak. A redukálószer az aszkorbinsav, a reakció katalizátora pedig a kálium-antimonil-tartarát. Az oldat színintenzitása arányos az ortofoszfátionok koncentrációjával, amely spektrofotométerrel mérhető. A mérés során 0,005 mg/ml-es foszfát törzsoldatból 50 ml-es mérőlombikba pipettáztunk 1; 2; 5; 10; 20,0 ml-t, majd desztillált kiegészítettük és homogenizáltuk. Így vízzel jelig а következő foszfátkoncentrációjú oldatsorozatot kaptuk: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 mg/l. Ezután egy 100 ml-es Erlenmeyer lombikba mértünk ki 50 ml szűrt vízmintát, és hozzáadtunk 10 ml keverék reagenst, és a mintát erőteljesen összekevertük. A mintával egyidejűleg reagens-vakot is készítettünk. Ez esetben 50 ml desztillált vizet mértünk ki és ehhez adagoltuk a reagenskeveréket. A reagens hozzáadását követő 10 perc elteltével, de legkésőbb 30 percen belül mértük meg a minta fényelnyelését a vakkal szemben 710 nm hullámhosszon.

A teljes szerves széntartalom (TOC) és az oldott szerves szén (DOC) meghatározását Elemntar High analizátorral végeztük. A szervetlen résztől megtisztított minta égetőtérbe kerül, ahol 1050 C-on elég és oxidálódik. A keletkezett szén-dioxid egy több csatornás IR (infravörös)-detektoron átáramlik, a számítógép szoftvere segítségével a mért jel integrálját a tárolt és előzetesen ellenőrzött kalibrációs görbék felhasználásával a megfelelő koncentráció értékre alakítja át. Az eredményeket mg/kg szárazanyag tartalomban kifejezve adja meg.

3.5. 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 fagyatás-olvasztásos módszerrel, majd ezt követi a minták centrifugálása. A centrifugálás során egy alsó és egy felső fázis jön létre, ez 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 teszttel dolgoztunk, amelyet mikrotiter-lemezen hajtottuk végre. A mikrotiter-lemezen alkalmazott növényteszt kiküszöböli a már hagyományos és eddigiekben alkalmazott növényteszt azon hibáját, hogy a kimutatandó célkomponensen kívül a mustárnövények egymásra gyakorolt hatásával is számolni kelljen.

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.

3.6. Mikrocisztin tisztítás

A -20°C-on tárolt sejtüledéket háromszori fagyasztás-olvasztás után egy főzőpohárban 80% metanollal (1:3 tömeg-térfogat) egy éjszakán át 4°C-on mágneses keverővel kevertettük. A sejteket és a metanolos felülúszót 8000 rpm-en 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük és a maradék sejteket még kétszer 150 ml metanollal átmostuk, centrifugáltuk és a többi felülúszóhoz öntöttük. 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 anyagokat 50-80 db 7-8 ml-es frakciókba gyűjtöttük, frakciószedő (Frac-300, Pharmacia Fine Chemicals) segítségével. A frakciók hatását a növények növekedésének gátlásában a fentiekben említett 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.

3.7. Mikrocisztin formák azonosítása

MALDI-TOF MS analízis

A vizsgálatunk során MALDI-TOF MS analízist pozitív-ion módban Bruker Biflex MALDI-TOF tömegspektrométerrel folytattuk le. A műszer kalibrálását malto-oligoszacharid [M+Na]⁺ csúcsaival végeztük el (m/z: 527.15, 689.21, 851.26, 1013.31 and 1175.36). A MALDI-TOF analízis során a jó lézer-abszorpcióval rendelkező, kis molekulatömegű szerves 2,5-dihydroxybenzoesav (DHB) anyagot használtunk. A liofilezett analizálandó mintát vízben oldottuk. A DHB mátrix 0,5 ml etanol:víz (1:1/v:v) elegyében 10 mg DHB-t tartalmazott, az így létrejött oldat jól elegyedett a minta oldószerével. A két oldat összekeverése után a minta és mátrix keverékét úgy vittük fel, hogy a feloldáshoz szükséges oldószerek elpárolgása után a mátrix homogén"szilárd oldatot" hozott létre. A 0,5 µl mátrix oldatot 0,5 µl mintával szobahőmérsékleten szárítottuk be.

A rövid ideig alkalmazott, nagy intenzitású lézerimpulzust nitrogén lézerrel hoztuk létre, amely a minta deszorpcióját és ionizációját váltotta ki. A nagy energiájú impulzus következtében a mátrix elnyeli a ráeső lézer fotonok egy részét, ami gyors rezgést okoz, ezzel helyileg szétrázza a szilárd fázist. Így semleges és gerjesztett mátrix molekulával körülvett klaszterek képződnek, a klaszterekből a mátrix molekulák elpárolognak, magukra hagyva a gerjesztett minta molekulákat. A minta molekulák ionizálódnak a fotolitikusan gerjesztett mátrix okozta kationizációval, ami $[M+X]^+$ (X=H, Li, K, Na) molekulaion szerkezetek

képződéséhez vezet. Természetesen negatív ionok képződése is lehetséges, a minta molekulák deprotonálódása során. A minta ionizációját befolyásolni lehet, hogy ha megfelelően kiválasztott kationizáló ágenst keverünk a mintához.

A létrejött ionok erős elektromos térben felgyorsulnak és a repülési csőben a repülési idéjük alapján szétválnak, majd elérik a detektort. A repülési idő egyszerű matematikai összefüggés segítségével átalakítható tömeg/töltés (m/z) aránnyá, így egy klasszikus tömegspektrumhoz jutunk. A spektrumot 2,5-dihydroxybenzoesav (DHB) mátrixban vettük föl. Az identifikált mintánk báziscsúcsa az [M+H]⁺ csúcs volt (Vasas és mtsai., 2006; 2013). A MALDI-TOF analíziseket a DE TTK Szervetlen- és Analitikai Kémiai Tanszéken végeztük.

NMR analízis

A mágneses magrezonancia jelenségén alapuló kémiai szerkezetvizsgálati módszer, a mágneses magrezonancia spektroszkópia (angolul nuclear magnetic resonance = NMR). Az atommagok mágneses momemtummal, spinnel rendelkeznek. Mágneses térben különböző frekvenciájú elektromágneses sugárzást bocsátunk az atommagokra, és azt észleljük, hogy a vizsgált mag csak egyetlen meghatározott frekvenciakomponenst képes elnyelni. Tehát minden egyes atommag, minden izotóp adott mágneses térben csak egyetlenegy frekvenciakomponenst nyel el. A megfelelő energiaelnyelési maximumok alkotják az NMR-spektrumot. Az NMR spektrum jellemzője a kémiai eltolódás, mely során az NMR-spektumjelek frekvenciája a kémiai környezettől, azaz a molekulaszerkezettől függ.

Az NMR-spektrumoknak finomszerkezete van, amit a spinek kölcsönhatásával, úgynevezett csatolásával magyarázhatunk. A spektrumban a spin-spin csatolás abban nyilvánul meg, hogy a kölcsönhatásban lévő atommagok felhasadást okoznak egymás spektrumában. A kémiai eltolódásokat és a spin-spin csatolásokat elemezve az NMRspektrumból meghatározható a vizsgált anyag molekuláinak szerkezeti képlete.

A toxinok szerkezetének meghatározáshoz szükséges ¹H ¹³C NMR-vizsgálatokat Bruker DRX-500 műszerrel 500.13/125.79 MHz-en végeztük. 1D ¹H-NMR spektrum felvétele deuterált vízben (D₂O), 298K hőmérsékleten történt Shigemi küvettában (250 μl). A kétdimenziós HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) spektrum identikus ¹H/¹³C eredményét irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze (Vasas és mtsai., 2013). Az NRM méréseket a DE TTK Szerves Kémiai Tanszéken hajtottuk végre.

Kapilláris elektroforézis (CE)

A micelláris elektrokinetikus kromatográfiát (MEKC) PrinCe-700-as CE készülékkel hajtottuk végre. A pufferedényeket poliimiddel borított szilika kapillárissal kapcsoltuk össze (Supelco; 48.5 cm × 50 μ m, tényleges hossz: 40 cm). A CE elektrolit 25 mM nátrium tetraborátot (pH 9.1) és 100 mM SDS-t tartalmazott. Az elektrolitot és az analizált mintáinkat, Millipore Ultrafree Polysulfone membránnal (UFP1 THK24) szűrtük és 10 percig ultrahangos kezeléssel gázmentesítettük a mérés elvégzése előtt (Vasas és mtsai., 2006).

A mérés első lépéseként a bemeneti pufferedényt kicseréltük a mintát tartalmazó edényre. Második lépésként mintabevitelt hajtottuk végre hidrodinamikus módszerrel (100 mbar/s). Következő lépésként visszahelyeztük a bementi pufferedényt és végül az elválasztáshoz 25 kV feszültséget használtunk. Ezt követően a minta elváló komponenseinek zónái miután elérték az optikai ablakot, végrehajtottuk a spektrometriás detektálást. A detektálást 270 nm-en diódasoros detektorral végeztük el. Az elektroferogramok rögzítése és kiértékelése ChemStation 7.01 (Hewlett-Packard) szoftverrel történt.

3.8. Toxingének detektálása

DNS izolálás

A toxingének vizsgálatához szükséges DNS-t terepi és liofilizált mintákból nyertük ki. A DNS tisztítást fenol-kloroform módszerrel végeztük el. A mintákat folyékony nitrogén felhasználásával, fagyasztás-olvasztás technikával homogenizáltuk. A homogenizált mintákhoz 300 µl DNS-kivonó puffert adtunk, majd ezután két órás inkubálás következett. Inkubálás után 5 percig centrifugáltuk a mintákat (13000 rpm) és a vizes fázishoz 300µl TE telített fenolt pipettáztunk, néhány percig kevertettük, majd 5 percig laborhőmérsékleten állni hagytuk, majd újabb kevertetés után újból centrifugáltuk a mintát. Az előző folyamatot kétszer még megismételtük és végül a felülúszó vizes fázishoz 1:1 térfogatarányban kloroformot adtunk, majd 10 perig centrifugáltuk (13000 rpm, 4 °C-on). Az újabb felülúszó vizes fázishoz tized térfogatú nátrium-acetátot és tized térfogatú izopropanolt adtunk, az így kapott oldatot 10 percig jégen inkubáltuk. Ezután rövid centrifugálás következett (10000 rpm) és a vizes fázishoz háromszoros térfogatú 96%-os hideg etanolt öntöttünk és legalább 1 órán át -20 °C-on tartottuk az oldatot. Eztután 20 perc centrifugálás (15000 rpm 4 °C-on) következett és a kiváló nukleinsav csapadékot 300 µl 75%-os hideg etanollal mostuk, majd vákuumban megszárítottuk. A kinyert minta DNS spektrumát és koncentrációját Schimadzu UV1601 spektrofotométer segítségével határoztuk meg (1 $OD_{260} = 50 \ \mu l$ kettős szálú DNS/ml). Az ismert koncentrációjú DNS mintákat steril bidesztillált DN-áz mentes vízben oldottuk fel és felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A BGSD-500 törzs filogenetikai vizsgálatát az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén végeztük el Dr. Felföldi Tamás irányításával.

PCR analízis

A polimeráz láncreakció (PCR) segítségével vizsgálandó nukleinsav mintát in vitro körülmények között szaporíthatjuk fel (amplifikálhatjuk). Ez azért alapvető jelentőségű, mert a vizsgálatokhoz sok esetben nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű kiindulási anyag. A PCR analízis során a kettős szálú DNS-t magas hőmérsékletre hevítik, hogy a szálak szétváljanak. Ebben a denaturálásnak hívott lépésben a két DNS-szálat összekötő hidrogénkötések felbomlanak. A DNS-szálak szeparálása után a hőmérsékletet csökkentik, úgyhogy a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS-szálakhoz. Ezt a lépést annealing vagy kapcsolódási lépésnek nevezik. Végül a DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó szálat. A munkát a kapcsolódott primernél kezdi, és végigmegy a DNS-szálon. A lépés neve meghosszabbítás, ami szintetizálás alatt álló nukleinsavszál meghosszabbítására utal. A ciklus megismétlődése során a polimeráz enzim az újonnan szintetizált szálakat is templátként használja, ezért a termékek száma exponenciálisan növekszik.

A PCR reakciók beállításánál különböző hőprogramokat alkalmaztunk, amelyeket a 1. számú függelékben tüntettem fel. Az 1. táblázat foglalja össze azon primerpárokat, amelyekkel a mikrocisztin termeléséért felelős génklaszter meglétét vizsgáltuk a *Microcystis* és a *Planktothrix* fajokban. A *P. rubescens* teljes mcy génklaszterének vizsgálatához 2 kb hosszúságú szakaszokat lefedő primerpárokat használtunk (2. függelék). A *P. rubescens* teljes génklaszterének vizsgálata során feltárt 2 kb-tól eltérő szakaszokat, 500 bp hosszúságú PCR terméket adó primerpárok (Christiansen és mtsai., 2006) segítségével vizsgáltuk tovább (3. függelék). Az PCR reakciók során létrejött termékeket agaróz gélelektroforézis technikával választottuk szét. Az eredmények kiértékelését követően a kiválasztott egyes szakaszok szekvenálást a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte el. Ezután BLAST analízissel azonosítottuk a szekvenciákat.

1. táblázat *Microcystis sp.* specifikus (*mcyA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *G*) és *Planktothrix sp.* specifikus (*mcyA*, *HA*, *CJ*, *B*, *EG*, *E*, *T*, *TD*) mikrocisztin termelésért felelős gének primerpárjai (Mbedi és mtsai., 2005; Ouahid és Campo., 2009).

Cánalz	Drimorraór	Szekvencia	Annealing	Méret
Genek	Primerpai	5'→3'	hőmérséklet (°C)	(bp)
mcyA	MSF	ATCCAGCAGTTGAGCAAGC	17	1300
	MSR	TGCAGATAACTCCGCAGTTG	47	
тсуВ	2156-F	ATCACTTCAATCTAACGACT	52	055
	3111-R	AGTTGCTGCTGTAAGAAA	52	955
mcyC	PSCF1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG	52	674
	PSCR1	CCGACAACATCACAAAGGC	52	074
mevD1	PKDF1	GACGCTCAAATGATGAAAC	52	617
mcyD1	PKDR1	GCAACCGATAAAAACTCCC	52	047
menD2	PKDF2	AGTTATTCTCCTCAAGCC	52	850
mcyD2	PKDR2	CATTCGTTCCACTAAATCC	52	0.59
meyE	PKEF1	CGCAAACCCGATTTACAG	52	755
mcyE	PKER1	CCCCTACCATCTTCATCTTC	52	733
manG	PKGF1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC	52	425
mcyG	PKGR1	AATCGCTAAAACGCCACC	52	
mar	mcyA.fw	ATGTCACCTATTGGGCTTGC	57	839
тсуА	mcyA.rev	TCGATTCCCCTAAGTGATGC	57	
movHA	mcyHA.fw	TTAGATGAAGCCACCAGTGC	57	540
mcyIIA	mcyHA.rev	GATTAAAAATTGAATAGCTGCTAGG	57	
mevCI	mcyCJ.fw	TTGGATACAAGCGACAAAAGG	57	524
meyes	mcyCJ.rev	TCTCCAGCTTGAAGTTCTGC	57	524
meyR	mcyB.fw	ATTACAGCAGAGAAAATCCAAGCA	59	555
meyb	mcyB.rev	TCGCAATAGCGGGATCA		555
menEG	mcyEG.fw	GAATTCATTTTTGTTGAGGAAGG	50	775
mcyEG	mcyEG.rev	AGAAAACAAGCCCAGAGTGC	39	(642)
mcyE	mcyE.fw	TTACCTAATTATCCCTTTCAAAG	18	589
	mcyE.rev	CAATGGGTAAGGTTTGCTT	40	
тсуТ	mcyT.fw	CCCAATCTAACCCCAACTGC	55	747
	mcyT.rev	CAATAGCGATTTTCCCAAGC		, , ,
	mcyTD.fw	ATCCGCCCATACTGTGACC	59	763
mcyTD	mcyTD.rev	GATTTTGCCCGGTTTACTCC		(1300)

4. Eredmények

4.1. A *Microcystis aeruginosa* toxicitásának és toxinvariabilitásának vizsgálata

Az öt éves periódus alatt Magyarország különböző víztereiben 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. Az IC₅₀ 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 IC₅₀ érték sem volt meghatározható. Ennek ellenére az előbbi mintában CE méréssel nagyon alacsony MC koncentrációt detektáltunk.

A legtoxikusabb minta IC_{50} érték 245 µgmL⁻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 volt olyan, ahol öt variánst is ki tudtunk mutatni. A *M. aeruginosa* toxicitásának és toxin variablitásának eredményeit a 2. táblázat foglalja össze.

2.	táblázat Microcystis	aeruginosa	vízvirágzások eredmény	ei
----	----------------------	------------	------------------------	----

Minták származási	Fai	MC koncentráció	IC ₅₀	MC variánsok	men gának	
helyei	Гај	$(mg mL^{-1})$	(µg mL ¹)	IVIC Variansok	mcy genek	
Velence	Microcystis aeruginosa	3,342	1134	MC-LR, -YR, -WR	mcyA, mcyB, mcyC, mcyD1, mcyD2, mcyE, mcyG	
Bárdos	Microcystis aeruginosa	15,701	245	[Dha ⁷] MC-RR, MC-RR, -WR	mcyA, mcyB, mcyC, mcyD1, mcyD2, mcyE, mcyG	
Nagycsécs	Microcystis aeruginosa	0,801	1522	MC-LL, -LR, -RR	mcyB, mcyD1, mcyE, mcyG	
Kis-Balaton (3T)	Microcystis aeruginosa	3,911	1044	[Asp ³] MC-LR, MC-LR, [Dha ⁷] MC-RR, MC-RR, -YR	mcyB, mcyD1, mcyE, mcyG	
Ónod	Microcystis aeruginosa	0,05	>3000	[Dha ⁷] MC-FR	mcyB, mcyE, mcyG	
Békés	Microcystis aeruginosa	3,724	654	MC-WR	mcyB, mcyC, mcyD1, mcyD2, mcyE, mcyG	
Balaton	Microcystis aeruginosa	2,843	934	MC-LR, -RR	mcyB, mcyG	
Gyula	Microcystis aeruginosa	2,111	1100	[Dha ⁷] MC-RR, MC-LR, - RR, -YR, -WR	mcyB, mcyD1, mcyE	
Doboz	Microcystis aeruginosa	0,902	1454	MC-LF, -LR	mcyC, mcyD1, mcyE, mcyG	
Kis-Balaton (2T)	Microcystis aeruginosa	4,238	839	[Dha ⁷] MC-RR, MC-LR, - RR, -YR	mcyB, mcyC, mcyD1, mcyD2, mcyE, mcyG	

A mintákból kinyert DNS-ek PCR vizsgálata, mind a 10 minta esetében pozitív eredményt adott legalább két *mcy* gén meglétére az elvégzett PCR reakciók során, ezzel jelezve a gének részvételét a MC termelésében. A Bárdos-tóból gyűjtött mintánál az összes *mcy* gént sikerült kimutatni (9. ábra).



9. ábra. Bárdos-tóból gyűjtött *Microcystis* sejtekből származó *mcy* génklaszter génjeinek PCR termékei

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

A begyűjtött minták vizsgálata során 4 mintában a *P. agardhii* tömeges elszaporodását figyeltük meg. A minták toxicitását és toxin variabilitását a fentiekben leírt módszerekkel hajtottuk végre.

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 méréssel nagyon alacsony MC koncentrációkat detektáltunk.

A legtoxikusabb mintát a Bivalyos-tóból gyűjtöttük (Gyula), amelynél az IC₅₀ érték 916 μg mL⁻¹ volt. Összesen 3 különböző MC variánst azonosítottunk a 4 minta esetében, amelyek a következőek 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.

A *P. agardhii* faj toxicitásának és toxin-variablitásának eredményeit a 3. táblázat foglalja össze.

Minták származási helyei	Faj	MC koncentráció (mg mL ⁻¹)	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)	Mikrocisztin formák	MCY gének
Várpalota	Planktothrix agardhii	3,227	916	[Asp ³] MC-LR, [Asp ³ , Dha ⁷] MC- RR, [Dha ⁷] MC-RR	mcyA, mcyB, mcyCJ, mcyE, mcy EG, mcyHA, mcyT, mcyTD
Gyula	Planktothrix agardhii	0,02	>3000	[Asp ³] MC-LR	mcyA, mcyB, mcyE, mcy EG, mcyHA, mcyT, mcyTD
Hajdúhadház	Planktothrix agardhii	0,012	>3000	[Asp ³] MC-LR	mcyA, mcyB, mcy EG, mcyT, mcyTD
Kis-Balaton (4T)	Planktothrix agardhii	0,01	>3000	-	тсуТ

3. táblázat Planktothrix agardhii vízvirágzások eredményei

A PCR vizsgálat mind a 4 minta esetében pozitív eredményt adott legalább egy *mcy* gén meglétére. A Bivalyos-tóbólgyűjtött mintánál az összes *mcy* gént sikerült detektálni (10. ábra).



10. ábra Bivalyos tóból gyűjtött *Planktothrix* sejtekből származó mcy génklaszter génjeinek PCR termékei

A *mcy* géneket hordozó mintákban CE módszerrel detektálható mikrocisztin mennyiséget, a MALDI-TOF MS módszerrel pedig legalább egy mikrocisztin kemotípust tudtunk kimutatni. Egyetlen egy kivétel volt a Kis-Balatonból (4T) származó minta, ahol felelhető volt egy *mcy* gén (*mcy*T), de nem tudtunk kimutatni mikrocisztint MALDI-TOF MS módszerrel.

4.3 A Planktothrix rubescens vízvirágzásának vizsgálata

A Kocka-tó fizikokémia jellemzői

A *P. rubescens* megjelenése és tömeges előfordulása nem nevezhető szokványos jelenségnek hazánkban. Ahogyan bemutattuk, a faj elsősorban valódi rétegzett tavakban szokott tömegesen megjelenni, Európában leginkább az alpesi országok víztereinek jellemző toxintermelő cianobaktérium faja. A vízminták analízise közepes fajlagos vezetőképességet és enyhe lúgos pH-t mutatott. A szirmabesenyői Kocka-tó néhány fizikokémiai jellemzőjét az 4. táblázatban foglaltuk össze.

változó	érték	mértékegység
terület	5,2	(Ha)
átlagos mélység	3,2	(m)
maximális mélység	7	(m)
víztérfogat	1,6×10 ⁵	(m ³)
Secchi átlátszóság	1,2	(m)
рН	8,34	
fajlagos vezetőképesség	820	(µS cm)
COD _(sMn)	15,8	$(mg L^{-1})$
TOC	22,0	$(mg L^{-1})$
DOC	15,8	$(mg L^{-1})$
szervetlen nitrogén (IN)	1953	$(\mu g L^{-1})$
reaktív oldott foszfor (SRP)	3	$(\mu g L^{-1})$
totál nitrogén (TN)	3125	(µg L ⁻¹)
totál foszfor (TP)	370	$(\mu g L^{-1})$

4. táblázat. Néhány jellemző fizikai-kémiai változó a Kocka-tóban a *P. rubescens* tömeges megjelenése idején

A vizsgált kavicsbányató legnagyobb mélysége csupán 7 m, viszont a tó vízszintjét 3-4 méteres meredek part veszi körül, védve ezzel többek között a széltől, a felkavarodástól. Ez lehetővé teszi a tartós rétegződést és a stabil metalimnion kialakulását, ami kedvez a *P. rubescens* elszaporodásának. A vízben mért alacsony foszfor- és magas nitrogénformák koncentrációja - ahogyan több alpesi víztérben is megfigyelték -, szintén kedvező feltételeket teremt a faj megjelenésének (Vasas és mtsai., 2013)

A Planktothrix rubescens morfológiai azonosítása

A Kocka-tó felszínén megjelenő vörös színű virágzás (11. ábra) domináns fajának molekuláris azonosítását megelőzte az összegyűjtött minták fénymikroszkópos vizsgálata. A vörös színű trichomák (11. ábra) egyenes köpeny nélküliek voltak. A fonalakat hengeres alakú, főleg azonos nagyságú 6-8 μm-es átmérőjű sejtek alkották, amelyek keresztfalainál nem volt látható összeszűkülés. Az egyforma nagy alakú sejtek után jelentősen kisebb sejteket (3-4 μm) figyeltünk meg. Az összes sejtben felfedezhetőek voltak gázvezikulumok és granulumok. A legtöbb fonal lekerekített sejttel végződött, ezen sejtek falai nem voltak megvastagodva. Ezen morfológiai vonások alapján azonosítottuk a *Plantothrix rubescens*t.



11. ábra *Planktothrix rubescens* virágzása a Kocka-tóban és a *Planktothrix rubescens* trichomáinak mikroszkópos felvétele

A Planktothrix rubescens molekuláris filogenetikai analízise

A BGSD-500 törzs DNS-ének két szakaszát a riboszómális RNS kis alegységének 16S rRNS génjét és a fikocianin operon cpcBA-IGS génjét vizsgáltuk, hogy megerősítsük morfológiai meghatározásunkat.

A szekvencia analízis a BGSD-500 törzs 16S rRNS génjének 1387 db és a cpcBA-IGS génjének 527 db nukleotid bázissorrendjének szekvenálását eredményezte. A két génre kapott szekvenciákat összehasonlítottuk az adatbázisban szereplő adatokkal.

A BGSD-500 törzs 16S rRNS génjének szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutatott (99,9%-100%) az adatbázisban szereplő *P. rubescens* NIVA-CYA 18 (=PCC 7821)^T 16S rRNS génjének bázissorrendjével, és így elvál attól a klasztertől, amelyhez *P. agardhii* NIES 204^T törzs kötődik (12. ábra).

A BGSD-500 törzs cpcBA-IGS génjének szekvencia analízise 100%-os hasonlóságot mutatott azzal a klaszterrel, amely főleg *P. rubescens* törzseket tartalmazott (12. ábra). Az adatbázisban csak 217 nukletidból álló régió volt elérhető a cpcBA-IGS gén azonosításához, amely az előbb említett *P. rubescens* NIVA-CYA 18 (=PCC 7821)^T(GenBank Acc. No. AJ558154) törzsből származott. A filogenetikai vizsgálatokat az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén végeztük el Dr. Felföldi Tamás irányításával.



12. ábra Maximum likelihood (legnagyobb valószínűség) módszerrel készített fa mutatja a BGSD-500 törzsa 16S rRNS génre (A) és a fikocianin operonra (B) alapozott filogenetikai pozícióját

A mikrocisztin azonosítása és analízise terepi virágzási mintákból

A Kocka-tóból gyűjtött terepi vízvirágzás nyers kivonatának toxicitását először csíranövény teszttel vizsgáltuk (13. ábra). A csíranövény teszt segítségével határoztuk meg az IC_{50} értéket a terepi mintánál, amely 0,97 mg mL⁻¹volt.



13. ábra *P. rubescens* és BGSD-500 törzs nyers kivonatának hatása a mustármagok növekedésére

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.



14. ábra Terepi Р. rubescensből származó [D-Asp³, $Mdha^7$] MC-RR-nek a DEAE kromatográfiája és a csíranövény 239 nm-en tesztje. mért fényelnyelés (-o-); három napos mustármagok hipokotil hossza (---); NaCl oldat koncentrációját 0 és 0,2 M között az 5mM Tris-HCl pufferben (---).

A HPLC tisztítás során kinyert tiszta anyag szerkezetét MALDI-TOF MS és NMR szerkezetvizsgálati módszerekkel határoztuk meg. A MALDI-TOF analízis során a toxin molekulaion báziscsúcsa 1024,6 m/z értéknél vette fel a maximumot. A toxin felépítésében résztvevő aminosavakat (Ala¹, Arg², Asp³, Arg⁴, Adda⁵, Glu⁶, Mdha⁷) ionizációt követő fragmentációs MALDI analízissel erősítettük meg. Az N-metil-dehidroalanin kapcsolódását és térszerkezetét TOCSY és NOESY spektrummal határoztuk meg az NRM analízisek során. Fő toxinként [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR formát azonosítottuk (15. ábra).



15. ábra *Planktothrix rubescensből* azonosított [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR kémiai szerkezete

A fő toxin mellett még két anabaenopeptin variánst (B, m/z: 837 és F, m/z: 851) azonosítottunk az ionizációt követő fragmentációs MALDI-TOF analízissel. Ezt követően kapilláris elektroforézis módszerrel megmértük a minta [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR koncentrációját. A MC mennyiség a terepi mintában 8,57 mg g⁻¹ volt (16. ábra).



16. ábra P. rubescens terepi minta és az izolált BGSD-500 törzs kapilláris elektroforézisének eredménye. A fekete nyíl jelzi [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR csúcsot.

A terepi mintából kinyert DNS PCR vizsgálata, mind a nyolc *mcy* gén meglétére pozitív eredményt adott (17. ábra), ami alátámasztja ezen részek részvételét a MC termelésben.



17. ábra P. rubescens terepi minta génklasztere

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 (13. ábra), 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, amit szintén a CE módszerrel mértünk meg. 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 (18. ábra), ez az eredmény nem magyarázza meg a toxincsökkenést.



18. ábra BGSD-500 törzs génklasztere

A toxincsökkenés magyarázatáért a génklaszter további genetikai vizsgálata vált szükségessé.

A BGSD-500 törzs mcy génklaszterének analízise

Ahogyan részletesen bemutattuk, a környezeti feltételek megváltoztathatják a toxintermelés mértékét, de a legmeghatározóbb a vízvirágzást alkotó egyedek genetikai háttere, variabilitása. Tehát fontos a toxintermelő és nem toxintermelő, valamint a bizonyos mértékig termelő egyedek aránya a populációban, ami meghatározza az algavirágzás toxintartalmát. Jelen esetünkben egy olyan termelő szervezetet izoláltunk, amelynek kapcsán joggal merült fel a kérdés, hogy a toxintermelésért felelős klaszter teljesen épen jelen van-e a BGSD-500 törzsben.

A BGSD-500 törzs DNS teljes *mcy* génklaszterének vizsgálatához legelsőnek 28 olyan primerpárt alkalmaztunk (2. függelék), amelyek páronként 2 kb szakaszt adnak, így lefedve az 55 kb hosszúságú klasztert. A PCR analízist követően az 1, 11, 12, 27, 28 számú primerpárok esetében nem kaptunk pozitív jelet. A 2 kb-tól eltérő szakaszokat 500 bp-t átfogó primerek segítségével vizsgáltuk tovább (3. függelék). 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 pozícióban a 11-es számú primer által lefedett 23612-24003 nt szakaszon találtunk a vártnál kisebb terméket, a deléció (19. ábra) a mcyE és mcyG gének közötti spacer régióban lokalizálódott.



 ábra BGSD-500 törzs deléciójának elhelyezkedése. A piros nyíl mutatja a deléció meglétét.

A deléció mellett egy inszerciós szekvenciát azonosítottunk a klaszter 925-1399 nt szakaszán, amikor a 3-as primerpárt használtuk (20. ábra). Az inszerciós szekvencia a *mcyT* és *mcyD* gének közötti spacer régióban helyezkedett el.



20. ábra BGSD-500 törzs inszerciójának elhelyezkedése. A piros nyíl mutatja az inszerció meglétét

Az inszerciós régiónk hosszát szekvenálással 1606 nt hosszúnak állapítottuk meg. Ezt követően az inszerciós szekvenciát BLAST analízisnek vetettük alá. Az inszerciós szekvenciánk egynegyed hosszán 98%-os szekvencia azonosságot ("megablast") mutatott a *P. rubescens* és a *P. agardhii* mikrocisztin szintézisében szerepet játszó tioészteráz (*mcy*T) génnel. A szekvencia összehasonlítás a referenciát szolgáló *P. agardhii mcy* génklaszterrel (GenBank leltári szám: AJ441056) kimutatta, hogy az inszerciós régió egy 334 nt hosszúságú szakaszának szekvenciája 98%-ban azonos a *mcy*T gén 960-1293 pozíciójában található szakasszal. A 334 nt szakaszt egy kb. 1,2 kb hosszúságú, a *mcy* klaszterben nem fellelhető rész követi, amelyet egy 80 nt hosszúságú szakasz zár le. Ez a szakasz a *mcy*T gén 1299-1378 pozíciójában lévő szakasszal 98%-os szekvencia azonosságot mutatott. Tehát a *mcy*T génbe egy 1194 kb hosszúságú szakasz ékelődött be (21. ábra).



21. ábra Inszerciós elem elhelyezkedése a *Planktothrix mcy* génklaszter mcyT és mcyD génei közötti spacer régióban

Az inszerciós szekvenciánk BLAST analízisénél először a nagyon hasonló szekvenciák ("megablast") keresését állítottuk be. A keresés azonban nem hozott eredményt, a program nem talált az inszerciós szekvenciánkkal szignifikánsan megegyező szekvenciát.

Ezt követően a megismételt BLAST analízisnél a némileg hasonló szekvencia keresését ("blastn") választottuk a vizsgálatához, amely két eredményt adott.

Első esetben a szekvenciák 87%-a a *Synechococcussp*. (PCC 7002 törzs, GenBank leltári száma: CP000951) hipotetikus fehérjéjét kódoló génszakaszával mutatott 77%-os azonosságot. Második esetben két részben is 74%-os szekvencia azonosság volt megfigyelhető az inszerciónk 75%-os hosszúságra nézve. Az első részben a *Synechococcus sp*. (PCC 6312 törzs, GenBank leltári száma: CP003558) jelátvitelében szerepet játszó hisztidin kinázzal, míg a második részben pedig a tRNS(Ile)-lizidin szintetázzal volt hasonló az inszerciónk. További hasonlóságot nem találtunk az inszerciós elemünkkel.

Ezután az inszerciónk szekvenciáját összevetettük a *Synechococcus sp.* (PCC 7002 törzs, GenBank leltári száma: CP000951) teljes genomjával mVISTA adatbázis segítségével, ahol a lehetséges beállítások közül az összehasonlításhoz a LAGAN algoritmust használtuk. Az összehasonlítás során azonosítottunk a *Synechococcus sp.* genomjában egy olyan hasonló szakaszt (pozíciója: 865,589-867,245 nt), amely az inszerciónkkal potenciálisan homológ volt. Ez a régió tartalmazott a 3' végnél 65 nt *icd* génrészletet, amelynek terméke a NADP függő izocitrát-dehidrogenáz. A régió teljes egész hosszára két hipotetikus fehérjét és az 5' végnél 44 nt petD génszakaszt detektáltunk, ami cytb6/f komplex termeléséért felelős.

5. Eredmények megbeszélése

Nemzetközi eredményekkel való összevetés

A mikrocisztinek termelését, megjelenését intenzíven tanulmányozták az elmúlt évtizedekben, hiszen az egyik legerősebb és leggyakrabban előforduló cianobakteriális toxin az édesvizekben. A világ számos országában a cianobaktériumok tömeges előfordulása és toxin termelése a vízi élőlénycsoportokon kívül sok esetben az emberre nézve is kedvezőtlen. A következő néhány oldalon keresztül kívánom bemutatni Európa több országában jelentkező cianobaktérium virágzások jellemzőit, melynek segítségével kaphatunk egy képet arról, hogy hol milyen fajok domináltak, milyen MC formák fordultak elő nagyobb mennyiségben. Ezt követően a kutatásunk eredményét írom le és összevettem a szakirodalmi értékekkel.

A Franciaországban található Grand-Lieu-tóban 1994. május-október között cianobaktériumok tömeges elszaporodását figyelték meg. A mintákban a fő cianobaktérium faj a *Microcystis aeruginosa* és az *Anabaena circinalis* volt. A lefagyasztott mintákból mikrocisztinek jelenlétét mutatták ki. A toxinokat június és október között begyűjtött

mintákban mutatták ki. A fő MC formáknak a MC-LR és a [Dha⁷] MC-RR variánsok bizonyultak (Vezie és mtsai., 1998). A MC koncentrációk a virágzás során 0 és 5,06 mg g⁻¹ között változtak. Franciaországban a Bourget-tó a legnagyobb, amely az Alpokban fekszik. 1970-es és 1980-as évek alatt lezajló helyreállítási programok magukban hordozták tó tápanyagterhelésének és szennyezettségének a csökkentésére irányuló törekvéseket, ennek köszönhetően feljavult a vízminősége az utolsó két évtizedben. Ezt bizonyítja a nitrát/foszfát aránynak és a vízoszlop átlátszóságának a növekedése, valamint a teljes foszfortartalom és a klorofill a koncentrációnak a csökkenése (Jacquet és mtsai., 2005). Jól mutatja ezt, hogy az 1980-as és 2001-es évek közötti időszakban a legnagyobb nyugat európai tóban, a Genfi tóban 82 µg/L-ről 34 µg/L-re és Bourget-tóban pedig 120 µg/L-ről 26 µg/L-re csökkent le a foszfor tartalom. Azonban a jelentős foszfor koncentráció csökkenés ellenére 1996-ban megjelent a *Planktothrix rubescens* és ezt követően fenn ismaradt, hasonlóan más tavakban is (Zürichi- tó). 1999 és 2002 között vizsgálták a P. rubescens populáció dinamikáját és MC termelését. Magas MC koncentrációkat mértek minden évben augusztustól decemberig (maximum 6,7 µg L⁻¹). A tömegspektroszkópiás módszerrel két variánst a [D-Asp³] MC–RR és a [D-Asp³, Dhb⁷] MC–RR mutatták ki.

Hollandiában 2011. kora őszén az Amstelmeer-tóban *Microcystis aeruginusa* virágzást figyeltek meg. Vízvirágzás alatt több kutya is ivott a tó vízéből, melyet követően ebből három el is pusztult. A tóból származó cianobakteriális hab 5,27 mg g⁻¹ koncentrációban tartalmazott mikrocisztint. Az elpusztult kutyákban átlagosan 94 μ g g⁻¹ koncentrációban mutatták ki a mérgező toxint. Mindkét esetben a fő toxin a MC-LR variáns volt (Lürling és Faassen, 2013). Ez volt az első esett, hogy kutyákkal kapcsolatos mérgezésről számoltak be.

Románia területén Kolozsvár közelében két halastóban és egy kikapcsolódás céljából használt víztérben figyeltek meg virágzásokat. Míg a halastavakban tömegesen megjelenő faj a *Microcystis aeruginosa*, addig a rekreációs célokra használt tónál a *M. aeruginosa* mellett a *Mirocystis viridis* is megjelent domináns fajként. A mintákban MALDI-TOF analízissel több MC formát a MC–LR, –RR–YR–WR és két további oligopeptidet a cyanopeptolint és az aeruginosint azonosították (Boaru és mtsai., 2006). A mintákban a MC koncentrációk 0,19-2,875 mg g⁻¹ között változtak.

Szlovénia földrajzilag egy heterogén ország. Északon és északnyugaton található alpesi régiókban oligotróf természetes vizek találhatóak, ahol cianobaktériumok nem lelhetőek fel, ez alól kivételt képez a Bledi-tó. Szlovénia északkeleti részén a vízvirágzások gyakrabban fordulnak elő, mivel ezeken a területeken az intenzív mezőgazdasági

tevékenységeknek köszönhetően több eutróf víztér található. 1994-ben 10 vízvirágzást detektáltak. A vizsgálatok megállapították, hogy a leggyakoribb vízvirágzást okozó faj a *Microcystis aeruginosa* volt. Ezenkívül, még a szlovén tavakban a következő fajok okoztak vízvirágzást: *M. wesenbergii, P. rubescens, An. flos-aquae, Aph. flos- aquae*. A vizsgált tavak közül, egy, a Bledi-tó volt rétegzett, amelyben a domináns faj a *P. rubescens* volt. A *Microcystis* minták vizsgálata három MC típust mutatott ki: MC–RR, –LR és –YR (Sedmak és Kosi, 1997). A MC variánsok közül a leggyakoribb forma a MC-RR volt. A *P. rubescens* által okozott virágzásban a fő variáns [D-Asp³] MC–RRvolt (Grach-Pogrebinsky és mtsai., 2004).

Görögországban is jelentős problémákat okoznak a cianobaktérium virágzások. A cianobaktériumok tömeges előfordulásait 36 eltérő mélységű, méretű és trofikus szintű tóban, víztározóban vizsgálták. A mintavételek során megállapították, hogy a virágzások domináns fajai a *Microcystis aeruginosa* és az *Anabaena flos-aquae*. Az *Anabaena* faj csak a sekély, eutróf vizekben volt megfigyelhető. A minták több, mint 90%-ban kimutatták a mikrocisztinek jelenlétét, ami azt sugallja, hogy virágzás nélkül is jelen vannak a vizekben. A görög tavak fő MC variánsai a MC–RR, –LR és –YR voltak. A mikrocisztineken kívül más oligopeptidet is leírtak a minták vizsgálata során. Az anabaenopeptin A és B több mintában volt kimutattó, addig az anabaenopeptolide 90A peptidet csak a Mikri Prespa tóból származó mintában azonosították. A maximális MC tartalom 10 mg g⁻¹ volt, amit a Kastoria és Pamvotis tavakban mértek (Gkelis és mtsai., 2015).

Közép-Lengyelországban 8 víztérből 1996-2001 közti időszakban, a nyári hónapokban vízmintákat gyűjtöttek és analizálták ezeket. A minták domináns fajai a *Microcystis aeruginosa, Aphanizomenon flos-aquae*és *Nostocsp*.volt. A begyűjtött minták közül 36-ban mutatták ki a mikrocisztinek jelenétét. HPLC módszer segítségével 10 MC variánst azonosítottak. A variánsok kémiai szerkezetét tömegspektroszkópiás módszerrel határozták meg. A lengyel vizek fő MC variánsai a MC–RR, –LR és –YR volt. A fő variánsok mellett néhány monodesmethyl és didesmethyl MC–RR, –LR és –YR formát is találtak a minták analízise során. A MC koncentrációk néhány µg g⁻¹ és 1,687 mg g⁻¹ között változtak (Jurczak és mtsai., 2004). Lengyelország északi részén található Pomeranian tartományban szintén cianobakteriális toxinokat mutattak ki az édes- és brakkvizekben. A vízmintákat 7 tóból gyűjtötték be 2005 augusztusa és szeptembere között. A virágzások domináns fajai a *Planktothrix, Microcystis és Anabaena* genuszokból kerültek ki. A legtöbb édesvízi mintában a MC–LR, –RR és –YR formák voltak túlsúlyban. Azokban a tavakban, ahol a *Planktothrix agardhii* dominált, ott a legnagyobb mennyiségben a demtilált MC változatok fordultak elő:

[D-Asp³] MC–LR, [D-Asp³] MC–YR és a [D-Asp³] MC–RR. A MC koncentráció 0,1 és 305,4 µg L⁻¹ között változott. A Gdański-öböl brakkvizében a *Nodulari spumigena* tömeges elszaporodását figyelték meg. A mintavétel után a [MeAsp¹(OMe)] NOD toxint analizálták (Mazur-Marzec és mtsai., 2008).

Portugáliában található természetes tavakból, víztározókból és folyókból 12 toxikus vízvirágzási mintát gyűjtöttek be. A virágzást okozó fő a fajok a következők voltak: *Microcystis aeruginosa, Microcystis wesenbergii, Aphanizomenon flos-aquae* és *Nostocsp.* A toxinok azonosítására HPLC és MALD-TOF módszert használták fel. Összesen 7 MC variánst azonosítottak a toxikus mintákban, amelyek a következőek voltak: MC–RR, –LR, – YR, [D-Asp³] MC–LR, MC–HilR, [L-MeSer⁷] MC–LR és a [Dha⁷] MC–LR. Mindegyik mintában 2-7 közötti MC variáns fordult elő. A leggyakoribb MC variáns a MC–LR volt. A MC–HilR, [L-MeSer⁷] MC–LR és a [Dha⁷] MC–LR volt. A MC–HilR, [L-MeSer⁷] MC–LR és a [Dha⁷] MC–LR csak egyetlen egy mintában volt kimutatható. Mikrocisztin koncentrációk néhány 1 mg g⁻¹ és 7,1 mg g⁻¹ között változtak (Vasconcelos és mtsai., 1996). 2005-ben a Portugália déli részén található Beliche víztározóban a *Planktothrix rubescens* okozott virágzást. A faj azonosítása morfológiailag és a genetikailag (16 rRNA) is megtörtént. A MC variánsokat HPLC és MALDDI-TOF módszerekkel határozták meg. A három fő MC formát azonosítottak:[Asp³] MC–RR, [Asp³] MC–HtyR és [Asp³] MC–LR (Paulino és mtsai., 2009).

Németországi édesvizekből származó cianobaktérium virágzások terepi mintáinak kétharmadában detektáltak mikrocisztineket. A domináns cianobaktérium fajok a *Microcystis sp.*, *Planktothrix agardhii* vagy *Planktothrix rubescens* volt. A HPLC analízissel összesen 15 MC variánst izoláltak. Azokban a mintákban, amelyekben a *Microcystis* fajok domináltak ott a fő MC formák a MC–RR, –LR, –YR voltak. A leggyakoribb MC variáns a *Microcystis* virágzásokban a MC–RR volt. Fő MC formák mellett a terepi mintákban két demetilált formát a [D-Asp³] MC–LR és a [D-Asp³] MC–RR azonosították. A *Planktothrix agardhii* terepi mintáiban a [D-Asp³] MC–RR, [D-Asp³] MC–LR és a [D-Asp³] MC–HtyR variánsokat mutatták ki fő alkotóknak. A leggyakoribb ezek közül [D-Asp³] MC–RR típus volt. A laboratóriumban tartott *Planktothrix agardhii* HUB 076 törzsnél egyetlen egy formát a [D-Asp³] MC–RR variáns, valamint még a [D-Asp³] MC–LR fordult elő nagy mennyiségben.

Olaszországban 1989 és 2006 között 28 tóból gyűjtött 87 vízmintában és felülúszó habban detektáltak mikrocisztint, cilindrospermopszint és neurotoxikus anatoxint. A domináns fajok 11 genuszból kerültek ki: *Anabaena, Aphanizomenon, Aphanocapsa,*

Aphanothece, Cylindrospermopsis, Lyngbya, Merismopedia, Microcystis, Oscillatoria, Planktothrix, Pseudanabaena, Woronichia. A virágzások alatt általában egy vagy két faj dominált. A tavakból gyűjtött minták 33%-ban a Microcystis (főleg M. aeruginosa) és a Planktothrix (főleg P. rubescens) fajok fordultak elő nagy számban. Olaszország szárazföldi területeiről származó mintákban a domináns és mikrocisztin termelő faj a P. rubescens volt és ezt követte sorban a *M. aeruginosa*, ami Szardínia szigetének víztereiben vált dominánssá. A mintákban 6 MC variánst azonosítottak: [D-Asp³, Dhb⁷] MC-RR, MC-RR, -YR, -LR, -LA és –LW. A legtöbb minta háromnál több MC formát tartalmazott. A fő MC variánsok MC– RR, -YR, -LR alkotók voltak. A *Planktothrix* virágzásoknál a [D-Asp³, Dhb⁷] MC-RR és a MC-YR, addig a *Microcystis* virágzásoknál a MC-LR és a MC-YR formák domináltak. Az extracelluláris mikrocisztint 18 tóból származó 51 mintában mutatták ki, amelyek koncentrációja 0,004 ng/mL és 226,16 ng/mL között változott. A CYN termeléséért két faj az Aphanizomenon ovalisporum és/vagy Cylindrospermopsis raciborskii volt felelős. Az extracelluláris CYN koncentrációk a felszíni vízekben 0,3 ng/mL és 126 ng/mL között változtak. Az ANA-a termelése az Anabaena crassa és az Anabaena planctonica fajokhoz volt köthető. Az extracelluláris ANA-a koncentrációk a 115,1 ng/g és 12,13 µg/g között változotak (nedves tömeg) (Messineo és mtsai., 2009).

Az Alpokban található 12 tóból gyűjtöttek mintát a 2005 és 2007 közötti időszakban. A minták vizsgálata során a valós idejű PCR-t használták a genotípusok meghatározására és ezek arányából becsülték meg a MC mennyiséget, amit HPLC vizsgálattal támasztottak alá. A 12 tóból 9 Ausztriában (Afritzersee, Attersee, Fuschlsee, Irrsee, Mondsee, Offensee, Schwarzensee, Wolfgangsee és Wörthersee) található, 2 tó Svájcban (Hallwilersee és Zürichsee) egy pedig Németországban (Ammersee). A mintákat 2 m és 20 m –es mélységből vették. A tavakat trofikus szintjük alapján a következő osztályokba sorolták: olgigotróf, oligomezotróf, mezotróf és mezo-eutróf. A mintákban a fő cianobaktériumok a fonalas *Planktothrixek* voltak. A mikrocisztin koncentráció a mintákban 0 és 6,2 μg L⁻¹ között változott. A tavakból származó mintákból 5 fő MC variánst mutattak ki:[Asp³, Dhb⁷] MC–RR (44,2 %), [Asp³, Mdha⁷] MC–RR (32,6 %), [Asp³] MC–HtyR (7 %), [Asp³] MC–LR (14,9 %).

A madridi lakosság vízkészletének majdnem kétharmadát a Lozoya folyó öt víztározó rendszere teszi ki. Ebben a régióban, közép Spanyolországban a legnagyobb víztározó az El Altazar, amely oligo-mezotrofikus vízminősséggel jellemezhető. Ezt a víztározót az emberek ivóvízforrásként valamint üdülési és szórakozási célból használják. A víztározóban 2003 tavaszán *Planktothrix rubescens* vízvirágzást figyeltek meg. A vízvirágzás alatt 21 mintát

gyűjtöttek össze és húsz mintában találtak mikrocisztint. A legtöbb mintában a demetilált MC–RR formát, a [D-Asp³] MC–RR találták a fő mikrocisztin variánsnak, amelynek a koncentrációja 0,176 és 16,333 μ g/L szint között volt. Néhány mintában, nyomokban megtalálható volt a MC–LR, –RR és –YR változat is (Barco és mtsai., 2004). A teljes extracelulláris mikrocisztin koncentráció a mintákban 0,01-től 19,129 μ g/L-ig ingadozott. Továbbá más peptideket is azonosítottak a mintákban, ilyen például az anabaenopeptin B és F valamint az oscillamid Y.

Norvégiában a Stenisfjorden-tóban 2001-2004 között vizsgálták a toxintermelő *Planktothrix* populációk dinamikáját. A populációkat a *P. rubescens* és *P. agardhii* fajok alkották, amelyek 10-14 m-es mélységben fordultak elő. A vizsgálatok kimutatták, hogy a populációk dinamikáját a környezeti faktorok (fény, hőmérséklet, tápanyag) nagymértékben befolyásolják, úgymint a Közép-Európai tavakban. A *Planktothrix sp.* biomasszában különböző bioaktív oligopeptideket azonosítottak: demetilált MC–RR és –LR, anabaenopeptin B, aeruginosin 583, oscillamide Y, oscillaginin B és az oscillapeptin G (Halstvedt és mtsai., 2008). Az oligopeptidek közül a legnagyobb mennyiségben demetilált MC–RR forma fordult elő.

Összegezve az európai virágzásokat két csoportba sorolhatjuk. Egyik csoportot a sekély, eutróf vizekben kialakuló, a másik csoportot a mély, rétegzett, oligotróf vizekben létrejött virágzások adják. A sekély vizekben megjelenő toxikus virágzások leggyakrabban előforduló faja *Microcystis aeruginosa*, melyet követi a sorban a *Planktothrix agardhii*. A rétegzett vizekben a fő mikrocisztin termelő a *Planktothrix rubescens*. A mintagyűjtési helyek víztározóként, halastóként, turisztikai látványosságként és rekreációs üdülőközpontként funkcionálnak. A sekély vízterekből nyári hónapokban, addig a rétegzett tavakból pedig késő őszi és téli időszakban történtek a mintavételek. A vizsgálatok jól mutatják, hogy a mintákban mindig több MC formát azonosítottak eltérő koncentrációkban. A virágzások fő MC variánsai között eltérés figyelhető meg a beszámolók alapján. A MC variánsok azonosítására és mennyiségük meghatározására a MALDI-TOF analízist és HPLC módszert használták. A *M. aeruginosa* mintákban a MC–LR, –RR, és a –YR variánsok, addig a *P. agardhii* mintákban inkább a a demetilált formák a [Asp³] MC-LR, [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR (s [Asp³] MC–HtyR tekinthetőek jelentősnek. A *P. rubescens* virágzások fő MC alkotóinak [D-Asp³, Mdha⁷] MC–RR, [Asp³] MC–LR, [Asp³] MC–HtyR variánsokat azonosították.

A 2006-2010 közötti időszakban magyarországi horgásztavakból, holtágakból, természetes és mesterséges sekély tavakból a nyári hónapokban gyűjtöttünk mintákat. Az algavirágzásokat két jól ismert cianobaktérium faj a *Microcystis aeruginosa* és a *Planktothrix*

agardhii okozta. Előbb felsorolt vízterekben 10 esetben *M. aeruginosa,* 4 esetben pedig *P. agardhii* virágzást azonosítottunk. A MALDI-TOF analízis segítségével 14 mintából 12 MC variánst azonosítottunk, a variánsok nagy száma nem szokatlan, hiszen a jelenleg ismert MC formák száma meghaladja a kilencvenet, és több olyan algavirágzásról is beszámoltak, amelyben egy adott pillanatban 50 feletti volt a MC variánsok száma (Fastner és mtsai., 2001). Az általunk gyűjtött M. aeruginosa mintákban minden esetben detektáltunk MC formákat. A leggyakoribb MC típusok a MC–LR, –RR, és a –YR formák voltak. A legnagyobb MC koncentrációkat a Gyulán található mesterséges horgásztóból és a Bárdostóból gyűjtöttük be. A MC tartalom 0,010 és 15,701 mg g⁻¹szárazanyag MC–LR ekvivalens értékek között mozgott a mintákban. Érdekes módon, ahol a legnagyobb MC koncentrációt

A sekély tavakban a *M. aeruginosa* után a *P. agardhiit* találtuk gyakori virágzást előidéző fajnak. A P. agardhii tömeges megjelenései kevésbé voltak toxikusak, mint a *M. aeruginosa* virágzások. Egyetlen egy, a várpalotai minta esetében mértünk 1 mg g⁻¹ MC koncentrációnál nagyobbat . A toxikus *P. agardhii* mintáinkban a leggyakoribb MC variáns a [Asp³] MC–LR volt.

A vízvirágzások mintáit a MC bioszintéziséért felelős génekre tervezett primerpár sorozatokkal teszteltük. A mikrocisztint legnagyobb koncentrációban termelő *M. aeruginosa* és *P.agardhii* mintákban az összes mcy gén kimutatható volt a használt primerpárokkal (17. és 18. ábra). A MALDI-TOF analízis az összes *M. aeruginosa* mintában jelzett MC-t, annak ellenére, hogy a minták PCR vizsgálata több mcy gén hiányát tárta fel. Ez az eredmény azzal magyarázható egyrészt, hogy sok primerpár csak laboratóriumi minta esetében használható nagy hatékonysággal, a terepi mintánál kis mértékben képes jelezni a toxintermelő genotípusokat. Másrészt, ahogy már említettük a MC termelés nagyobb volt azoknál a mintáknál, ahol az összes mcy gén fellelhető volt. Ebből kiindulva megállapíthatjuk, hogy a csökkent MC termelést a hiányzó mcy gének okozhatják.

Az észak-magyarországi Kocka-tó felszínén vörös színű, sűrű 3 cm vastag cianobakteriális virágzást figyeltünk meg, amely igen szokatlan volt ebben a régióban. Laboratóriumi vizsgálatok kimutatták, hogy a jelenséget *P. rubescens* okozta. Ezen faj magyarországi megjelenése figyelemreméltó, mivel eredetileg hidegvízi sztenoterm szervezetként tartják számon, amely Közép-Európa és Dél-Európa szubalpin, alacsony hegyvidéki, valódi rétegzett mély tavaiban terjedt el. Magyarországon természetes mély tavak nem fordulnak elő, de a 10-40 m maximum mélységű mesterséges homokbánya- és kavicsbánya tavak stabilan tudnak rétegződni. A mi esetünkben a Kocka-tónál is kialakult a

stabil rétegződés, ami kedvezett a *P. rubescens* elszaporodásának. A vízben mért alacsony foszfor- és magas nitrogénformák koncentrációja is elősegítette a faj megjelenését, ahogyan több alpesi víztérben is megfigyelhető volt ilyen tápanyag ellátottság mellett. A virágzás során izolált BGSD-500 törzs 16S rRNS génjének és fikocianin operonjának szekvencia analízise nagyon közeli rokonságot tárt fel a P. *rubescens* és *P. agardhii* izolátumokkal. A két faj elkülönítéséhez ez előzőeken kívül a fikobilin összetételüket vizsgálatuk meg, mivel a *P. rubescens* esetében a magas fikoeritrin tartalom adja a faj jellegzetes vöröses színét, ezzel szemben a *P. agardhii* trichomái zöldes-kék vagy sárgás-zöld színűek (Suda és mtsai., 2002). A mikroszkópos vizsgálatok és a szekvencia analízisek eredményei alapján *P. rubescens* fajnak sikerült azonosítanunk a BGSD-500 törzset. A Kocka-tóban megjelenő *P.rubescencs* virágzás nagy mennyiségű MC-t tartalmazott, hasonlóan más országok vízvirágzásaihoz. A MALDI-TOF és a CE mérések feltárták, hogy a fő MC izoforma a terepi mintánál és az izolált az BGSD-500 törzsnél a [D-Asp³, Mdha⁷] MC–RR.

A CE analízissel a laboratóriumban fenntartott BGSD-500 törzsnél 1,85 mg/ szárazanyag MC-LR ekvivalens értéket, míg a terepi mintánál 8,57 mg/szárazanyag MC-LR ekvivalens értéket mértünk. Összehasonlítva a mért MC koncentrációkat, tisztán látható, hogy a terepi mintában ötször nagyobb a mért MC koncentráció, mint az izolált BGSD törzsben. Ez a különbség köszönhető a környezeti feltételeknek, vagy annak a ténynek, hogy a populációiban egyidejűleg jelen vannak a toxintermelő és a nem toxintermelő kemotípusok (Rohrlack és mtsai., 2001). A Planktothrix populációkban ez a két kemotípus morfológiailag azonos, mikroszkóppal nem lehet őket egymástól megkülönböztetni. Emiatt korlátozott mennyiségben vannak információink ezek térbeli és időbeli megoszlásáról. A 2001-2004 közötti időszakban az Alpokban található ausztriai tavakból vett mintáknak genetikai vizsgálatait végezték el, és kimutatták, hogy a mikrocisztin bioszintézis elvesztéséhez a mcy gének mutációja vezet. A minták DNS analízise több helyen deléciót és inszerciót tárt fel a mcy génklaszterben. Az összes inszerció hordozott egy ORF régiót. Az ORF régió konzerválódott doméneket tartalmaz, és ezek egyike a transzpozáz DDE domén, amelyről ismert, hogy elengedhetetlen a hatékony DNS transzpozícióhoz. A mozgékony elemekről tudott, hogy igen jelentős mutagén tényezők. A mcy génklaszterben talált összes inszerció egy mozgékony elemnek a része volt, amely áthelyeződésével (transzponálódásával) mutációt okozott a genomban. A mcy génklaszterben gyakori a mutációk előfordulása, és a két fent említett típus közül az inszerciók okoznak nagyobb arányban mutációt.

A csökkent MC-termelés genetikai hátterének a feltárását a BGSD-500 törzs teljes *mcy* génklaszterének analízisével folytattuk. Elsőnek a teljes *mcy* génklasztert lefedő 28

primerpárból álló sorozattal vizsgáltuk meg, majd ezt követően a feltárt problémás részek vizsgálatát, 500 bp méretű szakaszokat felölelő primerpárokkal végeztük, így szűkítve a mutációk pontos elhelyezkedését a *mcy* génklaszterben. A PCR termékeink méreteit agaróz gélen hasonlítottuk össze a CYA126/8 törzs PCR termékeinek méreteivel. A PCR termékek méretei csak két esetben különböztek egymástól. A PCR vizsgálatok során egy delécíót azonosítottunk a *mcy* génklaszter 23612-24003 nt szakaszán és egy inszerciót fedeztünk fel a 925-1399 szakasz között. A deléció a *mcy*E és *mcy*D, az inszercióa *mcy*T és *mcy*D spacer régió között helyezkedett el. Az inszerciós (IS) elem a *Planktothrixmcy* génklaszter 5' végénél lévő *mcy*T régióhoz közel helyezkedett el. Az inszerciós elemünk azonosításának érdekében a génbankban tárolt szekvenciákkal próbáltunk meg némileg hasonló szekvenciákat keresni. Az inszerciós szakaszunk szekvenciájaa *Synechococcus sp.* jelátvitelében szerepet játszó hisztidin kinázzal és a tRNS(Ile)-lizidin szintetázzal mutatott hasonlóságot.

Az inszerciós elemünk valószínűleg nincs hatással a MC bioszintézisére, de érdemes nem figyelmen kívül hagyni, az egyes génrészletekkel hasonlóságot mutató szekvenciák termékeinek funkcióit. A lizidin meghatározza a tRNS(Ile) aminosav specifitását és a kodonját, valamint a hisztidin kináz szerepet játszik a sejtmembránon keresztül történő jelátvitelben. Mindkét termék funkciója kapcsolatba hozható a metabolit termelés szabályozásával. Továbbá, a rekombinációnak is fontos szerepet tulajdonítanak, ami a *mcy* génklaszter átrendeződését, az új szerkezeti MC variánsok megjelenését, valamint a MC mennyiség módosítását eredményezheti (Kurmayer és mtsai., 2011; Ostermaier és Kurmayer, 2009). A MC csökkent termelése a *mcy* génklaszterben megjelenő szerzett pontmutációkkal is magyarázható (Kaebernick és mtsai, 2001).

Összehasonlítva a magyarországi algavirágzások eredményeit az európai virágzások eredményeivel megállapítható, hogy jelentős eltérés nincs. A sekély magyar tavakban is a domináns faj a *Microcystis aeruginosa* volt és ezt követte a sorban a *Planktothrix agardhii*. A rétegzett Kocka-tóban a fő mikrocisztin termelő a *Planktothrix rubescens* volt. A MC variánsok azonosítására és mennyiségük meghatározására a MALDI-TOF analízist és CE analízist használtunk. A virágzások fő MC variánsai és koncentrációi között eltérés figyelhető meg itt is. A *M. aeruginosa* mintákban a MC–LR, –RR, és a –YR variánsokat, addig a *P. agardhii* mintákban inkább a demetilált forma a [Asp³] MC–LR fordult elő nagyobb mennyiségben. A *P. rubescens* virágzások fő MC típusának [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR formát azonosítottuk. Megállapítható, hogy a kapott eredmények összhangban állnak más országokban megfigyelt virágzások eredményeivel.

Korábbi hazai eredményekkel való összevetés

Hazánkban az első vízvirágzással kapcsolatos közlés 1934-ben jelent meg. Sebestyén Olga a tihanyi Biológiai Kutatóintézet előtti Kis-öbölben augusztus 11-én zöldessárga *Microcystis aeruginosa* és *Microcystis flos-aquae* okozta vízvirágzást figyelt meg (Entz és Sebestyén, 1942). 2010-ben a tihanyi Kis-öbölben vett mintánkban a *M. aeruginosa* fordult elő tömegesen, pedig a Balatonon elsősorban a nitrogénkötő fonalas fajok jelenléte a jellemző (Farkas és mtsai., 2014). A csíranövény teszttel megállapítottuk a minta toxikusságát és a MALDI-TOF analízissel két MC variánst azonosítottunk: MC–LR, –RR.

A második közlés 1960. július 30-áról való, világoszöld, sávos vízvirágzást észleltek Balatonbogláron a part közvetlen közelében egy védett beöblösödésben, melyet az *Anabaena flos-aquae* idézett elő. A következő vízvirágzást Hortobágyi közölte: 1960. augusztus 23-án a balatonboglári part menti részeken *Microcystis flos-aquae* csomók úsztak a vízben. A *Microcystis flos-aquae* további szórt megjelenésű virágzásairól tettek jelentést, 1960. augusztus 19-én és 1961. szeptember 17. és 19. között (Hortobágyi, 1962). Az első nagyobb mértékű és hosszan tartó balatoni vízvirágzásra 1966. szeptember 2-án figyeltek fel. A jelenség a Keszthelyi-öbölben mutatkozott, a Zala torkolatához közel. A vízvirágzás 6 km széles és 11 km hosszú területen alakult ki, melyet egyetlen cianobaktérium faj okozott: az *Aphanizomenon flos-aquae*. A hetvenes évek balatoni vízvirágzásait szintén ez a faj idézte elő. Rendszertelenül, a nyári hónapokban vízvirágzást idézett elő 1982-ben, 1992-ben és 1994-ben a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Padisák, 1995). A Velencei-tavon elsősorban a *Microcystis aeruginosa* okozott jelentős virágzást (Kós és mtsai., 1995).

A Velencei-tó esetében tulajdonképpen szokványos jelenségről beszélhetünk, hiszen évről évre a tó egyes területein elszaporodik a faj, és ahogyan említettük, az 1990-es évek elején komoly problémát is okozott. Az 1990-es virágzásból izolált *M. aeruginosa* BGSD-243 törzsből két fő MC variánst azonosítottak, a MC–LR, –YR formát. Csaknem 20 év elteltével az általunk gyűjtött mintákból az előbb említett két MC formán kívül még egy újabb MC formát sikerült azonosítanunk a MC–WR variánst.

A Kis-Balaton két mesterséges édesvízi víztározóból és mocsarakból áll, melyek a Zala folyó deltájában helyezkednek el. Azért hozták őket létre, hogy elősegítsék a Balatonba ömlő vizek szennyeződésének természetes szűrését. Funkciójából adódóan nagyon gyakori a cianobakteriális vízvirágzások megjelenése. Két esetben a 4T jelzésű mintavevő helynél *M. aeruginosa*és *P. agardhii* virágzást figyeltünk meg.
Összegezve a korábbi és mostani eredményeket megállapíthatjuk, hogy a *Microcystis aeruginosa* korábban és most is előfordult tömegesen a vízterekben. Új virágzást okozó fajként írtuk le a *Planktothrix agardhiit*. Korábbi virágzások toxin mintázatáról sok adatunk nincs, csak a Velencei-tóból izolált BGSD-243 törzs mintának azonosítták MC variánsait. Az általunk gyűjtött *M. aeruginosa* mintákban minden esetben detektáltunk MC formákat. A leggyakoribb MC típusok a MC-LR, MC-RR, és a MC-YR formák voltak. Ezzel összhangban volt a BGSD-243 törzs MC mintázata.

6. Összegfoglalás

A munkánk során öt éven keresztül gyűjtöttünk mintákat Magyarország különböző víztereiben 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 csíranövény teszt nem mutatott toxicitást. A legtoxikusabb minta a Bárdos-tóból származott.

A mustártesztben feltűnő gyökér növekedésgátló komponenseket ioncserés kromatográfiaval, 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 estben 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-sel 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 (*mcy*T) sikerült kimutatni, de a mintában nem volt detektálható mikrocisztin.

Az észak-magyarországi Kocka-tó felszínén vörös színű virágzást figyeltünk meg, amelyet a *P.rubescens* okozott. 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*t 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 törzsben. Ez a különbség annak köszönhető, hogy a természetes populációk különböző toxikus potenciállal rendelkező egyedek keverékei.

A BGSD-500 törzs *mcy* génklaszterének tanulmányozásakor két mutációt tártunk fel. A deléció a *mcy*E és *mcy*D spacer régió között, az inszerciónk a *mcy*T és *mcy*D spacer régió között helyezkedett el. Bár ezek az elemek valószínűleg nem 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 a metabolit termelés szabályozásával.

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

7. Summary

In our work waterbloom samples of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* were collected from a variety of ponds, lakes and reservoirs in Hungary. The toxicity of samples were tested by *Sinapis* test. The results presented that *M. aeruginosa* is more toxic bloom-forming cyanobacteria than *P. agardhii* in Hungary. The most toxic sample was collected at Bardos pond. In four cases, the IC₅₀ was undetectable: the *P. agardhii* containing samples from Kis-Balaton reservoir, Hajdúhadház and Gyula; and the *M. aeruginosa* containing sample from Ónod pond.

Samples were tested with matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to identify the microcystin forms. The concentration of the microcystins was measured with capillary electrophoresis. Twelve different chemical forms of microcystin were detected in the fourteen samples. Microcystin-LR, microcystin-RR and microcystin-YR were found as a frequent form in *Microcystis aeruginosa* but the most common form in *Planktothrix agardhii* was the [Asp³] MC-LR.

Total microcystin concentrations varied between 0.010 and 15.701 mg microcystin-LR equivalents $g^{-1}DW$. The highest MC content was measured in the Bardos pond sample.

DNA was extracted from the samples and tested using a range of primers linked to the biosynthesis of microcystin. All of the fourteen collected samples gave positive results for the presence of the mcy genes with PCR products with sizes between of 425 and 955 bp, respectively, indicating the presence of the genes implicated in the production of microcystins. The only exception was the Kis-Balaton (4T) reservoir sample of *P. agardhii*. This sample was found to contain microcystin synthetase gene (mcyT) but microcystins could not be detected by MALDI-TOF MS.

In our study we reported the presence of *P. rubescens* bloom from a wind-sheltered, stably stratified shallow lake with low phosphate and high nitrogen loads, where the Secchi transparency was 1.2 m. The reddish color of cyanobacterial blooms was an unexpected observation in our region and the causative organism was identified by classic morphological markers and by 16S rRNA gene and phycocyanin operon (cpcBA-IGS) as molecular markers.

The results obtained in the Kocka pond thus confirm that the *Planktothrix* bloom sample contained comparably high amounts of MC. The MALDI-TOF and the CE-analyses demonstrated that the *P. rubescens* bloom sample and the isolated strain (BGSD-500) primarily contain one main MC congener, a demethylated variant of MC-RR.

Analysis of MALDI-TOF spectra and 2D HSQC NMR spectra provided evidence that the molecule is identical to [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR. Comparing the concentration of the MC congener in the bloom sample and in the isolated strain it can be clearly seen that the bloom sample contained five times more MC than the isolated strain.

This difference may due to specific environmental conditions but it is important to note a deletion in the spacer region between *mcy*E and *mcy*G, and an insertion were detected at one site binding to the spacer region between *mcy*T and *mcy*D. Although our element has probably no influence on the MC synthesis, considering the function of the product of the partly similar sequences, it is worth discussing this possibility.

This current result confirms that the *M. aeruginosa* and *P. agardhii* next to the MC containing *P. rubescens* represent a significant water quality problem in waters and in water bodies used for recreational purposes in Hungary.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Vasas Gábornak, aki tanácsaival, szakmai útmatatásaival jelentősen hozzájárult a doktori disszertációm elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom a Növénytani Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozójának, hogy munkámat nyugodt körülmények között végezhettem.

Továbbá köszönöm Dr. Batta Gyulának, a DE TTK Szerves Kémiai Tanszék munkatársának az NRM mérésekben nyújtott segítségét, Dr. Gyémánt Gyöngyinek, a DE TTK Szervetlen- és Analitikai Kémiai Tanszék dolgozójának a MALDI-TOF mérések kivitelezését.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a támogatást, a türelmet és a biztatást.

9. Irodalomjegyzék

- Annila, A., Lehtimäki, J., Mattila, K., Eriksson, J.E., Sivonen, K., Rantala, T.T. and Drakenberg, T. (1996) Solution structure of nodularin: an inhibitor of serine/threoninespecific protein phosphatases, Journal of Biological Chemistry 27, 16695-16702.
- Ansari MZ, Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D (2004) NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. Nucleic Acids Res 32: 405–413.
- Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw,G. R., Eaglesham, G. K. (2002) Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru Brazil. Toxicology. 181: 441-446.
- Babanazarova, O. V., Kurmayer R., Sidelev S. I., Aleksandrina E. M., Sakharova E. G. (2011) Phytoplankton structure and microcystine concentration in the highly eutrophic Nero Lake. Water Resources.39 (2):229-236.
- Barco M., Flores C., Rivera J., Caixach J., (2004) Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of Planktothrix (Oscillatoria) rubescens in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. Toxicon (2004) 44, 881–886.
- Best, J. H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F. B., Metcalf, J. S., Codd, G. A., (2002) Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathioneS-transferase activities in zebra fish (Danio rerio). Aquat. Toxicol. 60, 223–231.
- Boaru D. A., Dragoş N., Welker M, Bauer A., Nicoară A., Schirmer K., (2006) Toxic potential of microcystin-containing cyanobacterial extracts from three Romanian freshwaters. Toxicon 2006, 47 (8), 925-932.
- Botes, D.P., Tuiman, A. A., Wessels, P.L., Viljoen, C.C., Kruger, H., Williams, D.H., Santikarn, S.,Smith, R.J. and Hammond, S. J. (1984) The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from thecyanobacterium Microcystis aeruginosa, Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions I, 2311-2319.
- Botes, D. P., Wessels, P. L., Kruger, H., Runnegar, M. T. C., Santikarn, S., Smith, R. J., Barna, J. C. J., and Williams, D. H. (1985) Structural studies on cyanoginosins-LR, -

YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:2747–2748.

- Bright, D. I., Walsby, A. E.(1999) The relationship between critical pressure and width of gas vesicles in isolates of *Planktothrix rubescens* from Lake Zurich. Microbiology. 145:2769-2775.
- Bryant, D. A. (1994) The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 879.
- Capper, A., Tibbetts, I.R., O'Neil, J.M., Shaw, G.R., (2005) The fate of Lyngbya majuscula toxins in three potential consumers. J. Chem. Ecol. 31, 1595–1606.
- Carmichael, W. W. (1992) Cyanobacteria secondary metabolites-The cyanotoxins. Journal of Bacteriology. 72: 445-459.
- Carmichael, W. W. (2001) Health effects of toxin producing cyanobacteria: the 'CyanoHABS'. *Hum Ecol Risk Assess***7:** 1393–1407.
- Chen, J., Xie, P. (2005a). Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. Environmental Toxicology. 20: 572-584.
- Chen, J., Xie, P., (2005b). Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, Palaemon modestus and Macrobrachiumnipponensis, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. Toxicon 45, 615–625
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., (1999) Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. Environ. Toxicol. 14, 155–161.
- Chong, M.W.K., Wong, B.S.F., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Seawright, A.A., (2002) Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. Toxicon 40, 205–211.

- Chorus, I., Bartram, J.(1999) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Routledge, London, UK.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E. (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. Journal of Bacteriolgy. 185 (2):564-572.
- 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.
- Christiansen, G., Molitor, C., Philmus, B., Kurmayer, R. (2008a) Non-toxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. Molecular Biology and Evolution. 25: 1695-1704.
- Codd GA (1994) Biological aspects of cyanobacterial toxins. In: Steffensen DA, NicholsonBC (eds) Toxic Cyanobacteria, Current Status of Research and Management: International Workshop, 22-26 March 1994, Adelaide, SA. Proceedings, Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research, Salisbury SA.
- Codd, G. A. (1995) Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. Water Sci Technol 32: 149–156.
- Cox PA, Banack SA & Murch SJ (2003) Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. P Natl Acad Sci USA 100: 13380–13383.
- Dabholkar, A. S., and Carmichael, W. W. (1987) Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium Microcystis aeruginosa strain 7820. Toxicon 25:285–292.
- Ding,W. X., Shen, H.M., Ong, C.N., (2001) Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. J. Toxicol. Environ. Health. 64, 507–519.
- Dittmann, E., Fewer, D. P., Neilan, B. A. (2013) Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. FEMS Microbiology Reviews. 37: 23-43.

- Edwards, D.J., Marquez, B.L., Nogle, L.M., McPhail, K., Goeger, D.E., Roberts, M.A., Gerwick, W.H., (2004) Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. Chem. Biol. 11, 817–833.
- Entz, G., Sebestyén, O. (1942) A Balaton élete. Királyi Magyar Természet TudományosTársaság Kiadása. 1-366.
- Falconer, I.R. (1993b) Mechanism oftoxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: Falconer 1A (ed) Algal Toxins in Seafood and Drinking Water Academic Press, London, pp 177-186.
- Falconer, I.R., Humpage, A. R., (2006). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. Environ. Toxicol. 21, 299–304.
- Fallon, R.D., Brock, T.D. (1981) Overwintering of *Microcystis* in Lake Mentoda. Freshw. Biol. 11, 217–226.
- Farkas, O., Gyémánt, Gy., 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 Biologica Hungarica. 65 (2): 227-239.
- Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W. W., Sun, F., Rinehart, K. L., Rönicke, H., Chorus, I. (1999) Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. Archiv für Hydrobiologie.145: 147-163.
- Fastner, J., Erhard, M.,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.
- Fay, P. (1965) Heterotrophy and nitrogen fixation in Chlorogloea fritschii. J. Gen. Microbiol. 39, 11–20.
- Fay, W. F., Van Baalen, C. (1987) The Cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam.

- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., (2005) Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203, 257–263
- Froscio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I. R. (2003) Cylindrospermopsininduced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environmental Toxicology. 18: 243- 251.
- Fujiki, H., Sugimura, T., Moore, R.E., (1983) New classes of environmental tumor promoters: indole alkaloids and polyacetates. Environ. Health Perspect. 50, 85–90.
- Ginn, H.P., Pearson, L.A., and Neilan, B.A. (2010) NtcA fromMicrocystis aeruginosaPCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter.Appl Environ Microbiol 76:4362–4368.
- Gkelis S., Lanaras T., and Sivonen K., (2015) Cyanobacterial Toxic and Bioactive Peptides in Freshwater Bodies of Greece: Concentrations, Occurrence Patterns, and Implications for Human Health *Marine Drugs* 2015, *13*, 6319-6335.
- Grach-Pogrebinsky O., Sedmak B. and Carmeli S., (2004) Seco[D-Asp3] microcystin-RR and [D-Asp3,D-Glu(OMe)6]microcystin-RR, Two New Microcystins from a Toxic Water Bloom of the Cyanobacterium Planktothrix rubescens. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 2004, 67, 337-342.
- Griffiths, D.J., Saker, M.L., (2003) The palm island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. Environ. Toxicol. 18, 78–93.Gobler, C.J., Davis, T.W., Coyne, K.J., Boyer, G.L., 2007. The interactive influences of nutrient loading and zooplankton grazing on the growth and toxicity of cyanobacteria blooms in a eutrophic lake. Harmful Algae 6, 119–133.
- Guo, L. (2007) Doing battle with the green monster of Lake Taihu. Science 317: 1166
- Hagenbuch, B., Meier, P. J., (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. 1609, 1–18.
- Halstvedt C. B., Rohrlack T., Ptacnik R., Edvardsen B., (2008) On the effect of abiotic environmental factors on production of bioactive oligopeptides in field populations of Planktothrix spp. (Cyanobacteria). Journal of plankton research 30 (5) 607-617.

- Harada, K. I., Ogawa, K., Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Itezono, Y., and Nakayama, N. (1990) Structure determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.* 3:473–481.
- 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.
- Hooser, S. B., Beasley, V. R., Waite, L. L., Kuhlenschmidt, M. S., Carmichael, W. W., and Haschek, W. M. (1991). Actin filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa.Vet. Pathol.* 28:259–266.
- Hortobágyi, T. (1962) Két vízvirágzás a Balatonon. Botanikai Közlemények. 49, 233-237.
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (2005) Harmful Cyanobacteria. Springer. 25-40.
- Ito, E., Nagai, H., (2000) Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga Gracilaria coronopifolia poisoning. Toxicon 38, 123– 132.
- Ito, E., Satake, M., Yasumoto, T. (2002a) Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. Toxicon 40: 551-556.
- Jacquet, S., Briand, J-F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J-C., Anneville, O., Humbert, J-F. (2005) The proliferation of the toxic cyanobacterium*Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). Harmful Algae. 4: 651-672.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS et al., (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. N Engl J Med 338: 873–878.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spácil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B. (2010) Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic

ecosystem suggests pathways for human exposure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the UnitedStates of America. 107: 9252-9257.

- Jurczak T., Tarczyn M., Karlsson K., Meriluoto J., (2004) Characterization and Diversity of Cyanobacterial Hepatotoxins (Microcystins) in Blooms from Polish Freshwaters Identified by Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. Chromatographia 2004, 59, 571–578
- Kaebernick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., Neilan, B. A. (2001) A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. Environmental Microbiology. 3:669-679.
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T. and Neilan, B.A. (2002) Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide, *Applied and EnvironmentalMicrobiology* 68, 449-455.
- Kankaanpää, H.T., Holliday, J., Schroder, H., Goddard, T. J., von Fister, R., Carmichael, W.W., (2005) Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203, 243–256.
- Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.-M. (2003) The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Harmful Algae. 2:29-41.
- Kinnear, S. H. W., Duivenvoorden, L.J., Fabbro, L. D., (2007) Sublethal responses in Melanoides tuberculata following exposure to Cylindrospermopsis raciborskii containing cylindrospermopsin. Harmful Algae 6, 642–650.
- Kiss, I. (1985) The development of striking algal mass productions at the Alpár-basin region of the Tisza-valley; Feltűnő algatömegprodukciók kialakulása a Tisza-völgy Alpárimedencéje területén. Tiscia. 20: 13-28.
- Komárek, J., Komárkova-Legnerová, J. (2002) Review of the European *Microcystis*morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. Czech Phycology. 2: 1-24.

- Kós, P., Gorzó, Gy., Surányi, Gy., Borbély, Gy. (1995) Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). Analytical Biochemistry. 225: 49-53.
- Kotak, B.G., Lam, A. K-Y., Prepas, E. E., Hrudey, S. E. (2000) Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 57: 1584-1593.
- Kotak, B. G., Lam, A. K-Y., Prepas, E. E., Kenefick, S. L., Hrudey, S. E. (1995) Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypertrophic drinking water lakes. Journal of Phycology. 31: 248-263.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J.,(1999) Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, Taylor and Francis, London and New York, pp. 113–153.
- Kurmayer, R., Dittmann E., Fastner J.and Chorus I. (2002): Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium*Microcystisspp*. in LakeWannsee (Berlin, Germany).*Microbial Ecology*43: 107-118.
- Kurmayer, R.and Kutzenberger T. (2003): Application of real-time PCR for the quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*69:6723-6730.
- Kurmayer, R., Christiansen G., Gumpenberger M., Fastner J. (2005) Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. Microbiology.151:1525-1533.
- Kurmayer, R., Schober, E., Tonk, L., Visser, P., Christiansen G. (2011) Spatial divergence in the proportions of genes encoding toxic peptide synthesis among populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in European lakes. FEMS Microbiology Letters.317: 127-137.
- Lankoff, A., Banasik, A., Nowak, M., (2002) Protective effect of melatonin against nodularininduced oxidative stress. Arch. Toxicol. 76, 158–165.

- Li, R. H., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D., Watanabe, M.M., (2001) First report of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from Raphidiopsis curvata (Cyanobacteria). J. Phycol. 37, 1121–1126.
- Lindsay, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A., (2006). Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in Artemia salina and Daphnia spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). Toxicon 48, 995–1001.
- Lürling M. and Faassen E. J., (2013) Dog Poisonings Associated with a *Microcystis aeruginosa* Bloom in the Netherlands. *Toxins* 2013, 5 (3), 556-567.
- Maeda, H., Kawai, A., and Tilzer, M.M. (1992) The water bloom of cyanobacterial picoplankton in Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia* 248:93–103.
- Malhotra, S. K., and Shnitka, T. K. (1996). The cytoskeleton—Microtubules and microfilaments: A biological perspective. In *Principles of medical biology Vol. 4, Cell chemistry and physiology*, eds. E. E. Bittar and N. Bittar, pp. 1–41. Greenwich, Conn: JAI Press Inc.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. and Mootz, H. D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis, Chemical Reviews 97, 2651-2673.
- Mazur-Marzec H., Spoof L., Kobos J., Pliński M., Meriluoto J., (2008) Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularins, in fresh and brackish waters of the Pomeranian Province, northern Poland. International Journal of Oceanography and Hydrobiology 2008, 37 (4) 3-21.
- Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C. (2005) Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). FEMS Microbiology Letters. 245: 299-306.
- Mejean A, Mann S, Vassiliadis G, Lombard B, Loew D & Ploux O (2010) In vitro reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in Oscillatoria PCC 6506: from free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline. Biochemistry 49: 103–113.

- Messineo V., Bogialli S., Melchiorre S., Sechi N., Luglie A., Casiddu P., Mariani M. A., Padedda B. M., Di Corcia A., Mazza R., Carloni E., Bruno M., (2009) Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. Limnologica 2009, 39 95–106.
- Messineo, V., Mattei, D., Melchiorre, S., Salvatore, G., Bogialli., S., Salzano, R., Mazza, R., Capelli, G., Bruno, M. (2006) Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (Central Italy). Toxicon. 48: 160-174.
- Namikoshi, M., Rinehart, K. L., Sakai, R., Sivonen, K., and Carmichael, W. W. (1990). Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc* sp. strain 152. *J. Org. Chem.* 55:6135–6139.
- Namikoshi, M., Rinehart, K. L., Sakai, R., Stotts, R. R., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., Carmichael, W. W., and Evans, W. R. (1992a). Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystiswesenbergii*: Nine new microcystins. J. Org. Chem. 57:866–872.
- Negri, A.P., Jones, G.J., (1995). Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium Anabaena circinalis by the freshwater mussel Alathyria condola. Toxicon 33, 667–678.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K-I., Shirai, M. (1999) Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. Journal of Biochemistry. 126: 520-529.
- Nogueira, I.C.G., Pereira, P., Dias, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Franca, S., Vasconcelos, V.M., (2004). Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium Aphanizomenon issatschenkoi by the cladoceran Daphnia magna. Toxicon 44, 773–780.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A. A., Moore, M.R., (1999). Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from Cylindrospermopsis raciborskii. Environ. Toxicol. 14, 163– 165.
- Oberemm, A., Becker, J., Codd, G. A., Steinberg, C., (1999) Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. Environmental Toxicology. 14: 77-188.

- Oberhaus, L., Briand, J. F., Leboulanger, C., Jaquet, S., Humbert, J. F. (2007) Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. Journal of Phycology. 43:1191-1199.
- Oh, H.-M., Lee, S. J., Jang, M.-H., Yoon, B.-D. (2000) Microcystin production by *Microcystisaeruginosa*in a Phosphorus-Limited Chemostat. Applied and Environmental Microbiology.66: 176-179.
- Ohmori, M., (1978) Nitrite excretion by a blue-green alga, Oscillatoria rubescens D.C. Arch. Hydrobiol. 83, 485–493.
- Olivier, R. L., Ganf, G. G. (2000) Freshwater blooms. In: Whitton, B. A., Potts, M. (Eds.), The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Kluwer Academic Publishers, London. 149-194.
- Ostermaier, V., Kurmayer, R. (2009) Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. Microbial Ecology. 58: 323-333.
- Orjala, J., Nagle, D. G., Hsu, V. L., Gerwick, W. H., (1995). Antillatoxin: an exceptionally ichthyotoxic cyclic lipopeptide from the tropical cyanobacterium Lyngbya majuscula. J. Am. Chem. Soc. 117, 8281–8282.
- Ouahid, Y., del Campo, F. F. (2009) Typing of toxigenic *Microcystis* from environmental samples by multiplex PCR. Applied Microbiolgy and Biotechnology. 85: 405-412.
- Padisák, J., Istvánovics, V. Hogyan magyarázhatók a rendszertelen *Cylindrospermopsis* raciborskii tömegprodukciók a Balatonban-egy nullhipotézis. In A XXXVII. Hidrobiológus napok Kiadványa; Bíró P., Ed., Innopress Kft, Veszprém, 1995.
- Paerl, H. W., and Ustach, J.F. (1982) Blue-green algal scums: an explanation for their occurrence during freshwater blooms. *Limnol Oceanogr* 27: 212–217.
- Paerl, H. W. (2008) Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. Advances in Experimental Medicine and Biology.619: 216-241.
- Paerl, H. W., Fulton, R. S. (2006) Ecology of harmful cyanobacteria. In Ecology of Harmful Marine Algae. Graneli, E., Turner, J. (eds) Berlin, Germany: Springer-Verlag. 95-107.

- Paerl, H. W., Huisman, J. (2009) Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. Environmental Microbiology Reports. 1 (1): 27-37.
- Parker, D. L.: Improved procedures for the cloning and purification of *Microcystis* cultures (Cyanophyta). J. Phycol. 18, 471–477 (1982).
- Paulino S., Valerio E., Faria N., Fastner J., Welker M., Tenreiro R., Pereira P., (2009) Detection of Planktothrix rubescens (Cyanobacteria) associated with microcystin production in a freshwater reservoir. Hydrobiologia (2009) 621, 207–211
- Pearson LA, Barrow KD & Neilan BA (2007) Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of Microcystis aeruginosa PCC7806. J Biol Chem 282: 4681–4692.
- Pearson LA, Hisbergues M, Borner T, Dittmann E, Neilan BA (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
- Pflugmacher, S., Olin, M., Kankaanpää, H., (2007). Nodularin induces oxidative stress in the Baltic Sea brown alga Fucus vesiculosus (Phaeophyceae). Mar. Environ. Res. 64, 149– 159.
- Pinckney, J. L., and Paerl, H. W. (1998) Lake ice algal phototroph community composition and growth rates, Lake Bonney, dry valley lakes, Antarctica. *Antarct J US Rev.* 1996: 215-216.
- Potts, M., and Whitton, B. A. (2000) *The Biology and Ecologyof Cyanobacteria*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Preston, T., Stewart, W.D.P., Reynolds, C.S. (1980). Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on sediment surface. Nature. 288, 365–367.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., Sivonen, K. (2006) Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish Lakes with genus-specific microcystin synthetase Gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. Applied and Environmental Microbiology. 72: 6101-6110.

- Ressom, R., Soong, F. S., Fitzgerald, J., Turczynowicz, L., El Saadi, O., Roder, D., Maynard,
 T., Falconer, I. (1994) Health Effects of Toxic Cyanobacterial (blue-green algae)
 National Health and Medical Research Council (NHMRC), Australia, Canberra.
- Reynolds, C.S., (1987) Cyanobacterial water blooms. In: Callow, J.A. (Ed.), Advances in Botanical Research, vol. 13. Academic Press, pp. 67–143.
- Reynolds, C.S., Jaworski, G. H. M., Cmiech, H. A., Leedale, G. F. (1981) On the annual cycle of the Blue-Green-Alga *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend Elenkin. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 293: 419-477.
- Rinehart KL, Harada K, Namikoshi M et al. (1988) Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. J Am Chem Soc 110: 8557–8558.
- Rodger, H. D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G. A. (1994) Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, salmo trutta l. in Loch Leven, Scotland. Journal of Fish Diseases. 17(736):177-181.
- Rohrlack, T., Henning, M., Kohl, J.-G. (2001) Isolation and characterization of colonyforming *Microcystis aeruginosa* strains. In: Cyanotoxins Occurrence, Causes, Consequences (Chorus, I., Ed.), Springer Verlag, New York. 152-158.
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siember, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R. and Sivonen, K.
 (2004) Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium Anabaena strain 90. Appl. Environ. Microbiol. 70 (2), 686–692.
- Runnegar, M. T. C., Falconer, I. R. (1986) Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystisaeruginosa* on ultra-structural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. Toxicon. 24: 109-115.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kaplowitz, N., (1995) Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. Toxicol. Appl. Pharmacol. 134, 264–272.
- Saker, M. L., Eaglesham, G. K. (1999) The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cheraxquandricarinatus*. Toxicon. 37: 1065-1077.

- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G. A., Vasconcelos, V.M. (2004) Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Toxicon. 43: 185-194.
- Scheffer, M. (1998) Ecology of Shallow Lakes. London, UK: Chapman and Hall.
- Sedmak B. and Kosi G.,(1997) Microcystins in Slovene freshwaters (Central Europe)—first report. Natural Toxins 1997, 5 (2), 64–73
- Sielaff, H., Dittmann, E., Tandeau de Marsac, N., Bouchier, C., von Döhren, H., Börner, T. and Schwecke, T. (2003) The mcyF gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from Microcystis aeruginosa encodes an aspartate racemase, Biochemical Journal 373, 903-916.
- Sivonen, K., Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. editors. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. London: E&FN Spon. 41-111.
- Skulberg, O. M., Carmichael, W. W., Codd, G.A., Skulberg, R. (1993) Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). In Algal Toxins in Seafood and Drinking Water; Falconer, I.R., Ed., Academic Press, London. 145-164.
- Stewart, I., Schluter, P. J., Shaw, G. R. (2006) Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health -a review. Environmental Health: A Global Access Science Source. 5: 7.
- Stomp, M., Huisman, J., Vörös, L., Pick, F.R., Laamanen, M., Haverkamp, T., and Stal, L.J. (2007) Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.* 10: 290–298.
- Stotts, R. R., Namikoshi, M., Haschek, W. M., Rinehart, K. L., Carmichael, W. W., Dahlem, A. M., and Beasley, V. R. (1993). Structuremodifications imparting reduced toxicity in microcystins from Microcystis spp. Toxicon 31:783–789.
- Strichartz, G., Rando, T., Hall, S., Gitschier, J., Hall, L., Magnani, B., Bay, C.H., (1986) On the mechanism by which saxitoxin binds to and blocks sodium channels. Ann. N. Y. Acad. Sci. 479, 96 – 112.
- Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu Y., Day, J.G. (2002) Taxonomic revision of water bloom-forming species of

oscillatorioid cyanobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1577-1595.

- Takamura, N., Yasuno, M., Sugahara, K. (1984). Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kutz in a shallow lake. J. Plank. Res. 6, 1019–1029.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Döhren, H., Börner, T., Neilan, B. A. (2000) Structural organization of microcystin of biosynthesis in *Microcystisaeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chemisty & Biology. 7: 753-764.
- Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O., Wiedner, C., et al. (2005) The microcystin composition of the cyanobacteriumPlanktothrix agardhii changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. Appl Environ Microbiol71:5177–5181.
- Uwins, H. K., Teasdale, P., and Stratton, H. (2007) A case study investigating the occurrence of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hinze Dam, Gold Coast, Australia. *Water Sci Technol* 55: 231–238.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1995) Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vasconcelos V. M., Sivonen K., Evans W. R., Carmichael W. W., Namikoshi M., (1996) Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. Water Research 1996, 30 (10) 2377-2384.
- Vasas, G., Farkas, O., Borics, G., Felföldi, T., Sramkó, G., Batta, Gy., Bácsi, I., Gonda, S. (2013) Appearing of *Planktothrix rubescens* bloom with [D-Asp³, Mdha⁷] MC-RR in gravel pit pond of a shallow lake dominated area. Toxins. 5: 2434-2455.
- 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.

- Vasas, G., Szydlowska, D., Gáspár, A., Welker, M., Trojanowicz, M., Borbély, G. (2006) Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 66: 87-97.
- Vezie C., Brient L., K. Sivonen K., G. Bertru G., Lefeuvre J.-C., Salkinoja-Salonen M., (1998) Variation of Microcystin Content of Cyanobacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France). Microb Ecol (1998) 35:126–135.
- Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K. (2002) Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. Microbial Ecology. 43: 443-454.
- Verschuren, D., Johnson, T. C., Kling, H.J., Edgington, D.N., Leavitt, P.R., Brown, E.T., et al. (2002) History and timing of human impact on Lake Victoria, East Africa. Proc R SocLond B Biol Sci 269:289–294.
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Yunes, J.S., Richards, J., Bianchi, A., Monserrat, J.M., (2002). Effects of extracts from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa on ion regulation and gill Na+, K+-ATPase and K+-dependent phosphatase activities of the estuarine crab Chasmagnathus granulata (Decapoda, Grapsidae). Physiol. Biochem. Zool. 75, 600 – 608.
- Walsby, A. E., Avery, A., Schanz, F. (1998) The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zürich, Switzerland. Journal of Plankton Research. 20: 1357-1375.
- Welker, M., Christiansen, G., von Döhren, H. (2004) Diversity of coexisting *Planktothrix* (Cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microcystins and other oligopeptides. Archives of Microbiology. 182: 288-298.
- Welker, M., von Döhren, H. (2006) Cyanobacterial peptides-Nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews. 30: 530-563.
- Whitton, B. A. (1992) Diversity ecology and taxonomy of cyanobacteria. In Photosynthetic Procaryotes; Mann, N.H., Carr, N.G., Eds., Plenum Press, New York.

- White, S.H., Duivenvoorden, L. J., Fabbro, L. D., Eaglesham, G. K., (2007). Mortality and toxin bioaccumulation in Bufo marinus following exposure to Cylindrospermopsis raciborskii cell extracts and live cultures. Environ. Poll. 147, 158–167.
- Wickstrom, M. L., Khan, S. A., Haschek, W. M., Wyman, J. F., Eriksson, J. E., Schaeffer, D. J., and Beasley, V. R. (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicol. Pathol.* 23:326–337.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005) Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology. 203: 201-218.
- Wu, M., Okino, T., Nogle, L.M., Marquez, B.L., Williamson, R.T., Sitachitta, N., Berman, F. W., Murray, T.F., McGough, K., Jacobs, R., Colsen, K., Asano, T., Yokokawa, F., Shioiri, T., Gerwick, W.H., (2000). Structure, synthesis, and biological properties of kalkitoxin, a novel neurotoxin from the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. J. Am. Chem. Soc. 122, 12041–12042.
- Zotina, T., Koster, O., Juttner, F., 2003. Photoeterotrophy and light-dependent uptake of organic and organic nitrogen compounds by Planktothrix rubescens under low irradiance. Freshwater Biol. 48, 1859–1872.

10. Függelék

1. függelék A PCR reakciók hőprogramjainak paraméterei

A PCR program paraméterei a Microcystis sp. mikrocisztin génklaszterének vizsgálata esetén:

- 1. kezdeti denaturáció 94 °C 5 perc
- denaturáció 95°C 1 perc, annealing hőmérséklet 1. táblázat alapján 30 másodperc, extenzió 72 °C 1perc →35 cikluson keresztül
- 3. végső extenzió 72°C 7 perc

A PCR program paraméterei a *Planktothrix* sp. mikrocisztin génklaszterének vizsgálata esetén:

- 1. kezdeti denaturáció 96°C 5 perc
- denaturáció 96 °C 1 perc, annealing hőmérséklet 1. táblázat alapján 30 másodperc, extenzió 72°C 1perc →35 cikluson keresztül
- 3. végső extenzió 72°C 10 perc

A PCR program paraméterei a *P. rubescens mcy* génklászterében található mutációk detektálásához (2 kb, 500 bp):

- 1. kezdeti denaturáció 94°C 3 perc
- denaturáció 94°C 30 másodperc, annealing hőmérséklet 2. és 3. táblázat alapján 1 perc, extenzió 72°C 2 perc →35 cikluson keresztül
- 3. végső extenzió 72°C 10 perc

Primer	Bázispárok száma	Forward szekvencia	T _m (°C)	Reverse szekvencia	T _m (°C)
	Szama				
1	452–2022	ATTGATCCCCTGATCAATGATCA	62,5	GCTAAACTGGGGGCCATTGAGA	63,5
2	2002–4050	TCTCAATGGCCCCAGTTTAGC	63,5	CGCTGGCTAATACTCCCTCG	62,7
3	4031-6021	CGAGGGAGTATTAGCCAGCG	62,7	TTTGCATGGAAAGGGATCAATC	63,1
4	6000-8002	GATTGATCCCTTTCCATGCAAA	63,1	GATCGCTTCCCTGGGAATAATG	63,9
5	7981–10011	CATTATTCCCAGGGAAGCGATC	63,9	TGACCGATGGGTTTACCTGTG	62,9
6	9991–12009	CACAGGTAAACCCATCGGTCA	62,9	CCCAGTTTTCCCAAACCTCC	62,7
7	11990–13989	GGAGGTTTGGGAAAACTGGG	62,7	TCTCCACGCCCATAGCCAT	63,8
8	13971–16000	ATGGCTATGGGCGTGGAGA	63,8	CTGGCGGATTTCGAGTTGAT	62,3
9	15981–18021	ATCAACTCGAAATCCGCCAG	62,3	GCGGCCAGATTAGACTGCATT	63,6
10	18001–20076	AATGCAGTCTAATCTGGCCGC	63,6	GCGATGAGTGTCTGTTTAGTCCG	63,2
11	20054–21990	CGGACTAAACAGACACTCATCGC	63,2	GATTTCCCGGTTTCATTGAGTG	62,7

2. függelék *Planktothrix rubescens* teljes *mcy* génklasztrét lefedő primerpárok (Kurmayer és mtsai., 2005).

12	21969–23983	CACTCAATGAAACCGGGAAATC	62,7	TTAGCAGCATTGGCTAAGACTGC	62,9
Primer	Bázispárok száma	Forward szekvencia	T _m (°C)	Reverse szekvencia	T _m (°C)
13	23961–25999	GCAGTCTTAGCCAATGCTGCTAA	62,9	GTTGTGAGATTGTTGGCGCC	63,8
14	25980–28065	GGCGCCAACAATCTCACAAC	63,8	CTGAAATAACGGTATGTTGATCGGT	62,3
15	28042-30072	CCGATCAACATACCGTTATTTCAG	62,3	GTTGCGCTTGAATGAAACGG	63,8
16	30053-32040	CCGTTTCATTCAAGCGCAAC	63,8	GTCCTTTGGGGTCTGTTGGATAC	62,9
17	32010-34020	GTATCCAACAGACCCCAAAGGAC	62,9	AAGGCTCCCGTTGCTAAAAC	63,1
18	34001-36035	GTTTTAGCAACGGGAGCCTT	63,1	CGGGAATGGGTTCTCCTGTATAA	63,2
19	36013-38042	TTATACAGGAGAACCCATTCCCG	63,2	AGGAAGCCACACTCCAACCAT	63
20	38022-40022	ATGGTTGGAGTGTGGCTTCCT	63	CTGTTAATTCGGGACGATGGAG	62,8
21	40001-42060	CTCCATCGTCCCGAATTAACAG	62,8	TTGTCATGGATGTGACGAGCA	63,3
22	42060-44052	TGCTCGTCACATCCATGACAA	63,6	CTGATTGGACAGAACTGCTTGGA	63,7
23	44030-46036	TCCAAGCAGTTCTGTCCAATCAG	63,7	GGTAAATGAACGCGGGGAAT	63

24	46017-48031	ATTCCCCGCGTTCATTTACC	63	AATCGTCCCAAGTCTCCGGTA	62,9
Primer	Bázispárok száma	Forward szekvencia	T _m (°C)	Reverse szekvencia	T _m (°C)
25	48011-50000	TACCGGAGACTTGGGACGATT	62,9	GACCGCCCATTCTAGCGATT	63,5
26	49981–51970	AATCGCTAGAATGGGCGGTC	63,5	AAAACCAAGGGCAGGAGGAA	63
27	51951–54058	TTCCTCCTGCCCTTGGTTTT	63	GTGAGTGCCATCCTGACAGCTAT	62,7
28	54036-55470	ATAGCTGTCAGGATGGCACTCAC	62,7	GCACCCTAACTAACTCTGCAATCG	63,3

3. függelék *Planktothrix rubescens mcy* génklasztrében talált deléciók és inszerciók a vizsgálatához használt primerpárok

Primor	Pozíció	Forward szekvencia		Reverse szekvencia	
1 milei			()		()
1	2	CAAGCGCGCCGCA	46	TCGCTATTGATCATTGATCAGGG	60
2	474	AATAGCGATTTTCCCAAGCATTC	57	TGGTCACAGTATGGGCGGAT	60
3	925	ATCCGCCCATACTGTGACCA	59	TTCTTTAGGTCGTTAGGCTCCATT	58
4	1399	AATGGAGCCTAACGACCTAAAGAA	59	AAAACACCTGTCTTGCCGATTC	59
5	1851	GAATCGGCAAGACAGGTGTTTT	58	TCATTATTAACTGCTGTTCCTCGAA	58
6	2308	AGGAACAGCAGTTAATAATGATGGC	59	TTGGTTCCCGATGCTCCA	60
7	21880	GCCAGTTTACATGATTCCTAGTTACTTTAT	58	CATTCCATAGGCATTATGATTTTGA	58
8	22341	ATAATGCCTATGGAATGCCCAG	59	TTGCCAGTCAGTATAATCTTTATAGTGAATT	58
9	22786	AATTCACTATAAAGATTATACTGACTGGCAA	58	AAAGGATATTCTTGATTTTCATAAGCCT	58
10	23161	AGTCCTGCGGGATCAAATTAGA	59	AAAATCTTCAGCGAATAAGTCGCT	59
11	23612	AGCGACTTATTCGCTGAAGATTTTAA	60	AAGCCCATCTAAAATATTGAGAGCA	58
12	24003	CCCTATATTGGAAATGATGTAACCG	59	TGCCAGAAGTAAATAGTAATAAGGCTTGA	60
13	24458	TCAAGCCTTATTACTATTTACTTCTGGCA	60	AATGCTGGTTTAATGGCTCTATCTG	59
14	24911	AGATAGAGCCATTAAACCAGCATTTG	60	AATAAGTCAGTCTCTTGGATTTGATCAA	59
15	25341	GCATTCGCCCTCTTTGATCA	60	CAGCTATAGGTAACTGACGATTAAAAAGTTT	59
16	25761	CGAGTACAAACCAACTAGAAAAACTTT	59	ACATTCCCAACTCGATTGTAGGA	59

(Christiansen és mtsai., 2006).

17	26209	TCCTACAATCGAGTTGGGAATGT	59	AAAATAGTTCCTTGGGCTTGAGAA	58
Primer	Pozíció	Forward szekvencia	T _m (°C)	Reverse szekvencia	T _m (°C)
18	51608	CCAAAACCCGATCAAAGATCA	58	TGATCGATTAATTCTGCATATTGTTCTA	58
19	51990	TGGCTGATTATTTAACGGATTATACTATCT	58	GCTTGTATCCAATCATCTTCAACATC	59
20	52442	GATGTTGAAGATGATTGGATACAAGC	59	GTAGTTTCTTCTTTCCAATAGCCAAAA	59
21	52889	TTGGCTATTGGAAAGAAGAAACTACTT	58	AAGTATGCCGATCATATTGATTAACAA	58
22	53363	TTGTTAATCAATATGATCGGCATACTT	58	TGCGCCCACAATTTGTCA	59
23	53843	TGACAAATTGTGGGCGCA	59	TAGCTTTGTTTCGATTTATATATATACCCC	59
24	54308	AAGCTACTATAAACTTTTTGACCAGGCA	60	AAAAATCATCAGGTTCTTTATCACCAT	58
25	54763	AAATAAATGGTGATAAAGAACCTGATGA	58	CCCCCTGAATTTTTACCGGA	60
26	55211	TGACTCCGGTAAAAATTCAGGG	59	GCAAATCTTCCTGCTCCGAG	59

4. függelék Különböző országokban megjelenő *M. aeruginosa* MC koncentrációi és formái

		Mikrocisztin		
Ország	Faj	koncentráció	Mikrocisztin variánsok	
		$(mg mL^{-1})$		
Franciaország	M. aeruginosa	5,06	[Dha ⁷] MC-RR, MC-LR	
Görögország	M. aeruginosa	2,565	MC-LR, -RR, -YR, -LA	
Hollandia	M. aeruginosa	5,27	MC-LR, -RR, -LY	
Kenya	M. aeruginosa	19,8	MC-LR, -RR, -YR	
Lengvelország	M. aeruginosa,	1 687	MCIR PR VR	
Lengyelorszag	M. flos-aquae,	1,007		
Marokkó	Magnuginosa	8.8	[D-Asp ³] MC-LR,	
Watokko	M. der uginosa	0,0	MC-LR, -RR, -YR	
Németország	M. aeruginosa	5,595	MC-LR, -RR, -YR	
Olaszország	M. aeruginosa	1,16	MC-LR, -RR, -YR	
Portugália	M. aeruginosa	7 1	[D-Asp ³] MC-LR,	
Tortugalla		7,1	MC-LR, -RR, -YR	
Románia	M. aeruginosa	0,6	MC-LR, -RR, -YR, -WR	
Szlovénia	M. aeruginosa	1,0	MC-LR, -RR, -YR	

Ország	Faj	Mikrocisztin variánsok
Ausztria (Irsee-tó)P. rubescens		[D-Asp ³ , Dhb ⁷] MC-RR, [D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR, [Asp ³] MC-HtyR
Ausztria (Mondsee-tó)	P. rubecens	[D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR, [D-Asp ³ , Dhb ⁷] MC-RR
Ausztria (Schwarzensee-tó)	P. rubescens	[D-Asp ³ , Dhb ⁷] MC-RR
Ausztria (Wannsee-tó)	P. agardhii	[D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR, [Asp ³] MC-LR
Japán (Kasumigaura-tó)	P. agardhi	[Asp ³] MC-HtyR, [Asp ³] MC-LR
Lengyelország	P. agardhii	[D-Asp ³] MC-LR, [D-Asp ³] MC-YR, [D-Asp ³] MC-RR
Nagy- Britannia (Blelham-tó)	P.agardhii	[Asp ³] MC-HtyR, [Asp ³] MC-LR
Németország (Ammersee-tó)	P. rubescens	[D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR, [D-Asp ³ , Dhb ⁷] MC-RR
Németország (Plößsee, Plön)	P.agardhii	[D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR, [Asp ³] MC-LR
Norvégia (Steinsfjorden- tó)	P. rubescens, P. agardhii	desmethyl- MC-RR és LR
Olaszország (több tó)	P. rubescens	[Dha ⁷] MC-RR, [D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷] MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR
Svájc (Zürichi-tó)	P.rubescens	[D-Asp ³ , Dhb ⁷] MC-RR, [D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR
Svájc (Hallwilersee- tó)	P. rubescens	[D-Asp ³ , Dhb ⁷] MC-RR, [D-Asp ³ , Mdha ⁷] MC-RR, [Asp ³] MC-LR
Szlovénia (Bled-tó)	P. rubescens	[D-Asp ³] MC-RR, [D-Asp ³ , D-Glu (OMe) ⁶] MC-RR
Spanyolország (El Atazar-tó)P. rubescens		[D-Asp ³] MC-RR, [Dha ⁷] MC-RR vagy [D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷] MC-RR

5. függelék Különböző országokban megjelenő P. agardhii és P. rubescens MC formái

11. Publikációs lista

Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények

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.

Az értekezés témakörében elhangzott előadás vagy poszter

Vasas G, Bácsi I, Gonda S, Gyémánt Gy, Farkas O (2008) Magyarországi *Planktothrix rubescens* vízvirágzás vizsgálata és toxintermelésének jellemzése. In: Bíró Péter, Reskóné Nagy Mária, Kiss Keve Tihamér (szerk.)L. Hidrobiológus Napok: A hazai hidrobiológia 50 éve.Konferencia helye, ideje: Tihany, Magyarország, 2008.10.01-2008.10.03. Tihany: MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézete - MHT Limnológiai Szakosztály, p. na.

Egyéb megjelent vagy közlésre elfogadott közlemény

Szabó S, Roijackers R. M. M, Scheffer M, Braun M, Borics G, Farkas O(2007)A szubmerz növények békalencsékre 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.

Egyéb előadás és poszter

Farkas O, Szabó S, Borics G (2006) Új módszer a békalencsék intraspecifikus kompetíciójának vizsgálatához.48. Hidrobiológus Napok, Tihany. 2006. október. poszter.