



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

The effects of sulfate, phosphate or combined nitrogen  
starvation on cylindrospermopsin production of the toxic  
cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Bácsi István

Debreceni Egyetem, TTK, Növénytani Tanszék  
Debrecen, 2007.

## 1. BEVEZETÉS

Gyakori probléma napjainkban a Föld felszíni vizeinek szennyeződése, és ennek következményei: az élőhelyek drasztikus átalakulása, az élőlények pusztulása, és egyes esetekben a mikrobiális tömegprodukciónak. Az eutrofizációt, mint a környezetszennyezés egyik következményeként számon tartható jelenséget, a 20. század közepén ismerték fel; azóta a jelenség jelentős károkat okozott a vízi környezetben, komoly nehézségek mutatkoztak, és mutatkoznak napjainkban is a vízhasználatban, horgásztavak, természetes fürdőhelyek vizének kezelésében, és sok esetben az ivóvízkezelésben is (Corus és Bartram, 1999). A vízhasználatot és -kezelést érintő problémák része az eutrofizáció alkalmával megfigyelhető vízvirágzás, azaz a planktonszervezetek (cianobaktériumok és eukarióta algák) tömeges elszaporodása. A foszfor az egyik legfontosabb elem, amely szerepet játszik a planktonszervezetek tömegprodukciónak szabályozásában, emellett a rendelkezésre álló kötött nitrogén mennyisége mutatkozik meghatározónak. Az eukarióta algákkal szemben a cianobaktériumok több képviselője nitrogénkötő képessége révén független a kötött nitrogén mennyiségétől, ezáltal csökken azon tényezők száma, amelyek együttes megléte szükséges az ilyen fajok tömegprodukciónak kiváltásához (Corus és Bartram, 1999).

A közelmúltban terjedt el széles körben az a felismerés, hogy a cianobakteriális toxinok megjelenése a felszíni vizekben humán-egészségügyi problémákat okozhat (Falconer, 1993; Bell és Codd, 1994). A cianobaktériumok számos speciális metabolitot termelnek, amelyeknek természetes funkciója nem világos, jóllehet több közülük kedvezőtlen hatással van más élőlényekre. A cianotoxinok mind kémiai, mind toxikológiai szempontból a természetes toxinok egy igen változatos csoportját képviselik. Az első megismert cianotoxinok sokkal veszélyesebbnek mutatkoztak a szárazföldi gerincesekre, mint a vízi élőlényekre. Néhány cianotoxin erős idegméreg, mások elsősorban a májat károsítják, megint mások gastroenteritis-hez hasonló egészségromlást idéznek elő (Chorus és Bartram, 1999). A legújabb kutatási eredmények azt bizonyítják, hogy a cianotoxinok hatással lehetnek a fito- és zooplankton képviselőire és a magasabb rendű növényekre is. A cianotoxinok az elpusztuló baktériumsejtekből a vízbe kerülve a vizet fogyasztó vad- és haszonállatokra, de a vezetékrendszerbe kerülve az emberre is potenciális veszélyt jelenthetnek (Chorus és Bartram, 1999).

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

és Bartram, 1999). A cianobakteriális toxintermelés vizsgálata során kevés környezeti faktorról sikerült bizonyítani, hogy a toxintermelést jelentősen befolyásolja, különösen igaz ez a cilindropermopszin termelő cianobaktériumokra. Sok tekintetben nyitott a kérdés, hogy vajon bizonyos környezeti tényezők változása hatással van-e az egyes sejtek toxintartalmára? Mivel nem világos a toxinok ökológiai szerepe, a toxicitást növelő vagy csökkentő ökológiai faktorok vizsgálata nem könnyű feladat.

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

- A különböző éhezési körülmények között milyen fénymikroszkóppal nyomon követhető morfológiai változások figyelhetők meg, a nitrogénéhezés esetén hogyan alakul a heterociszta frekvencia?
- Hogyan alakul az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése megfelelő kén-, foszfor-, illetve nitrogénellátottság esetén, illetve a kén-, foszfor-, valamint a nitrogénéhezés körülményei között?
- Hogyan változik az egyes tápelemek (kén, foszfor, nitrogén) metabolizmusában kulcsszerepet betöltő enzimek - az ATP-szulfuriláz, a periplazmatikus alkalikus foszfatáz, a nitrogenáz komplex - megjelenése, aktivitása a különböző tápelem-éhezési körülmények között?
- Van-e összefüggés, a cianotoxintermelés és a kén-, foszfor-, illetve nitrogénellátottság között és az hogyan jellemezhető? A nitrogénkötés során képződő heterociszták a vegetatív sejtekhez hasonlóan termelnek-e cilindropermopszint?

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. Az *A. ovalisporum* tenyésztése

Munkánk során az izraeli Kinneret-tóból izolált toxikus *Aphanizomenon ovalisporum* törzssel dolgoztunk (ILC-164). Az izolátum a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékének törzsgyűjteményében BGSD-423 jelöléssel szerepel. A törzs fenntartására, illetve tenyésztésére egyszeres ásványianyag tartalmú Allen médiumot használtunk (Allen, 1968).

A vizsgálatainkhoz szükséges tenyészetek létrehozásához exponenciális növekedési fázisban lévő, steril levegővel buborékolatott *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetből a sejteket laboratóriumi hőmérsékleten (20-25°C) centrifugáltuk (6000×g, 10 perc Beckman Avanti J-25), majd az adott tápelemet nem tartalmazó tápoldatban reszuszpendáltuk.

- Szulfátéhezés (-S) esetén a tenyészeteket szulfátot nem tartalmazó Allen médiumban neveltük. A szulfátot visszacapott (-+S) tenyészetet a tenyésztés első 48 órájában szulfátmentes Allen médiumban neveltük, amelyhez a tenyésztés 48. órája után a térfogatnak megfelelő mennyiségű szulfátot adtunk  $MgSO_4$  formájában.
- Foszfátéhezés esetén (-P) foszfátot nem tartalmazó Allen médiumban neveltük a tenyészeteket. A tápoldat  $K_2HPO_4$  formájában tartalmazza a foszfátot, a foszfátmentes tápoldatban a káliumot KCl-dal pótoltuk. A foszfátot visszacapott (-+P) tenyészetet a tenyésztés első 168 órájában foszfátmentes Allen médiumban neveltük, a tenyésztés hetedik napján a térfogatnak megfelelő mennyiségű foszfátot adtunk a tenyészetekhez  $K_2HPO_4$  formájában.
- Kötött nitrogén hiányában nevelt tenyészet (-N) speciális esetet képvisel. A kontroll körülmények között nevelt tenyészet a teljesen nitrogénmentes táptalajba való átoltást nem viseli el, ezért a kötött nitrogénéhezéshez az inokulumot centrifugáltuk (6000×g, 10 perc, Beckman Avanti J-25), a sejteket 0,18 mM nitrogéntartalmú médiumban (a nitrogéntartalom az eredeti - kontroll - Allen médium nitrogéntartalmának 2%-a) reszuszpendáltuk. A tápoldatban a nitrogén  $NH_4NO_3$  formájában volt jelen. Az így indított tenyészetet tekintjük -N tenyészetnek. -+N tenyészet esetén a tenyésztés első felében (168 órán át) 2% nitrogéntartalmú Allen médiumban nevelt tenyészet, majd a tenyésztés hetedik napján a térfogatnak megfelelő mennyiségű nitrátot adtunk a tenyészetekhez  $NaNO_3$  formájában.
- Belső kontrollként alkalmaztunk olyan tenyészeteket, amelyeknél a tápeleméhezés nem nulla időpontban, hanem a tenyésztés során kezdtük el (+-S, +-P, illetve +-N).

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

## 2.2. A fénymikroszkópos morfológiai vizsgálatok

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

## 2.3. A tenyészetek növekedésének nyomon követése

A tenyészetek növekedése alatt a klorofill-a és a fehérjetartalom, a száraz tömeg illetve a sejtszám változását értjük, a kísérletek során e paraméterek változását követtük nyomon.

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

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

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

feltárását háromszori fagyasztással érték el. A kivonatok fehérjetartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford, 1976).

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

## 2.4. A heterociszták izolálása

A heterociszták izolálásához a Smith és munkatársai (1988) által kidolgozott módszert alkalmaztuk, kis módosításokkal. Nagy mennyiségű heterociszta előállításához 8 l nitrátmentes Allen tápoldatot oltottunk be 400 ml egy hetes nitrátéheztetett (aktív heterocisztákkal rendelkező) inokulummal. A tenyészetet az exponenciális növekedési fázis végéig (9-10 nap) neveltük. A 10. napon a tenyészetet centrifugáltuk (6000×g, 10 perc Beckman Avanti J-25), majd lizozim tartalmú szuszpenziós közegben vettük fel. A lizozim a sejtfalat elbontja, a heterociszták speciális burka azonban hosszabb ideig ellenáll az emésztésnek, mint a vegetatív sejtek „hagyományos” Gram-negatív sejtfala. A széteső fonalak illetve vegetatív sejtek közül a más ülepedési sajátságokkal bíró heterociszták differenciál-centrifugálással elválaszthatók.

## 2.5. Enzimológiai vizsgálatok

### 2.5.1. Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának mérése

Az ATP-szulfuriláz enzim aktivitását a Lappartient és Touraine (1996) által leírt módszer módosításával mértük. Az enzimreakció első lépésében a reakcióelegyet 37 °C-on egy órán át inkubáltuk, majd a reakciót 100 µl 20%-os SDS hozzáadásával állítottuk le (500 µl reakcióelegy tartalma: 80 mM Tris-HCl puffer pH 8,0; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM Na<sub>2</sub>ATP; 1 egység *E. coli* inorganikus pirofoszfát és 12 µl nyerskivonat). A második lépésben az első reakció során felszabadult szerves foszfát (P<sub>i</sub>) mennyiségét ammónium-molibdenátot tartalmazó komplexképző segítségével spektrofotometriásan határoztuk meg (Cooper, 1977). A szerves foszfát mennyiségének ismeretében specifikus enzimaktivitást számoltunk (µM P<sub>i</sub> × mg fehérje<sup>-1</sup> × óra<sup>-1</sup>).

### 2.5.2. Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának mérése

Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitását Ihlenfeldt és Gibson (1975) módszere szerint *in situ* mértük. A tenyészetekből Eppendorf csövekbe 100  $\mu$ l-t mértünk és 500  $\mu$ l 0,4 M Tris-HCl (pH 9,0) oldatot adtunk hozzá. Ezt követően 500  $\mu$ l 8 mM pNPP-t (para-nitro-fenil-foszfát) adtunk a rendszerhez és 10 percig inkubáltuk. Az inkubálást 25°C-on, sötétben végeztük. Az enzimreakció a pNPP hozzáadásával kezdődött, a reakciót 500  $\mu$ l „stop oldat” reakcióelegyhez pipettázásával állítottuk le, amely oldat 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-ot tartalmazott 1 M NaOH-ban oldva. A reakcióelegyet fél percig 1000 $\times$ g-vel centrifugáltuk (Fisher Model 59A) és a pNPP-ből átalakított pNP mennyiségét 400 nm-en, a felülúszóból spektrofotometriásan határoztuk meg a sejteket nem tartalmazó eleggyel szemben. A fényabszorpció alapján optikai denzitás különbséget, majd a fehérjetartalom ismeretében specifikus enzimaktivitást számoltunk (átalakított mM pNPP  $\times$  mg fehérje<sup>-1</sup>  $\times$  óra<sup>-1</sup>,  $\epsilon = 1,83 \times 10^4$ ).

### 2.5.3. A nitrogénáz enzimkomplex kimutatása a nitrogénéhezés (molekuláris nitrogén kötés) körülményei között

A nitrogénáz enzimkomplex kimutatásához minden nap 2 ml mintát gyűjtöttünk a kötött nitrogént nem tartalmazó tenyészetekből. Első lépésben a fehérjék szétválasztása történt meg gélelektroforézis segítségével (Laemmli, 1970). A futtatás SDS tartalmú, 7,5 %-os akrilamid gélen, Mighty minigél rendszerben zajlott.

A szétválasztott fehérjék transzferálásához a Gershoni és munkatársai (1985) által kidolgozott blottolási eljárást alkalmaztuk néhány módosítással. A gélen szétválasztott fehérjék membránra transzferálása Hoefer típusú blottoló készülékben zajlott.

A nitrogénáz enzimkomplex specifikus kimutatásához a Towbin és Gordon (1984), Govezensky és munkatársai (1991), illetve a Jeong és Jouanneau (2000) által leírt immunológiai módszereket dolgoztuk át a munkánk támasztotta követelményeknek megfelelően. Elsődleges ellenanyagként az AgriSera anti-nitrogénáz (NifH) immunglobulint alkalmaztuk, a másodlagos ellenanyaggal való jelöléshez a Sigma által gyártott alkalikus foszfatázzal kapcsolt másodlagos ellenanyagot (anti-chicken IGG alkaline phosphatase conjugate) használtuk

A nitrogenáz enzimfehérje (antigén) és az ellenanyagok között kialakított komplex kimutatására (előhívás) a Sigma szubsztrát oldatát használtuk (BCIP-NBT; 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát – nitro-blue-tetrazoliumklorid). A szubsztrát oldattal való reakció eredményeként színes (ibolyásvörös) folt jelent meg a nitrocellulóz membránon ott, ahol az ellenanyagok az antigénhez kötődtek.

## **2.6. A toxintartalom meghatározása**

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

Az elektroforetikus módszerek közül a cilindropermopszin molekula fizikai-kémiai sajátosságai miatt a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiás (MEKC) módszert választottuk a meghatározáshoz. A legfontosabb paraméterek optimalizálásával a kidolgozott eljárás alkalmas a cilindropermopszin elválasztására és kvantitatív meghatározására. A pufferelektrolittal beállított lúgos közegben a 280 nm-en való detektálást találtuk a legoptimálisabbnak. A kapott eredményekből száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatva számítottuk a cianotoxin-tartalmat.

## **3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK**

### **3.1. Morfológiai változások a különböző éhezési körülmények között**

Mind szulfát, mind foszfát, mind pedig nitrát hiányában jelentős változások következnek be az *A. ovalisporum* sejtek morfológiájában.

A fénymikroszkóppal megfigyelhető változások már igen korán, a tenyésztés első néhány napjában lezajlanak kénéhezés során. Kén hiányában a sejtek granuláltsága már a második napra jelentős mértékben megváltozott, a 4.-6. napra a sejtek tovább fokozódó granuláltsága mellett jellegzetes, nagyméretű, amorf sejtek voltak megfigyelhetők. A tenyésztés végére a fonalak feldarabolódása és kiüledése jellemző.

Foszfor hiányában a sejtek megnyúltabbak, a fonalak vékonyabbak, mint a kontroll esetében, a tenyésztés végére a vegetatív sejtek homogénné



váltak. A vegetatív sejtek egy kis hányada akinétává differenciálódott a foszforéheztetett tenyészetekben, azonban nem beszélhetünk a foszforéhezés során statisztikusan értékelhető jelenségről az általunk vizsgált törzs esetében.

Nitrát hiányában a Nostocales rendre jellemző morfológiai átalakuláson megy át a vegetatív sejtek egy része: a légköri nitrogén megkötésére képes heterociszták jönnek létre. A proheterociszták a harmadik napon jelentek meg a fonalakban, a tenyésztés végére a heterociszta frekvencia meghaladta a 8%-ot.

### **3.2. Az *A. ovalisporum* tenyészetek növekedése a különböző éhezési körülmények között**

A kontroll, azaz szulfátot, foszfátot illetve nitrátot optimális mennyiségben tartalmazó tenyészethez képest mind a kénéheztetett, mind a foszforéheztetett, mind pedig a kötött nitrogén hiányában nevelt tenyészetben a növekedés gátlást szenvedett. A gátlás különböző mértékű a különböző éhezési körülmények között.

Legnagyobb mértékű növekedésgátlás a kénéheztetett tenyészetben mérhető. A foszforéheztetett tenyészetek növekedése ennél jóval jelentősebb, 6-8-szoros növekedés tapasztalható a 14. napra, a kiindulási állapothoz képest. Megállapítható, hogy a foszforéheztetett tenyészet növekedése nem áll le, mint az a kénéhezés során tapasztalható, hanem a 14. napig fennmarad.

A jelenség magyarázatára a következőket mondhatjuk: szulfát hiányában a tenyészet 72-96 óra alatt olyan mértékű károsodást szenved, hogy ekkor már a szulfát visszaadása után sem képes regenerálódni. A szulfátéhezés során, a más cianobaktériumoknál is megfigyelt változások zajlanak le, azaz a fikobiliprotein-tartalom drasztikusan csökken, a sejttér fogat nagy részét granulumok töltik ki (Ortega-Calvo és Stal, 1994; Ariño *et al.*, 1995). Az *Aphanizomenon ovalisporum* sejtek – az irodalmi adatok alapján a cianobaktériumokra általánosan jellemzőnek tekinthető módon – nem képesek nagy mennyiségű kén felhalmozására és annak valamilyen formában történő raktározására.

Foszforéhezés során az irodalomban más cianobaktériumokkal kapcsolatban már ismert jelenségek figyelhetők meg az *A. ovalisporum* esetében is: a tenyészetek sárgulni kezdenek, csökken a növekedés üteme, de nem olyan mértékben, mint a szulfátéhezés során. Ezeket a jelenséget korábban unicelluláris cianobaktériumoknál is megfigyelték (Collier és Grossman, 1992). A fonalas fajok esetén többek között az *Anabaena variabilis* egyik törzsét tanulmányozták részletesen (Healey, 1982), amely a foszfát teljes hiányában még egy hét után is növekedést mutatott. A

növekedési adatok alapján elmondható, hogy a sejtek képesek nagy mennyiségű foszfor felhalmozására és annak az anyagcserében, így a növekedési folyamatokban való felhasználására. A foszforraktárak kimerülése után azonban, legkésőbb a 16-18. napra a tenyészet összeomlik.

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

### 3.3. Az enzimológiai vizsgálatok eredményei

A tápelemek hiánya nemcsak a tenyészetek növekedésének dinamikájában okoz változásokat, de az adott tápelem metabolizmusában kulcsfontosságú enzimek expressziójában is. Az enzimológiai vizsgálatok során kimutattuk az adott tápelem metabolizmusában szereplő kulcsenzimek indukcióját.

Meghatároztuk az *A. ovalisporum* ATP-szulfuriláz enzimének pH optimumát, valamint megállapítottuk, hogy a szulfát hiánya az enzim aktivitásában kb. hússzoros növekedést indukál. A fonalas cianobaktériumok esetében kevés adat található az irodalomban az ATP-szulfuriláz enzim jellemzésére vonatkozóan, a *Spirulina platensis*, valamint egy *Anabaena cylindrica* törzs esetében az enzimaktivitás növekedéséről számoltak be (Menon és Varma, 1978; Sawney és Nicholas; 1977). A dolgozatban bemutatott, az ATP-szulfuriláz indukciójára vonatkozó adatok az első eredmények az *A. ovalisporum* esetén.

A foszfátéhezés körülményei között az alkalikus foszfatáz enzim aktivitása a tenyésztés teljes ideje alatt emelkedett, a tenyésztés végére a kiindulási érték harmincszorosára nőtt. Az enzim aktivitásának növekedése kloramfenikollal (specifikus prokarióta fehérjeszintézis inhibitor) gátolható, mindez a foszforlimitált körülmények között indukálódó *de novo* enzimszintézisre utal. A foszforéhezés során végzett enzimológiai vizsgálataink eredményei összhangban állnak az irodalmi adatokkal, melyek szerint a cianobaktériumokban az alkalikus foszfatáz rendszer indukálódik foszfát hiányában (Healey, 1982; DeMarsac és Houmard, 1993).

A kötött nitrogénformák csökkent mennyisége, majd hiánya a tápoldatban a vegetatív sejtek egy részének (kb. 8,5%-ának) heterocisztává

való differenciálódásához, a nitrogénáz enzim indukciójához vezetett az általunk vizsgált *Aphanizomenon ovalisporum* törzs esetében. Az irodalomban találunk példát arra vonatkozóan, hogy proheterociszták megjelennek, de aktív nitrogénáz nem mutatható ki (Elhai és Wolk, 1990; Ernst *et al.*, 1992). A kötött nitrogén hiányában mutatott növekedési paraméterek alapján, valamint a nitrogénáz enzimkomplex kimutatása során született adatok alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált *A. ovalisporum* törzsnél ez a jelenség nem áll fenn. A heterociszták megjelenése, a légköri nitrogén megkötésének elindulása megfigyeléseink alapján összhangban áll az *Anabaena* PCC 7120 törzssel kapcsolatban olvasható irodalmi adatokkal (Wilcox *et al.*, 1973). A kötött nitrogénformák csökkent mennyisége, majd hiánya a tápoldatban a nitrogénáz enzim indukciójához vezetett, az enzim jelenlétét, illetve mennyiségének növekedését immunológiai eljárással mutattuk ki a heterocisztákban.

### **3.4. A cianotoxin-tartalom változása a különböző éhezési körülmények között**

A különböző toxikus cianobaktérium törzsekkel végzett laboratóriumi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a környezeti tényezők sokféleképpen hathatnak az egyes fajok, sőt még ugyanazon faj eltérő toxint termelő, vagy ugyanazon faj ugyanazon cianotoxint termelő, de más élőhelyen előforduló törzseire is. A vizsgálatok egy része azt bizonyítja, hogy a cianobaktériumok több toxint termelnek kedvezőbb növekedési körülmények között (Chorus és Bartam, 1999). Az ellenkező esetre is van példa: Van der Westhuizen és Eloff (1983) tanulmánya szerint az általuk vizsgált *Microcystis aeruginosa* törzsnél a sejtek túl magas vagy túl alacsony pH mellett toxikusabbnak mutatkoztak. Az ásványi anyagok koncentrációjának hatása is nagy változatosságot mutat: Sivonen és munkatársai (1992, 1995) azt tapasztalták, hogy egy anatoxint termelő *Anabaena* törzs toxinszintjére a foszforhiány nem volt hatással, míg a hepatotoxint termelő törzsnél a toxinszint jelentősen csökkent a foszforékezés körülményei között. Orr és Jones (1998) egy *Microcystis aeruginosa* törzs mikrocisztin termelését vizsgálva arra a megállapításra jutott, hogy a toxintartalom a növekedési rátával egyenes arányban változik foszfor hiányában. Stolte és munkatársai (2002) egy másik hepatotoxin, a nodularin mennyiségét vizsgálta egy *Nodularia spumigena* törzs foszforlimitált tenyészetében, eredményeik alapján a toxintermelés és a növekedési ráta között nem volt kimutatható ilyen összefüggés.

Az előzőekben bemutatott vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a cianobakteriális toxinok termelésére vonatkozó irodalmi adatok

ellentmondásosak. A cianobaktériumok tápelem éhezése és cianotoxin termelése közötti összefüggések megértése a felszíni vizekben található, vízvirágzást okozó cianobaktériumok funkciója szempontjából alapvetően fontos. Kísérleteinket az előbbi cél alapján terveztük meg.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* ILC-164 fonalas cianobaktérium cilindropermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtek cilindropermopszin tartalma csökken le – azaz a cilindropermopszin termelésében részt vevő enzimek represszálódnak, vagy a cianotoxin lebontása fokozódik. Ha a toxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg, legnagyobb mértékben a kénéhezettett tenyészetben csökken a toxintartalom (a kiindulási érték 64-65%-kal csökkent 2 nap alatt). A foszfát hiányában mérsékeltebb csökkenést tapasztalhattunk (a kiindulási érték 47-48%-kal csökkent 2 nap alatt), míg nitrát hiányában volt a legkisebb mértékű a toxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 39-40%-kal csökkent 2 nap alatt). Nitrogénéhezés során a 6. naptól a cilindropermopszin mennyisége újra megnövekedett, ami a törzs nitrogénkötő képességével magyarázható. Amennyiben a toxintartalmat sejtszámra vonatkoztatva számítjuk, nincs számottevő különbség a kénéhezés és a foszforéhezés között; a cilindropermopszin mennyisége mindkét esetben a kiindulási érték 42-44%-ára csökken két napon belül. A nitrátmentes táptalajban nevelt tenyészet esetében itt is speciális dinamikával találkozunk, a fentebb említett nitrogénkötő képességnek köszönhetően. Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a nitrát hiányában differenciálódó heterociszták nem tartalmaznak cilindropermopszint, azaz anyagcseréjük a másodlagos anyagcseretermékek termelése tekintetében is átalakul, a cilindropermopszin termelés represszálódik.

A cianotoxin-tartalom csökkenésének mértékében a kénéhezettett tenyészetben különbséget detektáltunk annak függvényében, hogy a cilindropermopszin tartalmat száraz tömegre, vagy sejtszámra vonatkoztattuk. Ennek magyarázata a kénéhezettett sejtek megváltozott anyagcseréje lehet (glikogén, polihidroxi-vaajsav és egyéb tartalék tápanyagok felhalmozása), amely a száraz tömeget jelentősen befolyásolja. Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcsere-folyamatok szabályozásán túl hatással van a sejtek cilindropermopszin termelésének szabályozására is.

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

# **The effects of sulfate, phosphate or combined nitrogen starvation on cylindrospermopsin production of the toxic cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum***

Ph.D. thesis

Bácsi István

## **1. INTRODUCTION**

The contamination of the world's surface waters and its consequences are common problems: drastic changes in habitats, destruction of life forms and in some cases microbial mass production occur. Since the middle of the twentieth century eutrophication has become more widespread, it has caused deteriorations in the aquatic environment and serious problems for water use, particularly in drinking-water treatment (Corus and Bartram, 1999). Wherever conditions of temperature, light and nutrient status are conducive, surface waters may host increased growth of cyanobacteria and eukaryotic algae; this phenomenon is referred as a cyanobacterial or algal water-bloom. Phosphorous is the mayor nutrient controlling the occurrence of water blooms, although nitrogen compounds are sometimes relevant in determining the amount of cyanobacteria or algae present. However, in contrast to planktonic algae, some cyanobacteria are able to escape nitrogen limitation by fixing atmospheric nitrogen (Corus and Bartram, 1999).

Cyanobacterial toxins have recently become widely recognized as a human health problem arising as a consequence of eutrophication (Falconer, 1993; Bell and Codd, 1994). Cyanobacteria produce a variety of unusual metabolites, the natural function of which is unclear, although some elicit effect on other biota. The cyanotoxins are a diverse group of natural toxins, both from the chemical and the toxicological points of view. Most of the cyanotoxins that have been identified to date appear to be more hazardous to terrestrial vertebrates than to aquatic biota. Some of cyanotoxins are strong neurotoxins, others are primarily toxic to the liver, yet others cause

gastroenteritis (Chorus and Bartram, 1999). As the new data show, cyanotoxin may affect on phyto- and zooplankton and higher plants. Cyanotoxins can appear in high concentration in surface waters after the death and lysis of cyanobacterial cells and can cause health problems on the water consuming wild or domestic animals or human beings (Chorus and Bartram, 1999).

Studies on the occurrence, distribution and frequency of toxic cyanobacteria were conducted during the 1980s using mouse bioassay. Analytical methods suitable for quantitative toxin determination only became available in the late 1980s, but studies of specific cyanotoxins have been increasing since then (Chorus and Bartram, 1999).

The examination of the relationship between the availability of nutrients and cyanotoxin production is an important and interesting question both environmental and toxicological points of view, especially as there is less available information in the literature, how nutrient starvation interferes with cylindrospermopsin production. Since the ecological role of the cyanotoxins is yet unknown, the investigation of enhancing or lowering ecological factors of toxicity is a difficult problem.

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

The aims of the study are as follows:

- What kind of light microscopy-detectable morphological changes can be seen during the different nutrient starvations?
- How does the growth of *A. ovalisporum* cultures change in sulfate-, phosphate- or combined nitrogen limited media?
- How do the activities of the enzymes playing key role in the uptake of the given nutrient alter?
- Is there any connection between the cyanotoxin production and the nutrient deprivation of *A. ovalisporum*. Do the heterocysts differentiated during bound nitrogen limitation take part in cylindrospermopsin production?

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Strain and growth conditions

In our experiments cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon ovalisporum* strain ILC-164 from Lake Kinneret, Israel was used. The strain was coded BGSD-423 in the strain collection of Department of Botany, University of Debrecen. The cultures were grown in Allen medium (Allen, 1968).

Exponentially growing *A. ovalisporum* cultures were centrifuged at laboratory temperature (20-25 °C, 6000×g for 10 min, Beckman Avanti J-25) and the cell pellet was carefully washed twice with sterile nutrient free medium as it required. At zero time the washed cells were resuspended at the same densities in sterile prewarmed full medium (controls) or in media lack of the given nutrient.

- In the case of sulfate starvation (-S) the cultures were grown in sulfate free medium. Later sulfate supplemented cultures (-+S) were grown in sulfate free medium for 48 h and afterward the culture was supplemented with MgSO<sub>4</sub> solution.
- In the case of phosphorous starvation (-P) the cultures were grown in phosphate free medium. Since the medium contains phosphorous as K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, in the phosphate free medium the potassium was added as KCl. Later phosphate supplemented cultures (-+P) were grown in phosphate free medium for 168 h and afterward the culture was supplemented with K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution.
- The medium for nitrogen starvation contained 0,18 mM nitrogen as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (this is 2% of full medium nitrogen content) at zero time. The cultures grown in this medium called -N cultures. The nitrate supplemented (-+N) were grown in nitrate free medium for 168 h and afterward the culture was supplemented with NaNO<sub>3</sub> solution.
- As an internal control nutrient starvations were induced at the middle of experiments as well (for sulfate starvation at 48 h, for phosphate and bound nitrogen deficiency at 168 h, respectively). At predetermined time (each day) samples were collected and used for assays as described above.

## **2.2. Light microscopy studies**

The morphological changes during nutrient deprivation were followed with an OLYMPUS PROVIS AX 70 type microscope. 5 µl samples were collected from each culture for photography; the photos were taken at 1000× magnification, with an OLYMPUS CAMEDIA digital camera, in Bright Field and Polarized modes.

## **2.3. Measuring the growth of *A. ovalisporum* cultures**

The „growth of the cultures” was followed by the accumulation of chlorophyll-a, protein and dry mass and the increase of the cell number per milliliter.

The chlorophyll-a content was measured spectrophotometrically at 663 nm in 80% acetone (Bendall *et al.*, 1988). 200 µl samples were collected each day for determination of the changes in Chl-a content in a two weeks period.

For the determination of dry mass 3 ml samples were collected each day. The samples were centrifuged (6000×g, 3 min, Fisher Model 59A, USA) and the pellets were lyophilized and weighed with analytical scale.

For protein content analyses 2 ml samples were collected in each 8<sup>th</sup> hour, the samples were frozen and thawed three times to damage cell wall. After centrifugation the supernatants were assayed for protein (Bradford 1976). Protein content of the supernatant was used as an enzyme extract for enzyme assays, the specific enzyme activities were calculated on the basis of protein content.

Cell number per ml was determined from 5 µl culture samples in triplicate (all cells of filaments were counted microscopically using JENAVAL microscope, 300× magnification for filaments and 1000× magnification for cells).

## **2.4. Isolation of heterocysts**

For the isolation of metabolically active heterocysts, a slightly modified method of Smith *et al.* (1988) was applied. The cultures grown in combined nitrogen free medium were centrifuged at the end of exponentially phase (on the 9<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> day). The concentrated cell (filament) suspension was digested with lyozyme. The enzyme digests cell walls, but the special, thicker wall of heterocysts are resistant to lyozyme digestion. The Gram-negative cell walls of the vegetative cells are digestible. The heterocysts can be separated of



lysed vegetative cells by differential-centrifugation because of the existing difference of their specific gravity.

## **2.5. Enzyme assays**

### **2.5.1. ATP-sulfurylase assay**

The ATP-sulfurylase enzyme (ATPS) activity was measured by molybdate dependent formation of pyrophosphate method of Lappartient and Touraine (1996) with minor modification. 2 ml samples were centrifuged ( $6000\times g$ , 3 min Fisher Model 59A) and the pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8,0). The cell suspension was frozen and thawed three times to damage cell wall and after centrifugation protein content of the supernatant was used as an enzyme extract for ATP-sulfurylase assay and assayed for protein (Bradford 1976). Briefly, the 500  $\mu$ l enzyme reaction mixture contained 80 mM Tris-HCl buffer (pH=8,0), 7 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM  $Na_2ATP$ , 1 unit inorganic pyrophosphatase (from *E. coli*, Fluka, Germany) and 12  $\mu$ l crude extract. The enzyme assay mix was incubated for one hour at 37 °C and the reaction was stopped by addition of 100  $\mu$ l of 20 % SDS. The liberated inorganic phosphate was assayed by a modified version of molybdate-based method as described by Cooper (1977).

### **2.5.2. Alkaline phosphatase assay**

The measurement of in situ alkaline phosphatase (AP) activity was based upon the in situ method of Ihlenfeldt and Gibson (1975). 100  $\mu$ l samples were collected from the cultures and 500  $\mu$ l of 0,4 M Tris HCl buffer (pH=9,0) and 500  $\mu$ l 8 mM para-nitrophenyl-phosphate was added and incubated for 10 min at 25 °C in darkness. The reaction was stopped by adding 500  $\mu$ l of 0,2 M  $Na_2HPO_4$  in 1 M NaOH. The mixtures were centrifuged ( $1000\times g$  for 1/2 min, Fisher Model 59A) and liberation of p-nitrophenol was measured at 400 nm and  $\mu M$  pNP  $\times$  mg protein<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup> calculated. In enzyme assays (ATPS, AP) the complete reaction system stopped at zero time served as blank.

### 2.5.3. Detection of nitrogenase enzyme complex

For detection of nitrogenase enzyme complex 2 ml samples were collected throughout of experiments. The first step was the separation of the proteins by polyacrylamide gel electrophoresis in 7,5% gels (Laemmli, 1970) using a Mighty gel system.

To transfer of the separated proteins to nitrocellulose membrane the modified blotting method of Gershoni et al. (1985) was used.

For specific detection of nitrogenase enzyme complex an immunoassay was used as described earlier (Towbin and Gordon, 1984; Govezensky *et al.*, 1991; Jeong and Jouanneau, 2000). The primary antibody was the AgriSera anti-nitrogenase (NifH) immunoglobulin, the anti-chicken IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) was used as secondary antibody.

To develop the antigen (nitrogenase complex subunit) – antibody (IgG) complexes a substrate solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolphosphate–titroblue-tetrazoliumchloride (BCIP-NBT; Sigma) was used. Purple coloration can be seen on the nitrocellulose membrane, where the antibodies bound to the antigens.

### **2.6. Quantitation of cylindrospermopsin content of *A. ovalisporum* cells**

3 ml culture samples were centrifuged (6000×g for 3 min Fisher Model 59A) and the pellets and supernatants were lyophilized separately. The cyanotoxin (CYN) content was determined with the help of capillary electrophoresis as described by our laboratory earlier (Vasas et al. 2002).

We applied the micellar electrokinetic chromatography (MECK) among electrophoretic methods, because of the physico-chemical features of the cylindrospermopsin molecule. Optimizing the main parameters of the method is suitable for separation and quantitative determination of the cylindrospermopsin. We found that detection is optimal in alkaline electrolytes at 280 nm. The obtained data were normalized to the zero time controls which were chosen 100 % on basis of dry mass or cell number.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. Morphological changes during nutrient starvation**

Both sulfate and phosphate starvation and the lack of combined nitrogen led changes in the morphology of *A. ovalisporum* cells.

The changes of trichome and cell morphology were detectable within the first 3 days of sulfate deprivation. The 'granulation' of the cytoplasm increased, oversized, amorphous cell forms appeared. The trichomes were shortening and the fragments were dripping to the bottom of the culturing flask.

The trichomes became thinner, the cells interior turn homogenous in cultures lacking phosphate. A poor fraction of vegetative cells differentiated into akinetes during phosphorous starvation. This phenomenon occurred rather randomly than significantly in the studied *A. ovalisporum* strain.

Some of the vegetative cells differentiated into heterocysts under bound nitrogen limited conditions. The proheterocysts appeared on the 3<sup>rd</sup> day of culturing; the heterocyst frequency reached 8% at the end of the experiment (14 days).

#### **3.2. Nutrient starvation altered the growth of *A. ovalisporum***

Both sulfate phosphate and bound nitrogen starvation reduced growth but not in the same rate.

The sulfate starvation resulted in an immediate stop of growth, while phosphate starvation reduced it significantly although that was not completely abolished. The lack of sulfate damaged the culture within 72-96 hours so far, that the regeneration of the cells was impossible even with the readdition of sulfate. The cells of *A. ovalisporum* are not able to accumulate sulfate and they have no storage capacity for it. This phenomenon is in accordance with previous findings and seems to be a characteristic feature of cyanobacteria (Ortega-Calvo and Stal, 1994; Ariño *et al.*, 1995).

In contrast, both unicellular (Collier and Grossman, 1992) and filamentous cyanobacteria (Healey, 1982) have a substantial storage capacity for phosphorous, as it is widely discussed in the literature. However, after 16-18 days of phosphorous starvation the phosphate pools became exhausted, and the cultures collapsed.

The phycobiliproteins may serve as nitrogen pool in the cyanobacteria, as it can be read in the literature (Boussiba and Richmond, 1980). Our results

are in accordance with the previous data: the cultures yellowed primarily because of the disorganization of phycobiliproteins. After the differentiation of heterocysts, the growth of the cultures stabilized at a lower rate as it is described in the case of other filamentous nitrogen fixing species (Wolk, 1982, Haselkorn *et al.*, 1992).

### **3.3. Alteration of enzyme activity and induction of nutrient starved *A. ovalisporum* cultures**

By enzymological studies, an induction of the key enzymes of the metabolic pathways of the given nutrients was shown.

Our results clearly shows that lack of sulfate induced a significant, 20-fold increase of ATP-sulfurylase activity, one of the key enzyme of sulfate metabolism in filamentous *A. ovalisporum* cultures with a pH optimum of 8,0. Data of alteration of ATP-sulfurylase by sulfate deprivation are rare in the literature in the case of filamentous cyanobacteria. The increase of the enzyme activity of ATP-sulfurylase by sulfate starvation in *Spirulina platensis* and *Anabaena cylindrica* was discussed earlier (Menon and Varma, 1978; Sawney and Nicholas; 1977). Our data about the induction of ATP-sulfurylase activity in sulfate deprived cells are the first in the case of *A. ovalisporum*.

Phosphate starvation induced a significant and continuous 30-fold increase of in situ alkaline phosphatase enzyme activity. Chloramphenicol, a specific inhibitor of prokaryotic protein synthesis inhibited the increase of alkaline phosphatase activity this suggests a *de novo* protein synthesis. These results are in accord with previous findings that in cyanobacteria AP enzyme system is inducible by phosphate deficiency (Healey 1982, DeMarsac and Houmard 1993).

The lack of combined nitrogen led to the differentiation of some of the vegetative cells (8-10%) to heterocysts and the induction of nitrogenase enzyme complex in *A. ovalisporum*. In some cases proheterocysts appears but active nitrogenase is not detectable (Elhai and Wolk, 1990; Ernst *et al.*, 1992). The appearance of the heterocysts and the nitrogen fixation was in accord with previous findings published for *Anabaena* PCC 7120 (Wilcox *et al.*, 1973). The presence and the increasing amount of the 33 kDa subunit of dinitrogenase-reductase during bound nitrogen starvation were established by immunoblot method.

### **3.4. Alteration of cylindrospermopsin content of nutrient starved *A. ovalisporum***

There are several data in literature that environmental factors can induce changes in toxicity or toxin content of a cyanobacterial species or different strains of a species. The majority of studies indicate that cyanobacteria may produce more toxins under conditions which are more favorable for their growth (Chorus and Bartram, 1999). In contrast, *Microcystis* cells were found to be more toxic when grown at high and low pH (Van der Westhuizen and Eloff, 1983). The effects of the concentration of nutrients also show differences: in low concentrations of phosphorous anatoxin-a producing *Anabaena* strain produced less toxins but for hepatotoxic strains phosphorous had no effect (Sivonen *et al.*, 1992, 1995). Orr and Jones (1998) found in the case of a *Microcystis* strain that there is a direct linear correlation between the cell division and toxin production rates during phosphorous starvation. In a *Nodularia spumigena* strain it seemed most likely that nodularin production is not regulated by the growth rate under phosphorous limitation (Stolte *et al.*, 2002). These experiments show that there are contradictions in data of cyanotoxin production. It is fundamentally important to understand the relationship between the cyanotoxin production and nutrient availability, because of the function of the toxic cyanobacteria in surface waters.

We analyzed the alterations in cylindrospermopsin content of nutrient deprived cultures with the help of capillary electrophoresis. Sulfate or phosphate starvation, or the lack of bound nitrogen induced a decrease in cylindrospermopsin content, but not necessarily at the same rate.

The cylindrospermopsin content of sulfur-deficient cultures decreased dramatically – only 35% of the zero time level remained after 48 hours. Phosphorous starvation induced a moderate decrease in cylindrospermopsin content of the cells, 43-46% of zero time level remained after 48 hours. The cyanotoxin content of the cultures lacking combined nitrogen decreased to 61-62% of zero time level in 48 hours. The amount of cylindrospermopsin began to decrease after the 6th day and this phenomenon can be explained with the nitrogen-fixing ability of *A. ovalisporum*.

The difference observed between the sulfate- and phosphate-limited cultures on the basis of dry mass cannot be obtained if the changes of cyanotoxin content were counted per cell. The explanation of this phenomenon might be the metabolic changes induced by sulfate starvation stress (accumulation of granules, increasing dry mass etc.). The heterocysts, differentiated under nitrogen fixing conditions, do not contain cylindrospermopsin. The possible explanation of this phenomenon is not clear. The alteration of heterocyst metabolism may elucidate the measured changes of cyanotoxin content.

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

The capillary electrophoretic analysis of crude extracts of nutrient starved *A. ovalisporum* cells demonstrates for the first time a characteristic reduction of the pool size of cylindrospermopsin under the changes of environmental conditions. Our results add to the debate of literature concerning the pool size alterations of cyanotoxins. The cyanotoxin production of a given strain has its own regulation rules - the more detailed understanding of environmental control of cylindrospermopsin production needs further investigations, especially at gene regulation level.

## IRODALOMJEGYZÉK / REFERENCES

- Allen, M.M.** (1968) Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J PHYCOL* 4: 1-4.
- Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M. and Saiz-Jimenez, C.** (1995) Effect of sulfur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909. *ARCH MICROBIOL* 163: 447-453.
- Bell, S.G. and Codd, G.A.** (1994) Cyanobacterial toxins and human health. *REV MED MICROBIOL* 5: 256-264.
- Bendall, D.S., Bowes, J.M., Stewart, A.C. and Taylor, M.E.** (1988) Oxygen-evolving photosystem II particles from *Phormidium laminosum*. In: L. Packer and A.N. Glazer (eds.) *Cyanobacteria*, Vol. 167, Meth. Enzymol., pp. 272-280. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Boussiba, S. and Richmond, A.E.** (1980) C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *ARCH MICROBIOL* 125: 143-147.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *ANAL BIOCHEM* 72: 248-254.
- Chorus, I. and Bartram, J.** (1999) Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon London.
- Collier, J.L. and Grossman, A.R.** (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. *J BACTERIOL* 174: 4718-4726.
- Cooper, T.G.** (1977) Tools of Biochemistry. pp. 55-56. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto.
- DeMarsac, N.T. and Houmard, J.** (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli – new steps toward molecular mechanisms. *FEMS MICROBIOL REV* 104 (1-2): 119-189.
- Elhai, J. and Wolk, C.P.** (1990) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBIO J* 9: 3379-3388.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J-M., Tiwari, D.N. and Wolk, C.P.** (1992) Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J BACTERIOL* 174: 6025-6032.
- Falconer, I.R.** (1993) Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Gershoni, J.M., Davis, F.E. and Palade, G.E.** (1985) Protein blotting in uniform or gradient electric fields. *ANAL BIOCHEM* 144: 32-40.
- Govezensky, D., Greener, T., Segal, G. and Zamir, A.** (1991) Involvement of GroEL in *nif* gene regulation and nitrogenase assembly. *J BACTERIOL* 173 (20): 6339-6346.
- Haselkorn, R. and Buikema, W.J.** (1992) Nitrogen fixation in cyanobacteria. In: G. Stacy, R.H. Burris and H.J. Evans (eds) *Biological Nitrogen Fixation*, pp 166-190. Chapman and Hall, New York.
- Healey, F.P.** (1982) Phosphate. In: N.G. Carr and B.A. Whitton (eds): *The Biology of cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 105-124.

- Ihlenfeldt, M.J.A. and Gibson, J.** (1975) Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (*Synecococcus*). ARCH MICROBIOL 102: 23-28.
- Jeong, H-S. and Jouanneau, Y.** (2000) Enhanced nitrogenase activity in strains of *Rhodobacter capsulatus* that overexpress the *rfn* genes. J BACTERIOL 182 (5): 1208-1214.
- Laemmler, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. NATURE 227: 680 -685.
- Lappartient, A.G. and Touraine, B.** (1996) Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake in intact canola. PLANT PHYSIOL 111: 147-157.
- Menon, V.K.N. and Varma, A.K.** (1978) Adenosine 5'-triphosphate sulphurilase from *Spirulina platensis*. EXPERIENTIA 35: 854-855.
- Orr, P.T. and Jones, G. J.** (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures LIMNOL OCEANOGR 43 (7): 1604-1614.
- Ortega-Calvo, J.J. and Stal, L.J.** (1994) Sulphate-limited growth in the  $\text{N}_2$ -fixing unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* (Nägeli) PCC 6909. NEW PHYTOL 128: 273-281.
- Sawhney, S.K. and Nicholas, D.J.D.** (1977) Effects of adenine nucleotides and phosphate on adenosine triphosphate sulphurylase from *Anabaena cylindrica*. BIOCHEM J 164, 161-167.
- Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, L. and Rinehart, K.L.** (1992) Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. APPL ENVIRON MICROBIOL 58: 1321-1325.
- Sivonen, K., Namikoshi, M., Luukkainen, L., Färdig, M., Rouhiainen, L., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., and Niemelä, S.I.** (1995) Variation of cyanobacterial hepatotoxins in Finland. In: M. Munawar and M. Luotola (eds): The contaminants in the Nordic ecosystem: dynamics, processes and fate. Ecovision World Monograph Series. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands. 163-169.
- Smith, R.L., Van Baalen, C. and Tabita, R.** (1988) Isolation of Metabolically Active Heterocysts from Cyanobacteria. In: Methods in Enzymology 167: 490-495.
- Stolte, W., Karlsson, C., Carlsson, P. and Granéli, E.** (2002) Modeling the increase of nodularin content in Baltic Sea *Nodularia spumigena* during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures. FEMS MICROBIOL ECOL 41 (3): 211-220.
- Towbin, H. and Gordon, J.** (1984) Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. J IMMUNOL METHODS 72 313-340.
- Van der Westhuizen, A.J. and Eloff, J.N.** (1983) Effect of culture age and pH of medium on the growth and toxicity of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Z PFLANZENPHYSIOL 110: 157-163.
- Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, Gy., Batta, Gy., Gyémánt, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Grigorszky, I., Molnár, E. and Borbély, Gy.** (2002) Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by plant test (Blue-Green Sinapis Test) ANAL BIOCHEM 302: 95-103.
- Wilcox, M., Mitchison, G.J. and Smith, R.J.** (1973) Pattern formation in the blue-green alga, *Anabaena*. II. Controlled proheterocyst regression. J CELL SCI 13: 637-649.



**Wolk, C.P.** (1982) Heterocysts. In: N.G. Carr and B.A. Whitton (eds): The Biology of Cyanobacteria. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. 359-386.

## **A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE**

### **Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények**

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

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

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

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

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

### **Egyéb megjelent, vagy közlésre elfogadott közlemények**

Máthé Cs., M-Hamvas M., Vigvári T., Surányi Gy., Vasas G., **Bácsi I.**, Tóth E., Borbély Gy. (2003) Mikrocisztin LR-el kezelt, kalluszból regenerált

„mini” nádnövények szövettani vizsgálata. HIDR KÖZL 84. (5-6): 77-78.

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

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

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

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

### **Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek**

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

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

Vasas G., Gáspár A., Surányi Gy., Batta Gy., Gyémánt Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Grigorszky I., **Bácsi I.**, Borbély G. (2003) Capillary Electrophoretic Assay and Purification of Cylindrospermopsin, a Cyanobacterial Toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by Plant Test (Blue

Green Sinapis Test). 5<sup>th</sup> Balaton Symposium, Siófok, Hungary, 3-5. September, 2003. Poszter.

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

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

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

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

**Bácsi I.**, Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth Sz., Borbély Gy. (2006) A kén- és a foszforéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium cilindropermopszin termelésére. *XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6.* Poszterelőadás.

### **Egyéb előadások és poszterek**

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

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

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

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

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

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

Béres, V., **Bácsi, I.**, Surányi, Gy., Vasas, G., M-Hamvas, M., Tóth, Sz., Máthé, Cs., Kiss, K.T., Borbély, Gy. and Grigorszky, I. (2006) The interaction between *Cryptomonas ovata*, Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa*, Kützig (Cyanobacterium) species. *The 6<sup>th</sup> International Symposium on Use of Algae for Monitoring Large Rivers, Balatonfüred, Hungary, 12-16. September, 2006.* Poszter.

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











