

dc_819_13

**Algavirágzások környezetterhelése
és toxinjainak variabilitása**

MTA doktori értekezés tézisei

Vasas Gábor, PhD

Debreceni Egyetem

Debrecen
2014

1. Bevezetés és célkitűzések

Az elmúlt néhány évtizedben széles körben elterjedt az a felismerés, hogy az eutrofizáció következményeként felszíni vizeinkben megjelenő algatoxinok komoly természetvédelmi, humán-egészségügyi problémaként is jelentkezhetnek. A tömegesen megjelenő fotoszintetizáló planktonikus szervezetek egy része nagy választékban termelnek szokatlan metabolitokat, amelyeknek természetes funkciója nem világos, jóllehet több közülük hatással van más élőlényekre. E toxinok, mind kémiai, mind toxikológiai szempontból a természetes toxinok egy igen változatos csoportját képviselik. Annak ellenére, hogy vízi eredetűek, az első megismert algatoxinok sokkal veszélyesebbnek mutatkoztak a szárazföldi gerincesekre, mint a vízi élőlényekre. Néhány toxin erős idegméreg, mások elsősorban a májat károsítják, megint mások gastroenteritis jellegű betegségeket idéznek elő. A legújabb kutatási eredmények azt bizonyítják, hogy hatással vannak a fito- és zooplankton képviselőire, és a magasabb szerveződési szinten lévő növényekre is. A toxinok az elpusztuló sejtekből vagy aktív folyamat révén a vízbe kerülve a vizet fogyasztó vad- és haszonállatokra, de az emberre is potenciális veszélyt jelenthetnek.

Értekezésünk fő célja az algavirágzások toxin-variabilitásának tanulmányozása, azon belül is elsősorban a cianobakteriális toxintermelés sajátosságainak és következményeinek kutatása mérsékeltövi kontinentális vízterek kapcsán.

Míg az édesvízi vízvirágzásokban főként a cianobaktériumok dominánsak, addig az eukarióta algák okozta mérgezések főként tengeri fajokhoz köthetők, és elsősorban a dinoflagelláták közül kerülnek ki azok a szervezetek, amelyek tömeges elszaporodása közegészségügyi, gazdasági és természetvédelmi problémát okoz. Kontinentális vízterekből is vannak ilyen jellegű ismereteink, bár jóval kisebb számban. Ilyen szervezetek közé tartozik a *Prymnesium parvum*, amely főként édes- és brakkvizekben idézett elő tömeges megjelenésével vízvirágzást és a mérgező anyagcsere termékei által hatalmas halpusztulásokat okozott a világ több országában. Munkánkban célul tűztük ki, hogy áttekintjük a faj félszikes élőhelyeken történő megjelenését és az általa okozott mérgezéses eseteket. Az általunk leírt új, a fajhoz köthető proteolitikus hatóanyagcsaládot jellemeztük a *Prymnesium parvum* tenyészetéből és az általa okozott algavirágzásokból egyaránt. A toxincsalád jellemzésén túl áttekintjük lehetséges funkcióit a mérgezésben és táplálkozásban egyaránt.

Az algatoxinok termelésének, előfordulásainak és a környezetben betöltött szerepüknek a vizsgálatához elengedhetetlenek azok a környezetanalitikai technikák, amelyek segítségével a toxinok jelenléte, mennyiségi viszonyai meghatározhatóak. Célunk olyan rutin analitikai módszerek kidolgozása volt, amelyek segítségével a leggyakoribb és legjelentősebb cianobakteriális toxinok mérése megoldható mind környezeti mintákból, mind laboratóriumi tenyészetekből egyaránt. A kidolgozott technikánk célja, hogy minimális minta-előkészítéssel az algavirágzásokból származó sejttömegből és a víztérből közvetlenül a toxinok jelenlétét igazolni tudjuk, rutin mérésük megoldható legyen.

A toxintermelés szabályozása és egyes környezeti hatások valós szerepe a mérgező metabolitok termelése kapcsán mind a mai napig nem tisztázott. A tápanyagok hatása a cianobakteriális toxintermelésre kritikus lehet, hiszen éppen ezek azok a fő faktorok, amelyek következtében a fotoszintetizáló sejtek tömegei kialakulnak. Egy nitrogénfixáló toxintermelő cianobaktérium, az *Aphanizomenon ovalisporum*, melynek toxintermelése jól jellemzett, alkalmas modell ilyen jellegű kutatásokhoz. Vizsgálataink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy van-e összefüggés a kén-, foszfor-, illetve nitrogénellátottság és a toxintermelés között.

A leggyakoribb mérgező 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. Munkánkban célul tűztük ki a mikrocisztin termelő fajok toxintermelő képességének, toxin-variabilitásának tanulmányozását sekély tavainkban előforduló algavirágzásokból. Egy jellemzően alpesi rétegzett mélytavakban előforduló cianobaktérium, a *Planktothrix rubescens* szokatlan sekélytavi megjelenése kapcsán vizsgáltuk meg a toxintermelő képességen túl azokat a jellemző genetikai faktorokat, melyek a természetes tömegprodukciókban előforduló toxinok variabilitását és a szélsőségesen alacsony illetve magas toxintartalmat okozhatják egy adott faj tömeges előfordulása során. Egy téli időszakban regisztrált *Microcystis* virágzás során célunk volt megvizsgálni a mikrocisztin termelő képességen túl, a jégbefagyott toxintermelő sejtek életképességét, amely a faj lehetséges áttelelési stratégiájának és a koratavaszi tömeges megjelenésének magyarázata lehet.

Nagyszámú eredményt találunk az irodalomban arra vonatkozóan, hogy mikrocisztin-tartalmú tápoldattal való kezelés, vagy mikrocisztin tartalmú vízzel való öntözés káros hatással van a növényi növekedésre, befolyásolja a növényi enzimek aktivitását. Több kutatócsoport számolt be ilyen irányú megfigyeléseiről mind vízinövények, mind haszonnövények esetében. Ugyanakkor valós körülmények között megfigyelt toxin okozta növényi károsodás kifejezetten ritka az irodalomban. Célunk volt a legismertebb cianobakteriális toxinok növényekre gyakorolt hatásainak áttekintése egy valós növényi degradáció kapcsán, ahol mikrocisztin tartalmú öntözővízzel locsolt fűfélék pusztulását regisztráltuk.

Amióta a *Cylindrospermopsis raciborskii* tömeges megjelenései során mérgezéseket és toxinok jelenlétét tapasztalták a világ egyes tájain (Ausztrália, Dél-Amerika), kitüntetett figyelemmel kísérik a faj terjedését minden régióban. Elterjedése és tömeges megjelenései Európa országaiban is gondot okozott. A toxintermelése kifejezetten változatos és a tömeges megjelenésre hajlamos cianobaktériumokon belül is unikálisnak tekinthető. A hazai megjelenések miatt és egy általa okozott vízvirágzás következményei mentén, megvizsgáljuk a faj európai kemotípusának jellemzőit és az esetleges toxintermelésének sajátosságait.

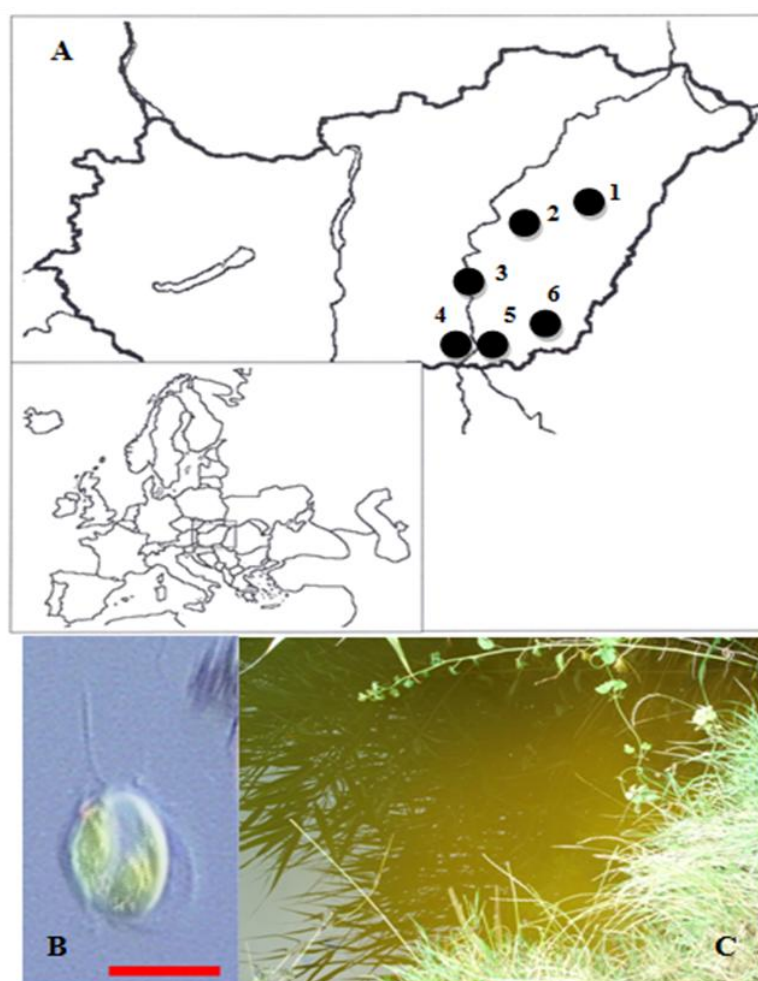
Munkánknak ugyanakkor célja az is, hogy áttekintsük a cianobakteriális toxinok változatosságát, lehetséges hatásait és funkcióit. A növényvilágban többszáz éve kimutatott és azonosított erős hatással bíró komponensek, toxinok sokaságát alkalmazza a tudomány számos részterülete (agrárium, orvos- és gyógyszer tudomány) és találkozunk ezekkel a komponensekkel a mindennapokban is. A cianobakteriális alkaloid típusú toxinokon keresztül mutatjuk be azokat a lehetséges hatásokat, melyek e toxinok súlyos mérgezéses eseteiken túl, egyéb területeken is alkalmazást nyerhetnek.

2. A *Prymnesium parvum* toxintermelése

Prymnesium algavirágzás során a víz arany-, vagy sárgásbarna színűvé válik, habzás akkor fordul elő, amikor a víz hullámszik. Legfeltűnőbb a vízvirágzás során a halak fajtól és kortól (mérettől) független tömeges pusztulása. Az elhullott halak nyálkával borítottak, a kopoltyúkon, úszókon és pikkelyeken bevérzések lehetnek. A mérgezés során a halak megpróbálnak kiugrálni a vízből, a ragadozókat nem kerülik, lassan és görcsösen úsznak a part közelében (Granéli et al., 2003; Claire, 2006). A nagyszámú aranyalga

virágzások és azokkal járó következmények jól szemléltetik, hogy világméretű jelenséggel van dolgunk és a toxikus algavirágzásokat előidéző fajokon belül is kifejezetten komoly károkat okozó a *Prymnesium parvum* tömeges elszaporodása.

A hajdúszoboszlói Téglagyári Öregtávon különböző halfajok tömeges pusztulását figyeltük meg 2005. július 6.-án. Az elpusztult egyedek kopolyúfedőin és a végbélnyílásuk környékén jellegzetes bevérzéseket észleltünk. Az élő egyedek jelentős része pipált, illetve partközeli koordinálatlan mozgás volt rájuk jellemző. Vízkémiai paraméterek alapján a halpusztulás az oldott oxigén illetve az ammónia tartalom alapján nem volt magyarázható, azonban feltűnő volt a víz magas vezetőképessége (Vasas et al., 2007; 2012).



1. ábra. Halpusztulással járó *Prymnesium parvum* algavirágzások, magyarországi vizekben (A) 1: Téglagyári Öregtó (Hajdúszoboszló, 2005), 2: Halastó (Kisújszállás, 2009), 3: Pankota tó (Szentés), 4: Kovács tó (Sándorfalva, 1996), 5: Téglagyári Dögös tó (Makó, 1995, 2010), 6: Horgásztó (Battonya, 1997). *P. parvum* két ostorral a rövidebb haptónémával és a jellegzetes bab alakú sárgászöld kloroplasztisszal (B) 40 millió per literes egyedszámmal bíró *P. parvum* virágzás aransárga színe az Öregtávon (Hajdúszoboszló, 2005) (C; Vasas et al., 2012).

Ezzel párhuzamosan a tó vize jellegzetes aranysárga elszíneződést mutatott (1. ábra) egy, a víztérben tömegesen megjelenő planktonikus eukarióta szervezetnek köszönhetően. A szervezetet fénymikroszkóppal történő határozás során *Prymnesium parvum* Carter-ként határoztuk, amelynek egyedei 35-40 millió/l egyedszámban voltak jelen a merített vízmintában. A merített vízminta töményítés nélkül is extrém mértékű toxikológiai eredményeket adott.

A Hajdúszoboszlón bekövetkező virágzást követően áttekintettük a régiókban, az elmúlt években történt hasonló eseteket. Az adatok alapján jól látható, hogy elsősorban lúgos karakterű, a szokásosnál magasabb vezetőképességgel rendelkező vizekben jelent meg a faj viszonylag nagy számban.

Az elvégzett hemolitikus tesztek alapján felmerült a proteáz hatású anyagok vizsgálata, melyeket a szervezete tömeges elszaporodása kapcsán még nem vizsgáltak. A tömeges halpusztulásokat előidéző *P. parvum* vízvirágzásokból gyűjtött terepi minták („P1” és „P5” jelűek), valamint a laboratóriumi referenciatörzs-tenyészetünk (UTEX no. 2797) mintáit elemezve 14-20 zselatinbontó enzimaktivitással rendelkező fehérjesávot detektáltunk a géleken, közöttük azonos molekulatömeggel rendelkezőket, 1. táblázat). Specifikus aktivitásuk a különböző mintákban természetesen mutatott különbségeket, hiszen arányuk az egységnyi fehérjetartalmú mintákban sok tényezőtől függ (tenyészet kora, állapota, stb.). A terepi minták legtöbb proteázának működéséhez az optimális pH: 8,0-9,0, ami jó egyezést mutatott a vízvirágzás során mért vízkémiai adatokkal (Vasas et al., 2012).

1. táblázat. Különböző magyarországi tavakból gyűjtött *P. parvum* minták (P1: Hajdúszoboszló és P5: Makó) és a laboratóriumi körülmények között nevelt *P. parvum* (UTEX no. 2797 törzs) azonos relatív molekulatömeggel jellemezhető zselatinbontó proteáz enzimek (pH: 8,0; Vasas et al., 2012).

relatív molekulatömeg (kDa)	<i>Prymnesium parvum</i> tenyészet „UTEX”	„P1” terepi minta	„P5” terepi minta
≥125	+++	+++	++
120 ± 1.0		+	+
115 ± 2.0	+	+	+
108 ± 2.0	+	+	+
104 ± 1.0	+	+	+
95 ± 3.0	+	+	+
86 ± 2.0	+	+	+
80 ± 3.0	+	+	+
70 ± 2.0	+	+	+
64 ± 2.0	+		+
62 ± 2.0	+	+	
53 ± 3.0	+ (E)	+	+/++
46 ± 3.0	+	+	+
38 ± 3.0	+	+	+
35 ± 0.5	+	+	+
33 ± 1.5			+
18 ± 1.0	+		+

*+: a géleken magas zselatinbontó aktivitást mutató proteáz, (E): csak a tenyészet felülúszó frakciójában detektálható, extracelluláris proteáz, ++/+++: dupla vagy tripla sáv

Az UTEX tenyészet 10 és 21 napos mintáinak sejt- és felülúszó frakciója zimogramjait összehasonlítva az izoenzim mintázatokban különbségeket detektáltunk; a 10. napon a sejtfrakció mintájában a 115, 108, 104, 80, 62 és 38 kDa relatív molekulatömegű proteázok mutattak magas aktivitást, míg 11 nap múlva ezek a proteázok nem, vagy alig voltak detektálhatók. Míg a 108, 80, 62, 46 és 38 kDa proteázok lecsökkentek a sejtek mintáiban, megjelentek és magas aktivitást mutattak a felülúszókban. Az 53±3 kDa molekulatömegű proteázt csak a felülúszóból detektáltuk.

Eredményeink felhívták a figyelmet a tömeges halpusztulással kísért *P. parvum* vízvirágzások kárpát-medencei előfordulására és az ezeket kísérő magas proteáz-aktivitás jelenségére.

Tekintve, hogy a *P. parvum* proteázok az extracelluláris frakcióból is kimutathatók, azaz a toxinokhoz hasonlóan kikerülnek a sejtekből és jelentős koncentrációt érhetnek el a víztérben, valamint működésük pH optimuma egybeesik a vízvirágzások mintáinak pH értékeivel, valószínűsíthető, hogy működésükkel hozzájárulnak a *P. parvum* okozta sokrétű mérgezési tünetek kialakításához (Vasas et al., 2012).

3. Cianobakteriális toxinok kapilláris elektroforézise

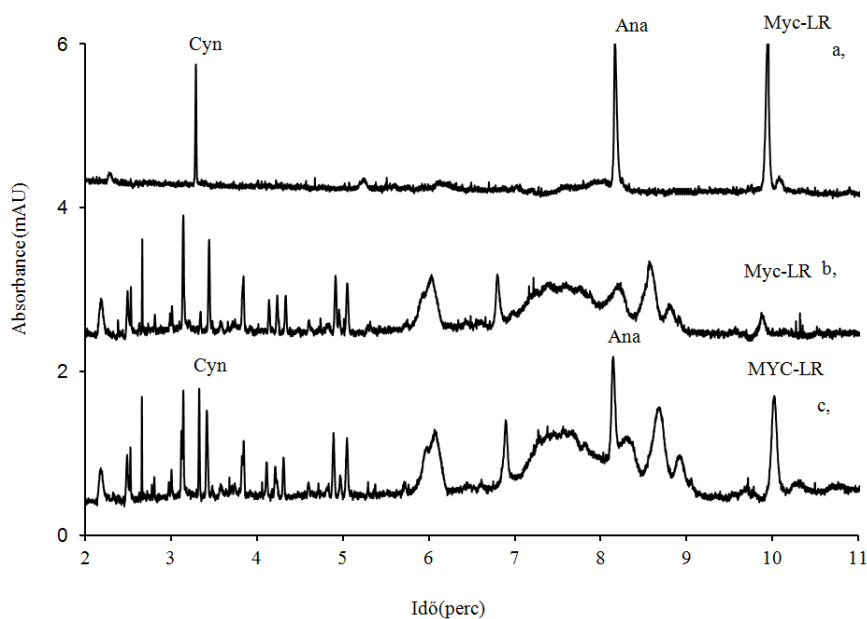
Az algatoxinok kémiai változatossága miatt, azok detektálása, meghatározása jelentős kihívás a szakemberek számára (Bell és Codd, 1994). A szerkezeti változatosságon túl (amelyet részletesen ismertettünk) jellemző az algatoxinokkal kapcsolatos mátrixok sokfélesége, szélsőséges fizikai, kémiai tulajdonságokkal bíró anyagok keveréke, melyekből a toxinok mérése kritikus lehet (Codd et al., 2005). Az algatoxinok meghatározása, azok biológiai kockázatának felmérése elsősorban a következő típusú mintákban merülhet fel: algavirágzásban létrejött sejtömeg; laboratóriumban nevelt algatörzsek sejtömege; természetes vizek szűrt vize; ivóvíz; növényi, állati szövetminták, melyek potenciálisan akkumulálhatják a toxinokat; emberi szövetek, testnedvek (Merilouto és Codd, 2005).

Régóta vágyott cél kifejleszteni olyan módszereket, amelyek képesek lehetnek azonosítani és meghatározni egyszerre több algatoxint és azok lehetséges változatait (Pelander et al., 1996; 2000). Jelenleg még nincs olyan hatékony módszer, mely segítségével képesek lennénk detektálni az összes előforduló algatoxint. Figyelembe véve, hogy mennyire kritikus a megfelelő kimutatási határ és fontos a költséghatékony emberi mértékű elemzési idő, egyes toxinokra és minta típusokra különböző megközelítést kell alkalmazni (Gathercole et al., 1987).

Analitikai módszerfejlesztéseink során a kapilláris elektroforézis technikáját alkalmazzuk. Célunk volt olyan módszerek kidolgozása, amelyek a leggyakoribb cianobakteriális toxinok nyomonkövetését, termelésének tanulmányozását lehetővé teszik nem csupán laboratóriumi modell oldatokból, hanem valós biológiai mátrixokból is (vízvirágzás-mintákból, laboratóriumi tenyészetek sejtartalmából). Célunk volt továbbá olyan nagy hatékonyságú módszer fejlesztése, ami lehetővé teszi a toxin(ok) közvetlen analízisét minél kevesebb minta-előkészítéssel.

A leggyakoribb mikrocisztinek és az új általunk leírt mikrocisztin variáns (MC-YA) elválasztására és kimutatására módszert dolgoztunk ki kapilláris elektroforézis készülék segítségével. A módszer újdonsága az, hogy eddig a meglévő ismert mikrocisztin variánsok közül leginkább a mikrocisztin-LR, -RR és -YR analízisére dolgoztak ki analitikai eljárásokat (Gago-Martínez et al., 2003). Az általunk kifejlesztett módszer a nyomokban jelenlévő mikrocisztin variánsok elválasztására és detektálására is koncentrál az ismert variánsok mellett (Vasas et al., 2006).

A mikrocisztinek és a cilindropermopszin elválasztására és analízisére kidolgozott technikák után célul tűztük ki, olyan módszer fejlesztését, amivel a leggyakrabban problémát okozó cianotoxinok (mikrocisztin-LR, cilindropermopszin, anatoxin-a) jelenlétét nagy hatékonysággal mérni lehet, viszonylag rövid időintervallumban. Az általunk kidolgozott módszer alkalmas a három leggyakoribb cianotoxin szimultán módon történő elválasztására és detektálására (2. ábra; Vasas et al., 2004).



2. ábra. Cianobakteriális toxinok elválasztása kapilláris elektroforézissel MEKC módszerrel elválasztott anatoxin-a, mikrocisztin-LR, cilindropermopszin standardok, b. valós minta elemzése (BGSD-243 *Microcystis aeruginosa* kivonatában), c. valós, standardokkal kevert minta elemzése (BGSD-243 *Microcystis aeruginosa* kivonatában). (Kondíciók MEKC: kapilláris: 64,5 cm/50 μ m puffer elektrolit: 25 mM borát és 100 mM SDS, pH=9,3, alkalmazott feszültség: +25 kV, detektálás: UV 230 nm.; Vasas et al., 2004).

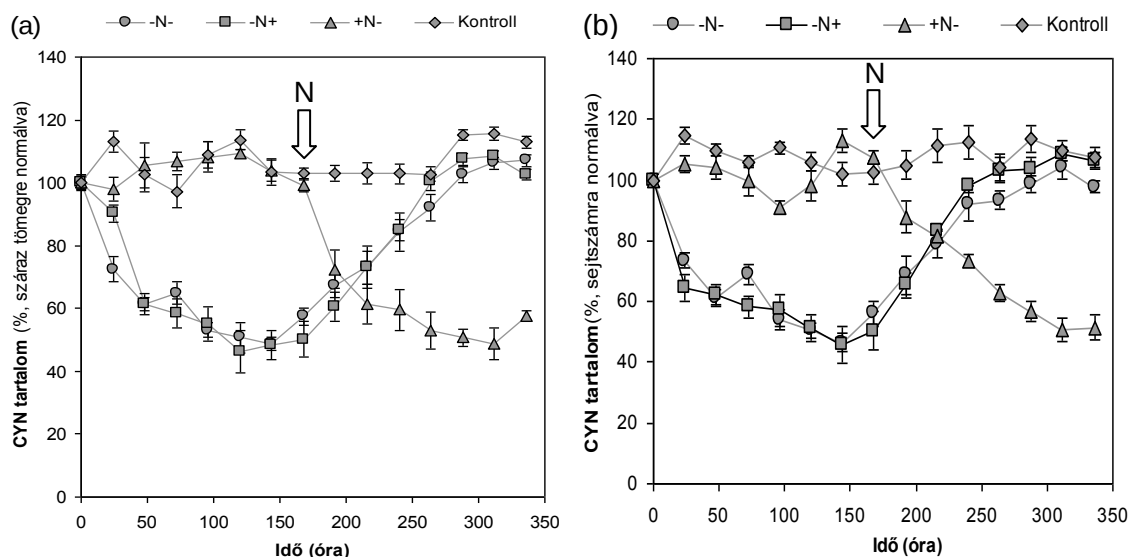
A fejlesztett módszereket nem csupán az analitikai módszerfejlesztésekhez elengedhetetlen laboratóriumi modelloldatokon (bemért standardokat tartalmazó törzsoldatok) teszteltük, hanem a toxinok természetes megjelenésére jellemző biológiai mátrixokban is (2. ábra), így segítségével gyorsan és nagy hatékonysággal lehet vízvirágzásból származó mintákat, valamint vízvirágzásokból származó szervezetek cianotoxin tartalmát meghatározni (Vasas et al., 2004; 2006).

4. Nitrogén, foszfor- és kénéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cilindropermopszin termelésre

A vízvirágzások kialakulásában a felvehető foszfor mennyisége az egyik legfontosabb tényező, emellett a kötött – a fitoplankton szempontjából elsősorban a szervesetlen kötésben lévő – nitrogén mennyisége mutatkozik meghatározónak. Mind környezetvédelmi, mind ökofiziológiai szempontból fontos és érdekes kérdés a különböző tápelemekkel való ellátottság és a cianobakteriális toxintermelés közötti összefüggések vizsgálata, különösen annak figyelembe vételével, hogy a cilindropermopszint termelő szervezetekkel kapcsolatban kevés ilyen irányú ismeret és adat található az irodalomban (Vasas et al., 2013).

Munkánk során a kén-, a foszfor-, illetve a nitrogénéhezés toxintermelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk az ILC-164 *Aphanizomenon ovalisporum* toxikus cianobaktérium törzs esetében. A toxintartalomra vonatkozó vizsgálataink eredményei szerint a szulfát, a foszfát és a nitrát hiánya is a cilindropermopszin tartalom csökkenéséhez vezet az *A. ovalisporum* sejtekben. Ha a toxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg, legnagyobb mértékben a kénéheztetett 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 (3. ábra). Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a nitrát hiányában differenciálódó heterociszták nem tartalmaznak cilindropermopszint, azaz anyagcseréjük a másodlagos anyagcseretermékek termelése tekintetében is átalakul (Vasas et al., 2013).



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

A cianobakteriális toxintermelés vizsgálata során kevés környezeti faktorról sikerült bizonyítani, hogy a toxintermelést jelentősen befolyásolja, különösen igaz ez a cilindropermopszint termelő cianobaktériumokra. Az esetek nagy többségében a toxintartalom szoros összefüggést mutatott a növekedési rátával. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium cilindropermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken (3. ábra). Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtekben csökken a cilindropermopszin mennyisége.

Az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcserefolyamatok, valamint a sejtsztódás szabályozásán túl mélyebb összefüggésben van a törzs cilindropermopszin termelésével is (Bácsi et al., 2006; 2007; Vasas et al., 2013).

5. Mérgező cianobakteriális vízvirágzások-esettanulmányok

5.1. Mikrocisztinek, mikrocisztin-termelők előfordulásai

A magyarországi vízterekben előforduló tömegprodukciók toxicitásának kapcsán elmondható, hogy a toxikus vízvirágzások megjelenése elsősorban mikrocisztintermelő szervezeteknek köszönhető. Feltűnő a *Microcystis* fajok dominanciája, azok közül is a *Microcystis aeruginosa* nagyszámú megjelenése. A *Microcystis* fajok előfordulása vízvirágzásokban, néhány kivételtől eltekintve mikrocisztinek megjelenését is indikálta.

Vizsgálataink alapján a *Microcystis* fajok által okozott virágzások toxikusabbnak bizonyultak, összevetve más cianobaktérium nemzetségekével. Az IC_{50} érték 245 $\mu\text{g/ml}$ volt a legtoxikusabb minta esetében, amit a Bárdos-tóból gyűjtöttünk. Egyetlen *M. aeruginosa* esetében nem mértünk toxintartalmat, amely az Ónod-tóból származott. A kalkulált IC_{50} értékek jól korrelálnak a mért MC tartalommal. A legmagasabb értéket a Bárdos-tóból mértünk. 12 különböző MC variánst azonosítottunk a 14 minta esetében. A leggyakoribb variáns a MC-LR volt, a minták 70%-ban azonosítottuk. MC-LR 7, MC-RR 6, MC-YR 4, MC-WR 4, Dha7-RR 4, and Asp3MC-LR 3 esetben került azonosításra. A toxinvariánsok mellett, a környezeti mintákban megvizsgáltuk a *mcy* génklaszter egyes elemeinek jelenlétét is, az eredmények a toxintartalommal, toxicitással is jól összevethetőek (Farkas et al., 2014).

A MALDI-TOF analízis segítségével azonosított variánsok nagy száma nem szokatlan, hiszen a jelenleg az ismert MC formák száma meghaladja a százat és több olyan algavirágzásról is beszámoltak, amelyben egy adott pillanatban 50 feletti volt a MC variánsok száma (Fastner et al., 2001). Néhány alpesi országban (Ausztria, Németország, Svájc) elsősorban a *Planktothrix* fajok a legjellemzőbb MC termelők (Kosol et al., 2009), de számos európai országban a hazai eredményeknek megfelelően a *M. aeruginosa* a legfőbb toxintermelő (Chorus és Bartram, 1999, Belykh et al. 2011).

5.2. Toxintermelő *Microcystis* kolóniák azonosítása jégből, egy alternatív áttelelési stratégia.

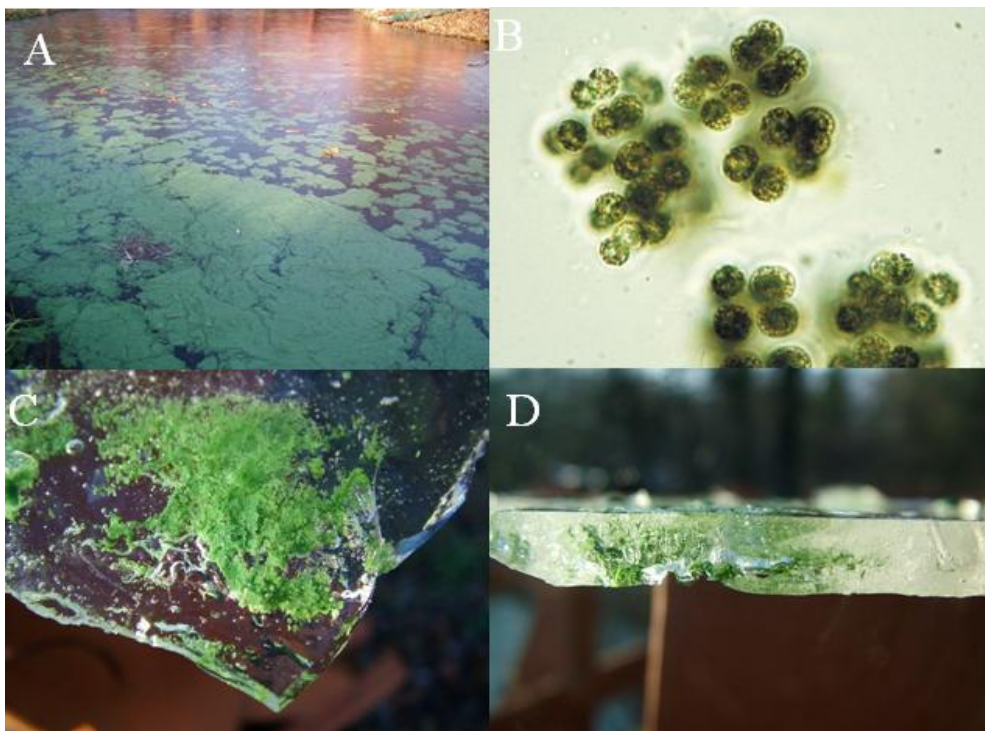
A *Microcystis* fajok a leggyakoribb algavirágzást okozó fajok egyike. Az eutróf és hipertróf vízterekben e genusz képviselői gyakran uralják a nyári fitoplankton. A *Microcystis* sejtek gömb alakúak és a legtöbb esetben

nyálkaréteggel körülvett telepet alkotnak. A kolóniák vertikális migrációját a sejtekben lévő gázvakuólunok nagyban segítik (Walsby, 1994). A tényleges felhajtóerő a *Microcystis* kolónia esetében nagymértékben függ az aktuális fény mennyiségétől is. A fotoszintetikus energia glikogénben tárolódik, ami növeli a sejtek sűrűségét és a kolónia süllyedését segíti elő. Amikor a biológiai oxidáció révén kellőképpen lecsökken a glikogén mennyisége, a kolónia sűrűsége révén könnyebben képes a felfelé irányuló mozgásra (Kromkamp és Mur, 1984; Thomas és Walsby, 1985).

A *Microcystis aeruginosa* a leggyakoribb és legismertebb virágzást alkotó *Microcystis* faj. A *M. aeruginosa* mellett a *Microcystis viridis* is gyakran jelenik meg a vízben tömegesen és okoz toxikus algavirágzást. A *M. aeruginosa*-hoz hasonlítva sejtjei a kolóniában tömöttebben helyezkednek el, erős nyálkaburok szintén jellemző rá. A morfológiai különbségek mellett molekuláris markerek segítségével is elkülönítették a két fajt (Komárek és Anagnostidis, 1998).

A legtöbb *Microcystis* kolónia ősszel lesüllyed az üledékbe és a tó alján telel (Reynolds et al., 1981; Boström et al., 1989; Tsujimura et al., 2000). Az életképesség vizsgálatok azt mutatják, hogy ezek az áttelelő telepek még fotoszintetikusan aktív *Microcystis* kolóniák (Takamura et al., 1984), de az nem teljesen ismert, hogyan tudnak túlélni a sötét és gyakran anoxikus körülmények között. A legtöbb esetben ez a nagy áttelelő kolóniaszám lesz az oltóanyaga a következő év tavaszától meginduló algavirágzásoknak (Preston et al., 1980). A sejtek lecsökkenő sűrűsége, a turbulencia, a megváltozott környezeti viszonyok mind elősegítik a sejtek vízoszlopba, valamint a felszínre történő migrációját.

2005 telén, egy Debrecen melletti sekély tóban találtunk nagy tömegben a jégbe fagyva *Microcystis* telepeket, melyek jelenléte szokatlan volt (4. ábra). Ahogyan a leírásokból is kiderül amennyiben ezek a sejtek életképesek, úgy azok egy alternatív oltóanyagot jelenthetnek a következő évi algavirágzások számára. Ráadásul, amennyiben ezek a kolóniák toxintermelőek, úgy e képességük a következő évi tömeges megjelenés mérgezőképességét is meghatározza. A vizsgálat célkitűzése volt, hogy azonosítsuk a jégbe fagyott cianobaktérium fajt/fajokat, megvizsgáljuk életképességüket és toxintermelésüket (Vasas et al., 2010).



4. ábra. A Hármashegyi tóban (47°33'N, 21°50'E) 2005 telén megjelenő *Microcystis viridis* algavirágzás (A). A jégből izolált *M. viridis* kolóniái (B) és a jégbe fagyott toxintermelő sejtek életképes tömegei (C-D; Vasas et al., 2010).

Az életképesség vizsgálatok során a 7 napos inkubálás után a legtöbb élő telepet a jégből azonosítottuk. Az élő kolóniák 40%-a az üledékből származott, és csak 2 %-a származott a vízoszlopból (Vasas et al., 2010). A jelenség, hogy a *Microcystis* kolóniák a tó fenekén telelnek át az üledékben, jól ismert (Reynolds et al., 1981; Boström et al., 1989; Tsujimura et al., 2000). Az sem ismeretlen, hogy egy kis része a *Microcystis* populációnak képes áttelelni a vízoszlopban (Kurmayer és Kutzenberger, 2003). Ezzel szemben a jégben áttelelt formákról ezidáig nem volt információ. Ahogy az eredmények azt mutatják, közel 60%-a az életképes kolóniáknak a tó jégtakarójából volt izolálható (Vasas et al., 2010).

A toxikológiai vizsgálatok eredményei szerint a jégből gyűjtött sejtömeg mérgezőnek bizonyult. Az eredmények szerint a faj egy viszonylag gyakori variánst tartalmazott, amit MC- RR (M + H = 1039,2)-ként azonosítottunk (Vasas et al., 2010).

A toxintermelő képesség a jégbefagyott kolóniák esetében azért is érdekes jelenség, mert ma már ismert tény, hogy az algavirágzások nettó toxintermelését a heterogénnek mondható populáció kemotípusainak aránya határozza meg.

Tehát az áttelelt kolóniák toxintermelő-képessége, mennyiségi és minőségi viszonyai a következő évi vízvirágzás toxicitását erőteljesen befolyásolhatják (Vasas et al., 2010).

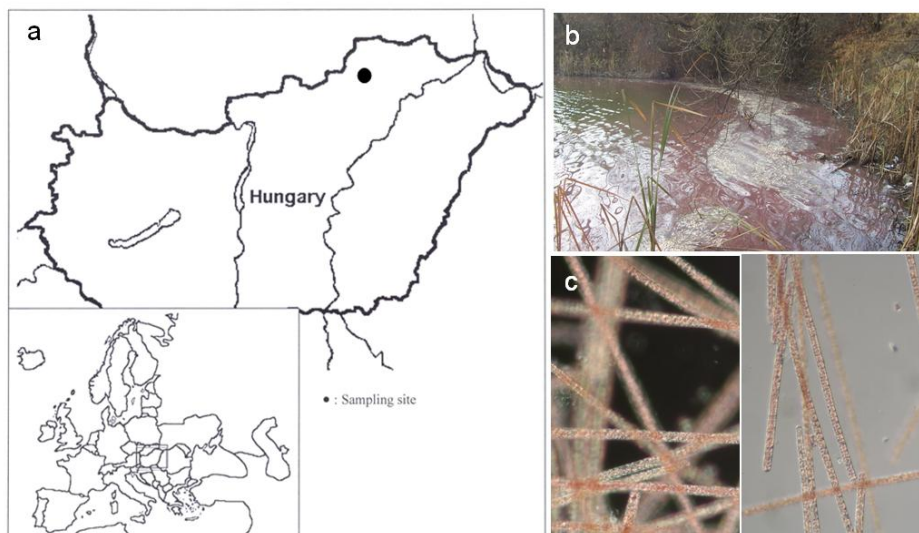
5.3. *M. aeruginosa* tömeges megjelenése egy kerti tóban

Munkánk során egy szegedi kerti díszútból származó vízmintában azonosítottuk a jelenlévő cianobaktérium fajokat. Fénymikroszkóppal történő határozás után megállapítottuk, hogy a kerti tóban történt vízvirágzást *Microcystis* fajok tömeges elszaporodása okozta (Bácsi et al., 2011). A vízvirágzás-minta toxicitását vizsgáltuk mustár csíranövény-tesztel (Kós et al., 1995; Vasas et al., 2000), valamint fűmagkeverékekkel végzett tesztek segítségével. A locsolás hatását laboratóriumi körülmények között modelleztük az angol perje (*Lolium perenne*) növekedésére gyakorolt hatások tanulmányozásával. A sejttömeg liofilizátumából készült extraktum különböző koncentrációival végzett kísérleteink erőteljes gátló hatást mutattak ki mind a mustár csíranövények, mind az angol perje (*Lolium perenne*) gyökér- illetve hajtáshosszainak növekedésében (Bácsi et al., 2011).

A növénytesztek által kimutatott toxicitást az analitikai vizsgálatok igazolták; a kerti tóban lezajlott vízvirágzás mintában 9 mikrocisztin variánst mutattunk ki, közülük négyet szerkezetileg is azonosítottunk. Megállapítható, hogy nagyszámú mikrocisztin variáns és magas összmikrocisztin koncentráció (0,1 g/l összes - szabad és a sejtekben együttesen mérhető - MC-LR ekvivalens mennyiség) áll a szegedi kerti tóban bekövetkezett vízvirágzás erősen toxikus hátterében (Bácsi et al., 2011).

5.4. *Planktothrix* fajok toxintermelése

A magyarországi vizekben *Planktothrix* fajok által előidézett monocianobakteriális vízvirágzások toxintartalmát és toxintermelő képességét vizsgáltuk (Farkas et al., 2011; 2014). A következő mintavételi helyeken fénymikroszkópos vizsgálattal *Planktothrix agardhii* által okozott vízvirágzást azonosítottunk: Gyula, Hősök-tava; Gyula, Pali-tó; Hajdúhadház, Sipos-tó; Várpalota, Bivalyos-tó; Kis-Balaton (Farkas et al., 2014). A Szirmabesenyő, Kocka-tó esetében pedig a vörös színű vízvirágzást a *Planktothrix rubescens* cianobaktérium okozta (5. ábra).

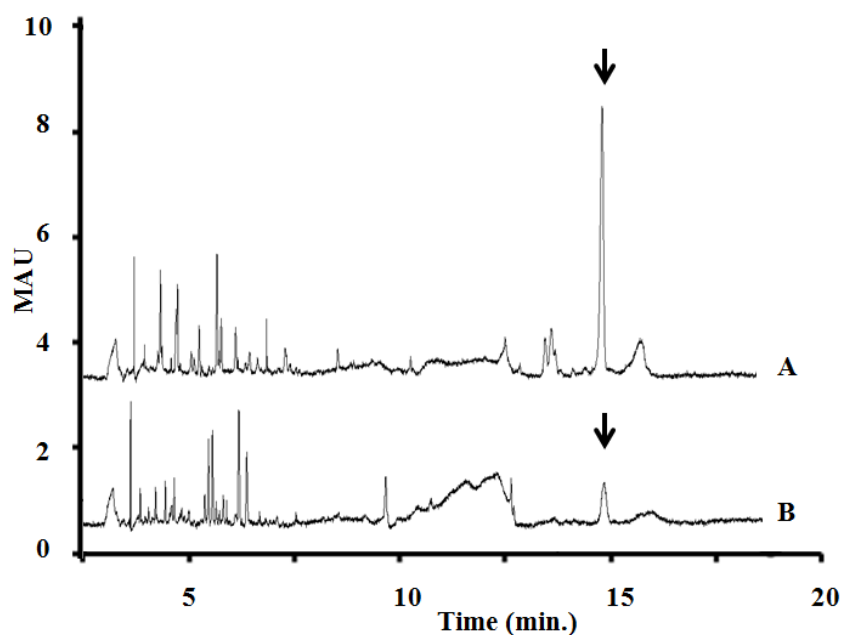


5. ábra. (a) A Kocka-tó lokalizációja (b) A *Planktothrix rubescens* virágzása a kavicsbánya tóban (c) A *Planktothrix rubescens* trichomái mikroszkópi képen.

A *Planktothrix rubescens* és a Bivalyos-tóból vett *Planktothrix agardhii* toxikusnak mutatkozott, IC_{50} értéke (50 %-os növekedésgátlás) 0,35 mg/ml-nek (*P. rubescens*) és 1,2 mg/ml-nek (*P. agardhii*) adódott. A terepi minták közül az egyetlen helyen előforduló *P. rubescens* és a Bivalyos-tóból gyűjtött *P. agardhii* okozta a legnagyobb növekedésgátlást, ami toxinok jelenlétére utalt. A bioteszt eredményeit alátámasztva a *P. agardhii* minták esetében a Bivalyos mintából mértük a legnagyobb MYC tartalmat (Farkas et al., 2014).

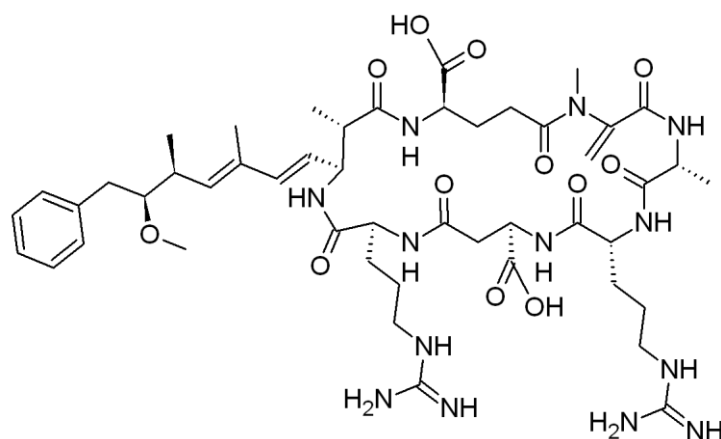
A *P. rubescens* megjelenése és tömeges előfordulása nem nevezhető szokványos jelenségnek hazánkban. Ahogyan bemutattuk, a faj elsősorban valódi rétegzett tavakban szokott tömegesen elszaporodni, Európában leginkább az alpesi országok víztereinek jellemző toxintermelő cianobaktérium faja. Bár hazánkra nem jellemző a tartósan rétegzett alpesi jellegű tavak jelenléte, egyes észak-magyarországi kavicsbányatavak hidrológiai viszonyai kedvező feltételeket teremthetnek az említett fajnak (Vasas et al., 2013).

A MC tartalom, amit a vízvirágzás mintából meghatároztunk, magasnak számít. Nem csupán *Planktothrix* genusz által okozott tömeges virágzás tömegessége szokatlan, hanem más fajokkal is összevetve a legnagyobb MC tartalmat mutattuk ki a régiókban, ez az érték nemzetközi viszonylatban is kifejezetten magasnak számít (6. ábra).



6. ábra. *P. rubescens* algavirágzás minta kapilláris elektroforézise (A) és az izolált *P. rubescens* BGSD-500 analízise (B). A D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR toxin nyíllal jelölve. (kapilláris: 64,5 cm, 50 µm i.d., puffer: 25 mM borát 75 mM SDS, pH 9,3, alkalmazott feszültség: +25 kV, detektálás UV 238 nm; Vasas et al., 2013).

Szerkezetvizsgáló módszerekkel pontosan azonosítottuk a MC variánst, ami a genuszra kifejezetten jellemző demetilált MC-RR forma a [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR volt (7. ábra; Vasas et al., 2009; 2013). A meghatározott MC variáns jellemzője, hogy a leggyakoribb MC-LR-hez viszonyítva kevésbé toxikus egérre, ugyanakkor, ahogy részletes vizsgálatok kimutatták más élőlénycsoportokra, mint például az egyes *Daphnia* fajokra éppen az általunk azonosított variáns minősül toxikusabbnak.



7. ábra. A *P. rubescens*-ből azonosított mikrocisztin [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR (Vasas et al., 2013).

A *P. rubescens* virágzásból izoláltunk egy laboratóriumban fenntartható törzset (BGSD-500), aminek folyamatosnak mondható toxintermelésének mértéke különbözött a vízvirágzásban mért MC mennyiségi viszonyaitól. Érdekes módon ugyanazt a [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR variánst termelte, viszont analíziseink alapján csupán ötödannyi mennyiségben, mint a természetes tömegproduktum esetében volt mérhető (8,57 mg/g az vízvirágzásban és 1,85 mg/g az izolált törzsben).

A *Planktothrix rubescens* magyarországi megjelenése azonban figyelemreméltó, tekintve, hogy nem vagyunk alpesi ország, valódi rétegzett mély tavaink száma csekély.

A *Planktothrix rubescens* által előidézett vízvirágzás nem más, mint a populációnak a metalimnionból a vízfelszínre történő vertikális migrációja, amely a sejtek gázvezikulumainak segítségével valósul meg. A vízkémiai paramétereket áttekintve elsősorban a pH, fajlagos vezetőképesség és a összes szerves szén adatait emeljük ki. Természetesen erre a szervezetre is általános érvényű, akárcsak az algatoxin-termelésnél általában, hogy a toxintermelés nem fajhoz köthető, egy adott faj populációi toxikusak, míg mások nem (Welker, 2006, 2007). Az elvégzett vizsgálatok alapján elmondható hogy a szervezet kivonata a Magyarországon legtoxikusabbnak számító *Microcystis* populációk toxicitásával vetekszik, tömeges megjelenésükkor toxintermeléssel számolhatunk (Vasas et al., 2009; 2013).

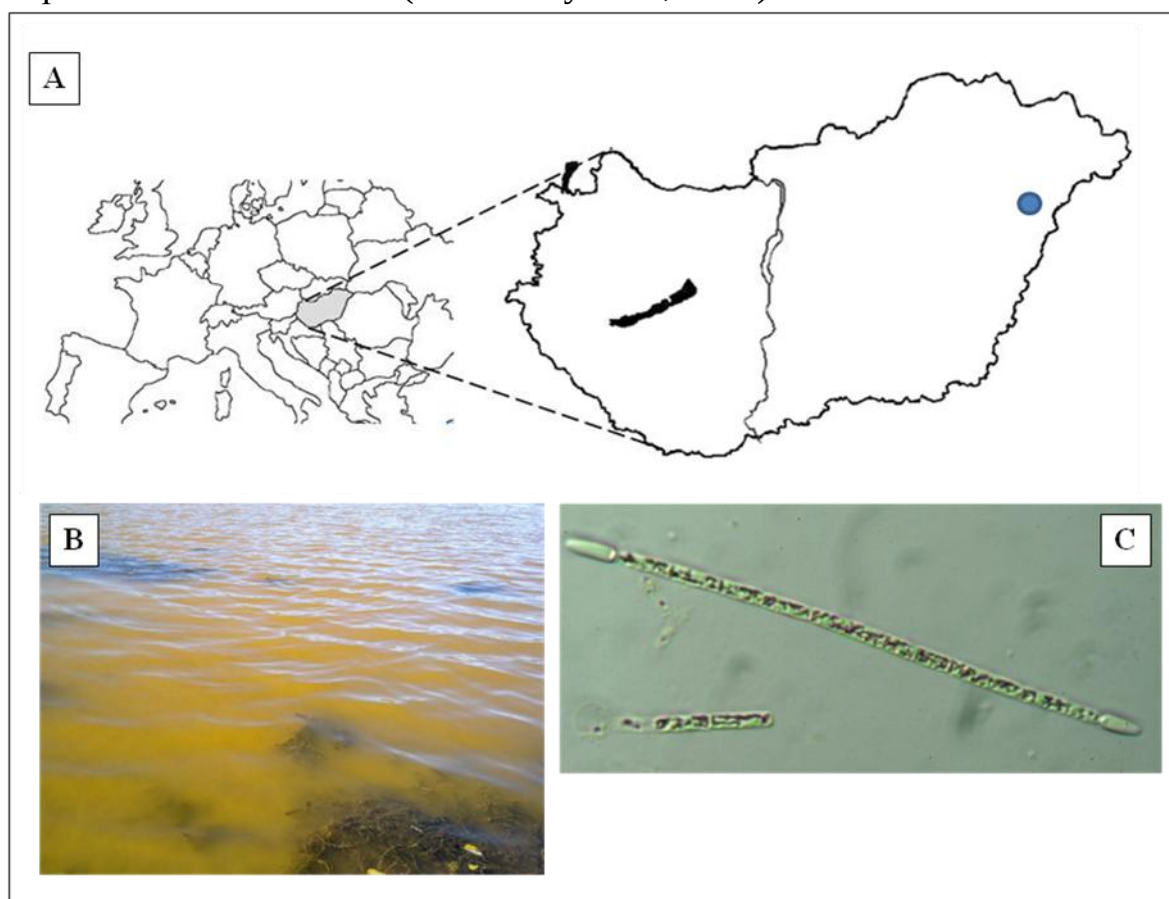
6. A *Cylindrospermopsis raciborskii* toxintermelésének sajátosságai

Az elmúlt időszakban feltűnő az egyes vízterekben megjelenő nitrogénfixáló szervezetek nagy aránya és azon belül is az invazív *Cylindrospermopsis raciborskii* jelenléte hazai és a világ számos pontján megtalálható vízterekben (Padisák, 1997; Kinnear, 2010).

11 *C. raciborskii* minta cilindrospermopszin tartalmát vizsgáltunk meg, ebből 10 hazai és egy ausztráliai (AQS) minta volt. Az összes magyarországi minta a toxin termeléséért felelős génekre (PKS és PS gének) nézve negatívnak mutatkozott. Az AQS volt az egyetlen törzs, amiben a gének jelenlétét igazolni tudtuk. Az *A. ovalisporum*, esetében három izolátumot, a CYN termelő izraeli (IL C-164) törzset és két általunk izoláltat vizsgáltunk meg. Az izraeli és az általunk a spanyolországi Blanesből izolált törzsben a toxin-termelést jelző géneket sikerült kimutatnunk. A magyarországi Szelidi- tóból származó minta

esetében ezt nem tapasztaltuk. A Spanyolországból (Blanes, botanikus kerti tó) származó *Aphanizomenon ovalisporum* izolátumból szintén CYN-t sikerült kimutatnunk, ami megmagyarázza a tóban megjelenő vízvirágzás mintájában detektált CYN tartalmat (Vasas et al. 2010).

A *C. raciborskii* változatos megjelenésére 2012 novemberében figyelhattunk meg egy példát (8. ábra). Az említett időszakban a Debrecen melletti Fancsika tározó és horgásztóban tonnányi mennyiségű hal pusztult el. A víztérben tömegesen jelentkezett a faj helyenként 10^6 /ml-es fonalszámmal. Nemcsak az időszak és kifejezetten magas egyedszámú és homogén megjelenés volt szokatlan, hanem a tömeges megjelenésű biomassza a szokványos zölde elszíneződés helyett élénk narancssárga színben jelentkezett. A feltehetően alacsony hőmérséklet hatására a fonalakban található klorofill elbomlott, a fonalak lízise beindult és a sejtek beltartalma, részben színanyaga (későbbiekben azonosított karotinoid formák) és értelemszerűen a faj más metabolitjai is szabad állapotban a vízbe kerültek (Vehovszky et al., 2014).



8. ábra. *Cylindrospermopsis raciborskii* algavirágzás a Fancsika tározóban (A) 2012. november elején. A sejtekben felhalmozott karotinoidoknak köszönhetően a víztér élénk narancssárgára színeződött (B). A *C. raciborskii* fonala a jellegzetes terminális heterocisztákkal (Vehovszky et al., 2014).

Jellemző volt, hogy a víz teljes halfaunája (*Sander lucioperca*, *Hypophthalmichthys nobilis* R., *Ctenopharingodon idella* (Valenciennes, 1844) *Cyprinus carpio* L., *Silurus glanis* L., *Ameiurus nebulosus* (Lesueur), *Carassius carassius* L.) kezdett tömegesen elpusztulni, ráadásul a neurotoxikus algavirágzások jellemző „tünete”, elpusztult emlősállatok (jelen esetben elpusztult macskák) is megfigyelhetők voltak a víz partján.

A puhatestű (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*) állatok azonosított központi idegrendszeri neuronjain elektrofiziológiai és farmakológiai eredmények igazolták, hogy az algavirágzásból származó mintákban a neurotoxinok elsődleges célpontja (target) az anatoxin-a típusú cianotoxinokhoz hasonlóan az idegsejtek nikotinerger acetilkolin-receptora (nAChR). Az anatoxin-termelő *Oscillatoria phormosa* PCC 6506 hasonlóképpen előállított kivonata ugyanezen a sejteken ugyancsak nikotinerger blokkolónak bizonyult, míg a CYN termelő AQS (20 mg/ml-ig tesztelve) nem váltott ki reprodukálható vagy dózisfüggő nAChR gátló hatást. Eredményeink alapján a szervezet anatoxin hatású komponens(ek)e)t tartalmaz, melyek a neurotoxikus terepi következményekért felelősek lehetnek (Vehovszky et al., 2014).

A *C. raciborskii* tömeges megjelenéseit mérgezések és toxinok előfordulásai kísérték a világ egyes tájain (Ausztrália, Dél-Amerika). Kitüntetett figyelemmel kísérik a faj terjedését minden régióban. Elterjedése és tömeges megjelenései Európa országaiban is gondot okozott (Kinneer, 2010). Toxintermelése kifejezetten változatos és a tömeges megjelenésre hajlamos cinaobaktériumokon belül is unikálisnak tekinthető. Az ausztráliai, egyes ázsiai és egyes afrikai törzsek esetében cilindrospermopszin termelést azonosítottak, míg a dél-amerikai populációk esetében szaxitoxint és annak analógjait detektálták. Európai izolátumok esetében elmondható, hogy különböző biotesztek (egérteszt, mustár csíranövény teszt, izolált neuronok) alkalmazása során egyöntetűen megfogalmazódott, hogy mérgező metabolitokat termelnek egyes izolátumok, de azok nem tartoznak az ismert, már azonosított toxinok közé (Kinneer, 2010; Vasas et al. 2010). Méréseink a cilindrospermopszin termelést kizárják a faj hazai megjelenései kapcsán és egy másik potenciálisan CYN termelő szervezet az *A. ovalisporum* esetében sem igazoltuk azt a hazai megjelenések során. Ugyanakkor a hazai jelentőségen túlmutat a neurotoxikus *C. raciborskii* kemotípus azonosítása, amely megjelenése a tágabb régióra is jellemző lehet, felveti a neurotoxikus forma európai megjelenését és

egyértelműen bizonyítja újabb toxincsaládok jelenlétét a fajban (Vasas et al. 2010; Vehovszky et al., 2014).

7. Cianobakteriális toxinok hasznosítása

Munkánkban áttekintettük a cianobakteriális toxinok változatosságát, lehetséges hatásait és funkcióit. A felszíni vizekben jelentkező algavirágzásokon túl az egyik ilyen hatás, kifejezetten káros következmény a táplálékként illetve táplálék-kiegészítőként hasznosított alga és cianobaktérium fajokban megjelenő toxinok közvetlen a humán szervezetre gyakorolt hatása is. Az algatoxinok kétarcúságára is felhívtuk a figyelmet, hiszen az ismert toxinok és az algákból folyamatosan azonosított erős hatású komponensek veszélyesek, mérgezőek, de sokszor különleges hatással bíró ígéretes metabolitok (Vasas et al., 2010; Vasas, 2014). A szaxitoxin és a neoszaxitoxin például megakadályozzák, hogy az idegsejtek az izomsejteken összehúzódást váltsanak ki. Ezt úgy érik el, hogy blokkolják a nátrium ionoknak a membránsatornákon keresztüli beáramlását a sejtekbe. Amikor az idegsejtek így módon gátlódnak, akkor az izomsejtek ingerület hiányában megbénulnak. Jelenleg a szaxitoxinok fejlesztés alatt álló ígéretes helyi érzéstelenítők alkotóiként is felhasználhatóak (Fattorusso és Taglialatela-Scafati, 2008; Vasas et al., 2010).

Számos további példát ismerünk arra, hogy ezeket a komponenseket a farmakológia vagy a biológiai és a gyógyszer tudományokat érintő gyakorlat hasznosítja (Vasas, 2011; Gonda et al., 2013a, b). Példa lehet erre a számos cianobaktérium és eukarióta algafajból leírt erős hatású alkaloid, a szaxitoxin, melyet érzéstelenítők fejlesztése során alkalmaznak (Vasas et al., 2010; Vasas, 2014).

8. Összefoglalás

Toxikus, mérgező algavirágzásról abban az esetben beszélünk, amikor a vízvirágzásban előforduló planktonszervezetek olyan anyagcseretermékeket termelnek, amelyek egyes élőlénycsoportra mérgező hatást gyakorolnak, valamilyen biológiai tesztben toxikusnak minősülnek.

Munkánkban áttekintettük a *P. parvum* félszikes élőhelyeken történő megjelenését és az általa okozott mérgezéses eseteket. A faj által előidézett tömegtermelésből és izolált törzseiből új, a fajhoz köthető proteolitikus hatóanyagcsaládot írtunk le, amelyek karakterizálását, jellemzését szintén

elvégeztük. A toxincsalád jellemzésén túl áttekintettük lehetséges funkcióit a mérgezésben és táplálkozásban egyaránt (Vasas et al., 2007; 2012).

Az algatoxinok termelésének, előfordulásainak, valamint a környezetben betöltött szerepük vizsgálatának elengedhetetlen feltételei azok a környezetanalitikai technikák, amelyek segítségével a toxinok jelenléte, mennyiségi viszonyai meghatározhatóak. Az algatoxinok egyik igen jellemző sajátossága az a kémiai és egyben hatástani sokszínűség, ami nagyban megnehezíti a toxinok analitikáját. Munkánkban rutin környezet-analitikai módszereket fejlesztettünk, aminek segítségével a leggyakoribb és legjelentősebb cianobakteriális toxinok mérése megoldható környezeti valós mintákból és laboratóriumi tenyészetekből egyaránt (Vasas et al., 2002; 2004; 2006).

A toxintermelés szabályozása és egyes környezeti hatások valós szerepe a mérgező metabolitok termelése kapcsán mind a mai napig nem tisztázott (Bácsi et al., 2013). A tápanyagok hatása a cianobakteriális toxintermelésre kritikus lehet, hiszen éppen ezek azok a fő faktorok, amelyek következtében a fotoszintetizáló sejtek tömegei kialakulnak. Egy nitrogénfixáló toxintermelő cianobaktérium, az *Aphanizomenon ovalisporum*, melynek toxintermelése jól jellemzett, alkalmas modell ilyen jellegű kutatásokhoz. A szulfátot, foszfátot illetve nitrátot optimális mennyiségben tartalmazó tenyészethez képest mind a kénéheztetett, mind a foszforéheztetett, mind pedig a nitrogénéheztetett tenyészetben a növekedés gátlást szenvedett. Azonban mindhárom növekedési paraméter esetén különböző mértékű a gátlás a különböző éhezési körülmények között. Legnagyobb mértékű a növekedés gátlása a kénéheztetett tenyészetben. A foszforéheztetett tenyészet növekedése ennél jóval jelentősebb, nem sokkal marad el a nitrogénéheztetett tenyészet növekedésétől. A toxintartalomra vonatkozó vizsgálataink eredményei szerint a szulfát, a foszfát és a nitrát hiánya is a cilindrospermopszin tartalom csökkenéséhez vezet az *A. ovalisporum* sejtekben (Bácsi et al., 2006; 2007; Vasas et al., 2013).

A leggyakoribb mérgező 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 (Farkas et al., 2011; 2014). Munkánkban mikrocisztin termelő fajok toxintermelő képességének, toxin-variabilitásának tanulmányozását végeztük el sekély tavainkban előforduló algavirágzásokból. Régióink legjellemzőbb toxintermelő faja a *Microcystis aeruginosa*, melynek tömeges megjelenésekor a legjellemzőbb variánsa a MC-

LR. A mikrocisztinek koncentrációja vizeinkben a faj megjelenésekor szélsőséges értékeket vehet föl, köszönhetően a változatos kemotípusok együttes előfordulásának (Farkas et al., 2011; 2014). Egy téli időszakban regisztrált *Microcystis* virágzás során megvizsgáltuk a mikrocisztin termelő képességen túl, a jégbefagyott toxintermelő sejtek életképességét, amely a faj lehetséges áttelelési stratégiájának és a koratavaszi tömeges megjelenésének magyarázata lehet (Vasas et al., 2010). Munkánkban megállapítottuk, hogy az általunk leírt jégbefagyott vízvirágzásban olyan toxintermelő életképes sejtek tömegével találkozunk, melyek a koratavaszi virágzások toxintermelő képességét nagyban meghatározhatják (Vasas et al., 2010). Nagyszámú eredményt találunk az irodalomban arra vonatkozóan, hogy mikrocisztin-tartalmú tápoldattal való kezelés, vagy mikrocisztin tartalmú vízzel való öntözés káros hatással van a növényi növekedésre, befolyásolja a növényi enzimek aktivitását. Több kutatócsoport számolt be ilyen irányú megfigyeléseiről mind vízinövények, mind haszonnövények esetében (Máthé et al., 2013). Ugyanakkor valós körülmények között megfigyelt toxin okozta növényi károsodás kifejezetten ritka az irodalomban. Munkánkban áttekintettük a cianobakteriális toxinok növényekre gyakorolt hatását egy valós növényi degradáció kapcsán, ahol mikrocisztin tartalmú öntözővízzel locsolt fűfélék pusztulását regisztráltuk (Bácsi et al., 2009; 2011). A megvizsgált mesterséges tóban megjelenő *Microcystis* fajok toxintermelése az általunk elvégzett vizsgálatok alapján a növények (fűfélék) degradációját előidézhette, ilyen jellegű káros következményekkel egyes algavirágzásos események kapcsán számolhatunk (Bácsi et al., 2011).

Egy jellemzően alpesi rétegzett mélytavakban előforduló cianobaktérium, a *Planktothrix rubescens* szokatlan sekélytavi megjelenésekor vizsgáltuk meg a toxintermelő képességen túl azokat a jellemző genetikai faktorokat, melyek a természetes tömegprodukciókban előforduló toxinvariabilitást és a szélsőségesen alacsony illetve magas toxintartalmat okozhatják egy adott faj tömeges előfordulása során (Vasas et al., 2009; 2013).

Amióta a *C. raciborskii* tömeges megjelenése kapcsán mérgezéseket és toxinok jelenlétét tapasztalták a világ egyes tájain (Ausztrália, Dél-Amerika), kitüntetett figyelemmel kísérik a faj terjedését minden régióban. A hazai megjelenések miatt és egy általa okozott algavirágzás következményei mentén megvizsgáltuk a faj európai kemotípusának jellemzőit és az esetleges toxintermelésének sajátosságait. A toxin tényleges jelenlétét bizonyító méréseink alapján a magyarországi *C. raciborskii* és *A. ovalisporum*

virágzásminták valamint izolátumok cilindrospermopszint nem tartalmaztak (Vasas et al., 2010).

A *C. raciborskii* változatos toxintermelő képességét egy 10^6 /ml-es fonalszámmal jelentkező vízvirágzás során figyelhettük meg (Vehovszky et al., 2014). Az algavirágzásból gyűjtött mintából, valamint annak fenntartott izolátumából megvizsgáltuk a lehetséges ismert toxinok jelenlétét. Eredményeink alapján a szervezet anatoxin hatású komponens(ek)e)t tartalmaz, melyek neurotoxikus terepi következményekért felelősek lehetnek. A hazai jelentőségen túlmutat a neurotoxikus *C. raciborskii* kemotípus azonosítása, amely megjelenése a tágabb régióra is jellemző lehet, felveti a neurotoxikus forma európai megjelenését és egyértelműen bizonyítja újabb toxincsaládok jelenlétét a fajban (Vasas et al., 2010; Vehovszky et al., 2014).

Munkánkban áttekintettük a cianobakteriális toxinok változatosságát, lehetséges hatásait és funkcióit. A felszíni vizekben jelentkező algavirágzásokon túl az egyik ilyen hatás, kifejezetten káros következmény a táplálékként illetve táplálék-kiegészítőkként hasznosított alga és cianobaktérium fajokban megjelenő toxinok közvetlen a humán szervezetre gyakorolt hatása is. Az algatoxinok kétarcúságára is felhívtuk a figyelmet, hiszen az ismert toxinok és az algákból folyamatosan azonosított erős hatású komponensek veszélyesek, mérgezőek, de sokszor különleges hatással bíró ígéretes metabolitok (Vasas et al., 2010; Vasas, 2014).

Az elmúlt évtizedekben a világ számos pontján mind gyakoribbá váló mérgező algavirágzások és a velejáró mérgezéses tünetek, káros következmények komoly kihívást jelentenek a tudomány képviselői számára. Értekezésünkben a környezetünkben megjelenő mérgező algavirágzásokkal, toxinokkal és azok esetleges és valós következményeivel foglalkoztunk. Tudományos eredményeink felhívják a figyelmet e jelenségek változatosságára és gyakran végzetes következményeire, melyek a vizes és szárazföldi élőhelyek élőlényközösségeit egyaránt veszélyeztethetik.

9. Anyag és módszer

9.1. A cianobaktérium és alga törzsek

A munkánk során használt cianobaktérium és alga izolátumok hazai illetve spanyol, ausztrál, izraeli és USA Texas állambeli vízterek algaközösségeiből származnak. A pontos származási helyeket az eredmények ismertetése során mutattuk be. Algavirágzásokból származó környezeti mintáink minden esetben a látható sejttömeg merített mintáiból származnak, a gyűjtött sejteket fagyasztással (-20 °C) illetve liofilezett állapotban tároltuk.

9.2. A vízvirágzást okozó planktonikus szervezetek azonosítása

A vízvirágzásból származó planktonikus fotoszintetizáló szervezeteket tartósított (Lugol) valamint élő mintákon vizsgáltuk Olympus BX-50 fénymikroszkópon. A szervezetek határozása Anagnostidis és Komárek „Modern approach to the classification system of cyanophytes. I-II.” alapján végeztük. A *Planktothrix rubescens* törzs esetében a taxonómiai, filogenetikai pozicionálást 16S rRNS és fikocianin operon (*cpcBA*-IGS) gének segítségével végeztük. A *Prymnesium parvum* fénymikroszkópos azonosítása Starmach (1985) alapján történt. A Manning és munkatársai (2010) által kifejlesztett multiplex PCR módszerrel specifikus anyagcsere gének alapján (GMP1, SYNAP1, GST, és FUCO primerek) molekuláris azonosítást is végeztünk (Vasas et al., 2012).

9.3. A cianobaktériumok izolálása és tenyésztése

A toxikus szervezetek vizsgálata során bevált általános tapasztalat, hogy az adott toxikus vízvirágzást okozó cianobaktériumot izolálják és laboratóriumi tenyésztése során tesztelik toxicitását. A cianobaktériumok laboratóriumi tenyésztéséhez, a plankton mintázása során vett vízmintákat tartósítás nélkül üres szcintillációs (Packard) küvettába gyűjtöttük, míg a víz felszínén felgyülemlett sejttömegből a toxikológiai teszthez vettünk mintát. Az algaömeget a toxin degradálódásának megakadályozására hűtőbe helyeztük. A cianobaktériumok tenyésztése során a BG-11 és Allen tápoldat használatuk (Allen, 1968).

9.4. A heterociszták izolálása

A heterociszták izolálásához a Smith és munkatársai által kidolgozott módszert alkalmaztuk, kis módosításokkal (Bryant, 1993).

9.5. A nitrogenáz enzimkomplex kimutatása a nitrogénéhezés körülményei között

A nitrogenáz enzimkomplex kimutatásához minden nap 2 ml mintát gyűjtöttünk a nitrogénéhezéshez beállított tenyészetekből. Első lépésben a fehérjék szétválasztása történt meg gélelektroforézis segítségével (Laemli, 1970). A futtatás SDS tartalmú (denaturáló), 7,5 %-os akrilamid gélen, 25 mA áramerősség mellett, minigél rendszerben zajlott 1,5 órás futtatási idővel. A nitrogenáz enzimfehérje (antigén) és az ellenanyagok között kialakított komplex kimutatására (előhívás) a Sigma szubsztrát oldatát használtuk (Vasas et al., 2013).

9.6. A toxintesztek

A felnevelt tenyészeteket késői exponenciális fázisban centrifugáltuk (Beckman Avanti J-25 12 000 × g) és a sejt üledéket –20 °C-on háromszor lefagyasztottuk - felolvasztottuk a sejteltartalom feltárása érdekében. A feltárt sejtüledéket liofilezéssel víztelenítettük és a toxintesztek során az IC₅₀ valamint az LD₅₀ értékeket szárazanyagtartalom/térfogat (mg/ml, µg/ml) értékben adtuk meg. A minták toxicitásának méréséhez, a mikrocisztin kimutatására és toxikológiai tesztelésére kidolgozott csíranövénytesztet, valamint továbbfejlesztett változatát használtuk (Vasas et al., 2002). Az algák, cianobaktériumok toxicitásának méréséhez a Kós és munkatársai által, mikrocisztin kimutatására és toxikológiai tesztelésére kidolgozott csíranövénytesztet használtuk (Blue-Green Sinapis Test). A *Prymnesium parvum* minták toxicitását hal- és daphnia-tesztekkel vizsgáltuk, melyeket nemzetközi szabványok szerint végeztünk.

9.7. A kromatográfiás eszközök

A toxikus anyagcseretermékek elválasztását Toyopearl HW-40-es molekulaszűrőn méretkizárásos kromatográfiával végeztük, az elválasztáshoz 50%-os etilalkohol mozgófázist alkalmaztunk. Az ioncserés kromatográfiát DEAE 52 (Whatman) ioncserélő cellulózon végeztük, mozgófázisként KCl lineáris sógrádienszt használtunk. A nyomást perisztaltikus pumpával biztosítottuk, az elválasztott anyagokat 50-80 db 7-8 ml-es frakciókba gyűjtöttük, frakciószedő (Frac-300, Pharmacia Fine Chemicals) segítségével. A HPLC-s analíziseket, diódasoros UV-VIS detektorral ellátott Shimadzu LC-10AD vp-n folytattuk (40 °C). A HPLC-oszlop Superco Supelcosiltm SPLC-18 (25 x 10 mm, 5 µm), az eluens MeOH/H₂O 3 ml/perc (Vasas et al., 2006).

9.8. Kapilláris elektroforézis (CE)

A micelláris elektrokinetikus kromatográfiát (MEKC) Hewlett-Packard 3DCE (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) valamint PrinCE-700-as készülékkel, a detektálást diódasoros detektorral folytattuk. Méréseink poliiimiddel borított szilika kapillárisban történtek (Supelco; 48.5 cm × 50 µm, tényleges hossz: 40 cm). Az injektálás hidrodinamikus mintabevittel történt (100 mbar/s). Az alkalmazott feszültség 25 kV. A detektálás 270 nm-en történt. Az elektroferogramok rögzítése és kiértékelése ChemStation 7.01 (Hewlett-Packard) szoftverrel végeztük. A CE elektrolit 25 mM nátrium tetraborátot (pH 9.1) és 100 mM SDS-t tartalmazott. Az elektrolit és az analizált mintáinkat, Millipore Ultrafree Polysulfone membránnal (UFP1 THK24) szűrtük és 10 percig ultrahangos kezeléssel gázmentesítettük (Vasas et al., 2004; 2006).

9.9. NMR analízis

Az ^1H ^{13}C NMR-vizsgálatokat Bruker DRX-500 berendezéssel 500.13/125.79 MHz-en végeztük. 1D ^1H -NMR spektrum felvétele deuterált vízben (D_2O), 298K hőmérsékleten történt Shigemi küvettában (250 µl). A kétdimenziós HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) spektrum identikus $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ eredményét irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze (Vasas et al, 2013).

9.10. MALDI TOF analízisek

A MALDI-TOF MS analízist pozitív-ion módban Bruker Biflex MALDI-TOF tömegspektrométerrel folytattuk. A minta deszorpció/ionizációja 337 nm-en nitrogén lézerrel történt. A műszer kalibrálását malto-oligoszacharid $[\text{M}+\text{Na}]^+$ csúcsaival végeztük (m/z : 527.15, 689.21, 851.26, 1013.31 and 1175.36). A spektrumot 2,5-dihydroxybenzoésav (DHB) mátrixban vettük föl (0,5 µl matrix oldatot 0,5 µl mintával szobahőmérsékleten szárítottuk be). A DHB mátrix 10 mg DHB-t tartalmazott 0,5 ml etanol:víz (1:1/v:v) elegyében. A liofilezett analizálandó mintát vízben vettük fel, az identifikált mintánk báziscsúcsa az $[\text{M}+\text{H}]^+$ csúcs (Vasas et al., 2006; 2013; 2009; 2014)

9.11. Toxin-gének detektálása - PCR analízisek

A DNS kivonás fenol–kloroform módszerrel történt (Kurmayer et al., 2005), az adott toxinok termeléséért felelős génklaszterek jelenlétét specifikus primerpárokkal követtük nyomon.

A *Planktothrix rubescens* teljes génklaszterének tanulmányozásához a *mcy* klasztert teljes egészében átfedő, 2 kb méretű 28 primer párt alkalmaztunk. A deléció és inszerciós szekvenciák azonosításához, a hibás szakaszokat 500 bp méretű termékeket adó primerek segítségével is megvizsgáltuk (Christiansen et al. 2006). A szekvenálást a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte. Hungary), a szekvenciákat BLAST analízissel azonosítottuk. Az agaróz gélelektroforézis során 1%-os agaróz gél alkalmaztunk, festését etídium bromiddal végeztük. Az elválasztáshoz a reakcióelegyből 10 µl-t vittünk fel, a DNS markerből (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; Thermo Scientific) 1 µl-t. A detektálás Cleaver GelDoc Systemmel történt (Vasas et al, 2010; 2012; 2013).

9.12. A proteáz enzimaktivitások kimutatása poliakrilamid aktivitásgégeken

A proteáz enzimek kimutatásának jól bevált, általános módszere a Laemmli-féle gérendszer módosított formáinak alkalmazása, melynek lényege, hogy az SDS tartalmú poliakrilamid gélekbe megfelelő enzim szubsztrátot polimerizálunk, majd a géleket a futtatás és a megfelelő mosási lépések után, az enzimek működéséhez optimalizált körülmények között (puffer, pH, hőmérséklet, időtartam) inkubáljuk. A poliakrilamid aktivitásgégeken a szubsztráthoz kötődő festékekkel, a negatív festés elve alapján tehetjük láthatóvá a szubsztrátot hasító fehérjék sávjait (Laemmli, 1970; Schlereth et al., 2000). Ez a módszer lehetővé teszi a különböző fajokra jellemző enzimmintázatok (zimogramok) összehasonlítását. Az enzimsávok relatív molekulatömegének a meghatározása az UVI-TEC® programmal, míg az egyes sávok intenzitásának értékelése CpAtlas® program segítségével történt. Legalább három, egymástól független kísérlet géljeit elemeztük. Az eredményeket a Sigma Plot 11.0 program statisztikai és grafikai alkalmazásával értékeltük és ábráztuk (Vasas et al., 2012).

10. Irodalomjegyzék

A doktori mű alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

- Vehovszky, Á., Kovács, W. A., Farkas, A., Győri, J., Szabó, H., **Vasas, G.** (2014) Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloom-forming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary Environmental Toxicology DOI: 10.1002/tox.21789. **IF: 2.708 ***
- Vasas, G.**, Algák a gyógyászatban: In: Blázovics Anna, Mézes Miklós (szerk.) Természetes hatóanyagok a modern orvoslásban. Budapest: Szent István Egyetem Kiadó, 2014. pp. 101-104.
- Farkas, O., Gyémant, 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, 227-239. **IF: 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, 2434-2455. **IF: 2.129 ***
- Vasas, G.**, Surányi, Gy., Bácsi, I., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Gonda, S., Borbely, G. (2013) Alteration of cylindrospermopsin content of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria, Nostocales) due to step-down from combined nitrogen to dinitrogen Advances in Microbiology 3, 557-564. *
- Nguyen, N., M., Gonda, S., **Vasas, G.** (2013) A review on the phytochemical composition and potential medicinal uses of horseradish (*Armoracia rusticana*) root Food Reviews International 29, 261-275. **IF: 1.917**
- Máthé, Cs., Hamvas, M. M., **Vasas, G.** (2013) Microcystin-LR and cylindrospermopsin induced alterations in chromatin organization of plant cells: review Marine Drugs 11, 3689-3717. **IF: 3.978 ***
- Máthé, Cs., **Vasas, G.**, Borbély, G., Erdődi, F., Beyer, D., Kiss, A., Surányi, G., Gonda, S., Jámbrik, K., M-Hamvas, M. (2013) Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedling Acta Biologica Hungarica 64, 71-85. **IF: 0.504**
- Bácsi, I., B-Béres, V., **Vasas, G.** Possible Roles of Cyanotoxins in Species Interactions of Phytoplankton Assemblages In: Aloysio Da S Ferrão-Filho (szerk.) Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management. New York: Nova Publishers Inc., 2013. pp. 1-26.
- Gonda, S., Kiss, A., Emri, T., Batta, Gy., **Vasas, G.** (2013) Filamentous fungi from *Plantago lanceolata* L. leaves: Contribution to the pattern and stability of bioactive metabolites Phytochemistry 86, 127-136. **IF: 3.050**
- Gonda, S., Nguyen, N.M., Batta, Gy., Gyémánt, Gy., Máthé, Cs., **Vasas, G.** (2013) Determination of phenylethanoid glycosides and iridoid glycosides from therapeutically used *Plantago* species by CE-MEKC Electrophoresis 34, 2577-2584. **IF: 3.261**

- Bácsi, I., Török, T., B-Béres, V., Török, P., Tóthmérész, B., Nagy, S. A., **Vasas, G.** (2013) Laboratory and microcosm experiments testing the toxicity of chlorinated hydrocarbons on a cyanobacterium strain (*Synechococcus* PCC 6301) and on natural phytoplankton assemblages *Hydrobiologia* 710, 189-203. **IF: 1.985**
- B-Béres, V., Grigorszky, I., **Vasas, G.**, Borics, G., Várbíró, G., Nagy, S. A., Borbély, Gy., Bácsi, I. (2012) The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages? *Hydrobiologia* 691, 97-107. **IF: 1.985**
- Vasas, G.**, M-Hamvas, M., Borics, G., Gonda, S., Máthé, Cs., Nagy, Zs. L. (2012) Occurrence of a toxic *Prymnesium parvum* bloom with high protease activity is related to fish mortality in Hungarian ponds *Harmful Algae* 17, 102-110. **IF: 2.901 ***
- Gonda, S., Parizsa, P., Surányi, Gy., Gyémánt, Gy., **Vasas, G.** (2012) Quantification of main bioactive metabolites from saffron (*Crocus sativus*) stigmas by a micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) method *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 66, 68-74. **IF: 2.947**
- Beyer, D., Tándor, I., Kónya, Z., Bátori, R., Roszik, J., Vereb, G., Erdődi, F., **Vasas, G.**, M-Hamvas, M., Jambrovics, K., Máthé, Cs. (2012) Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba* *Annals of Botany* 110, 797-808. **IF: 3.449**
- Vasas, G.** (2011) Hatóanyagok, speciális anyagcseretermékek fotoszintetizáló algaszervezetek tömegprodukcióiból *Hidrológiai Közlöny* 91, 107-110.
- Kováts, N., Ács, A., Paulovits, G., **Vasas, G.** (2011) Response of lemna minor clones to microcystis toxicity *Applied Ecology and Environmental Research* 9, 17-26. **IF: 0.379**
- Jámbrik, K., Máthé, C., **Vasas, G.**, Beyer, D., Molnár, E., Borbély, G., M-Hamvas, M. (2011) Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-preferring nuclease activity in *Phragmites australis* *Journal of Plant Physiology* 168, 678-686. **IF: 2.791**
- Farkas, O., Mosolygó, Á., Horgos, T., **Vasas, G.** (2011) Toxintermelő *Planktothrix* cyanobaktérium fajok és *Prymnesium parvum* (Haptophyta) azonosítása molekuláris markerekkel *Hidrológiai Közlöny* 91, 39-42.
- Bácsi, I., Surányi, G., Gonda, S., Gyémánt, Gy., **Vasas, G.** (2011) Observation of sward destruction caused by irrigation with toxic *Microcystis* morphospecies containing water in southern Hungary *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86, 232-237. **IF: 1.018**
- Vasas G.**, Borbely, G., Nánási, P., Nánási, P.P. (2010) Alkaloids from cyanobacteria with diverse powerful bioactivities *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 10, 946-955. **IF: 2.622 ***
- Vasas G.**, Bácsi I., Suranyi, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Nagy, S. A., Borbely, G. (2010) Isolation of viable cell mass from frozen *Microcystis viridis* bloom containing microcystin-RR. *Hydrobiologia* 639, 147-151. **IF: 1.964 ***
- Szigeti, Z. M., Jámbrik, K., Roszik, J., M-Hamvas, M., Tándor, I., Beyer, D., **Vasas, G.**, Vereb, G., Surányi, G., Máthé, C. (2010) Cytoskeletal and developmental alterations in

- Ceratophyllum demersum* induced by microcystin-LR, a cyanobacterial toxin Aquatic Botany 92, 179-184. **IF: 2.087**
- Vasas, G.**, Surányi, G., Máthé, Cs., M-Hamvas, M., Borbély, G. (2010) Investigation of toxin content in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wołoszyńska) Seenaya and Subba Raju and *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) strains isolated from shallow lakes of Hungary Acta Biologica Hungarica 61,(SUPPL. 1) 218-225. **IF: 0.793 ***
- M-Hamvas, M., Mathe, Cs., **Vasas, G.**, Jambrik, K., Papp, M., Beyer, D., Meszaros, I., Borbely, G. (2010) Cylindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis Acta Biologica Hungarica 61,(SUPPL. 1) 35-48. **IF: 0.793**
- Jámbrik, K., Máthé, Cs., **Vasas, G.**, Bácsi, I., Surányi, G., Gonda, S., Borbély, G., M-Hamvas, M. (2010) Cylindrospermopsin inhibits growth and modulates protease activity in the aquatic plants *Lemna minor* L. and *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel Acta Biologica Hungarica 61,(SUPPL. 1) pp. 77-94. **IF: 0.793**
- Bácsi I., B-Béres V., **Vasas G.** (2009) Cianotoxinok; humán megbetegedések, hatásmechanizmusok Magyar epidemiológia/Hungarian epidemiology 6, 269-284.
- Beyer, D., Surányi, Gy., **Vasas, G.**, Roszik, J., Erdődi, F., M-Hamvas, M., Bácsi, I., Bátori, R., Serfőző, Z., Szigeti, Zs. M., Vereb, Gy., Demeter, Z., Gonda, S., Máthé, Cs. (2009) Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro Toxicon 54, 440-449. **IF: 2.128**
- Máthé, Cs., Beyer, D., Erdődi, F., Serfőző, Z., Székvölgyi, L., **Vasas, G.**, M-Hamvas, M., Jámbrik, K., Gonda, S., Kiss, A., Szigeti, Zs. M., Surányi, Gy. (2009) Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets Aquatic Toxicology 92, 122-130. **IF: 3.124**
- Gácsi, M., Antal, O., **Vasas, G.**, Máthé, Cs., Borbély, Gy., Saker, M. L., Győri, J., Farkas, A., Vehovszky, Á., Bánfalvi, G. (2009) Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells Toxicology in Vitro 23, 710-718. **IF: 2.060**
- Vasas, G.**, Bácsi, I., Gonda, S., Gyémánt, Gy., Farkas, O. (2009) Magyarországi *Planktothrix rubescens* vízvirágzás vizsgálata és toxintermelésének jellemzése Hidrológiai Közlöny 89, 76-78.
- Bácsi, I., Surányi, Gy., Gonda, S., Gyémánt, Gy., Szőnyi, A., **Vasas, G.** (2009) Toxintermelő *Microcystis* fajok megjelenése egy szegedi kerti tóban Hidrológiai Közlöny 89, 90-93.
- Máthé, Cs., M-Hamvas, M., **Vasas, G.**, Surányi, Gy., Bácsi, I., Beyer, D., Tóth, Sz., Tímár, M., Borbély, G. (2007) Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis* /Cav./Trin. Ex Steud.) plants regenerated from embryogenic calli New Phytologist 176, 824-835. **IF: 5.249**
- Vasas, G.**, Borics, G., Mikóné, Hamvas, M., Nagy, L. Zs., Bácsi I., Borbély Gy. (2007) *Prymnesium parvum* (Carter) algavirágzás és halpusztulás a hajdúszoboszlói Öregtávon

- az első toxikus eukarióta algavirágzás észlelése Magyarországról Hidrológiai Közlöny 87, 183-185.
- Bácsi, I., **Vasas, G.**, Surányi, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Tóth, Sz., Borbély, Gy. (2007) A kén- és foszforéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium cilindrospermopszin termelésére. Hidrológiai Közlöny 87, 162-165.
- 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. **IF: 1.403 ***
- Bácsi, I., **Vasas, G.**, Surányi, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Tóth, E., Grigorszky, I., Gáspár, A., Tóth, Sz., Borbély, G. (2006) Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate-or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* FEMS Microbiology Letters 259, 303-310. **IF: 2.068 ***
- Vasas, G.**, Gáspár, A., Páger, Cs., Surányi, Gy., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Borbély, Gy. (2004) Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis Electrophoresis 25, 108-115. **IF: 3.743 ***
- Törökné, A., Asztalos, M., Bánkiné, M., Bickel, H., Borbély, G., Carmeli, S., Codd, A. G., Fastner, J., Huang, Q., Humpage, A., Metcalf, J. S., Rábai, E., Sukenik, A., Surányi, Gy., **Vasas, G.**, Weiszfeiler, V. (2004) Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement Analytical Biochemistry 332, 280-284. **IF: 2.370**
- M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Molnár, E., **Vasas, G.**, Grigorszky, I., Borbély, Gy. (2003) Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings Aquatic Toxicology, 62, 1-9. **IF: 2.073**
- 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. **IF: 2.370**
- Vasas, G.**, Padisák, J., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Molnár, E., Surányi, Gy., Grigorszky, I., Borbély, Gy. (2002) A cilindrospermopszin termelés analitikai vizsgálata *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumokban Hidrológiai Közlöny 82, 143-144.

A doktori mű alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **71.146**

A doktori mű alapjául szolgáló első és utolsó szerzős közlemények összesített impakt faktora: **39.622**

*A doktori műben részletesen kifejtett közlemények összesített impakt faktora: **25.781**

Szakirodalmi hivatkozások

- Allen, M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. J. Phycol. 4, 1–4.
- Bell, S.G., Codd, G.A. 1994. Cyanobacterial toxins and human health. Rev. Med. Microbiol. 5, 256–264.
- Belykh, O.I., Sorokovikova, E.G., Fedorova, G.A., Kaluzhnaya, O.V., Korneva, E.S., Sakirko, M.V., Sherbakova, T.A. 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). Hydrobiologia. 671, 241–252.
- Boström, B., Pettersson, A.K., Ahlgren, I. 1989. Seasonal dynamics of a cyanobacteria-dominated microbial community in surface sediments of a shallow, eutrophic lake. Aqu. Sci. 51, 153–178.
- Bryant, D.A. The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- Carmichael, W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. Sci. Am. 270, 64–72.
- Chorus, I., Bartram, J. Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. WHO, Spon Press, London, 1999.
- Christiansen, G., Kurmayer, R., Liu, Q., Börner, T. 2006. Transposons inactivate the biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. Appl. Environ. Microbiol. 72, 117–123.
- Claire, J.W.L. 2006. Analysis of expressed sequence tags from the harmful alga, *Prymnesium parvum* (Prymnesiophyceae, Haptophyta). Mar. Biotechnol. 8, 534–546.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203, 264–272.
- Evans, W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy, 16th Edition. Saunders Ltd, Edinburgh, UK, 2009.
- 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.
- Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, 2008.
- Gademann, K., Portmann, C. 2008. Secondary metabolites from Cyanobacteria: complex structures and powerful activities. Curr. Org. Chem. 12, 326–341.
- Gago-Martínez, A., Leão, J.M., Piñeiro, N., Carballal, E., Vaquero, E., Nogueiras, M., Rodríguez-Vázquez, J. A. 2003. An Application of Capillary Electrophoresis for the Analysis of Algal Toxins from the Aquatic Environment. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 83, 443–456.
- Gathercole, P.S., Thiel, P.G. 1987. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. Chromatogr. A. 408, 435–40.

- Granéli, E., Edvardsen, B., Roelke, D.L., Hagström, J.A. 2012. The ecophysiology and bloom dynamics of *Prymnesium* spp. *Harmful Algae*. 14, 260–270.
- Kinnear, S. 2010. *Cylindrospermopsis*: A decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs*. 8, 542–564.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa*; Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D., Eds., Gustav Fischer, Jena. 1998.
- 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.). *Anal. Biochem.* 225, 49–53.
- Kosol, S., Schmidt, J., Kurmayer, R. 2009. Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Eur. J. Phycol.* 44, 49–62.
- Kromkamp, J.C., Mur, L.R. 1984. Buoyant density changes in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content. *FEMS Microbiol. Lett.* 25, 105–109.
- Kurmayer, R., Kutzenberger, T. 2003. Application of Real-Time PCR for Quantification of Microcystin Genotypes in a Population of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 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.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–685.
- Meriluoto, J., Codd, G.A. Toxic: cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Åbo Akademi University Press, Åbo, 2005.
- Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Monogr. Beitr.* 107, 563–593.
- Pelander, A., Ojanper, I., Lahti, K., Niinivaara, K., Vuori, E. 2000. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Res.* 34, 2643–2652.
- Pelander, A., Ojanpera, I., Sivonen, K., Himberg, K., Waris, M., Niinivaara, K., Vuori, E. 1996. Screening for cyanobacterial toxins in bloom and strain samples by thin layer chromatography. *Water Res.* 30, 1464–70.
- Preston, T., Stewart, W.D.P., Reynolds, C.S. 1980. Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on sediment surface. *Nature*. 288, 365–367.
- 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* Kutz Emend Elenkin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 293, 419–477.
- Schlereth, A., Becker, C., Horstmann, C., Tiedemann, J., Müntz, K. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryogenic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 51, 1423–1433.

- Takamura, N., Yasuno, M., Sugahara, K. 1984. Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kutz in a shallow lake. J. Plank. Res. 6, 1019–1029.
- Thomas, R.H., Walsby, A.E. 1985. Buoyancy regulation in a strain of *Microcystis*. J. Gen. Microbiol. 131, 799–809.
- Tsujimura, S., Tsukada, H., Nakahara, H., Nakajima, T., Nishino, M. 2000. Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan. Hydrobiologia. 434, 183–192.
- Walsby, A.E. 1994. Gas vesicles. Microbiol. Rev. 58, 94–144.
- Welker, M., Erhard, M. 2007. Consistency between chemotyping of single filaments of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) by MALDI-TOF and the peptide patterns of strains determined by HPLC-MS. J. Mass. Spectr. 42, 1062–1068.
- Welker, M., von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiol. Rev. 30, 530–563.