

Opponensi vélemény

Dr. Vasas Gábor: „Algavirágzások környezetterhelése és toxinjainak variabilitása” c. MTA doktori értekezéséről

Az értekezés a szokványos disszertáció struktúráját kissé eltérően szerkesztett 198 oldal terjedelmű mű. Az értekezés tartalmát illetően inkább tekinthető egy (vagy több) a témakörrel foglalkozó review munkának, melyhez Jelölt 43 közleménye szolgáltat saját vizsgálatokat. Ezen dolgozatok többnyire rangos folyóiratokban jelentek meg. Ez tükröződik Jelölt összesített impakt faktorának nagyságában, ami a mű alapjául szolgáló publikációk esetén 39,622. (Összes IF: 71,146). Ezen adatok egyfelől jelzik, hogy Jelölt munkái alapos bírálatokban részesültek, másfelől azt is mutatják, hogy szakterületén a doktori fokozat megszerzés kritériumainak megfelel. A téma aktualitásához nem fér kétség. Ezt az értekezés különböző részeiben, esetenként ismétlésnek tűnően, a gazdasági jelentőségre az utalások is jelzik. A vízi élővilág vizsgálata pl. a gyógyszerkutató területén az utóbbi két-három évtizedben előtérbe került. Ezt többek között a kis anyagmennyiségben jelenlévő anyagok gyors, nagy felbontóképességű, nagy hatékonyságú műszeres vizsgálata tette lehetővé. A munka imponálóan nagy irodalom feldolgozásával készült. A szűrőpróba szerinti ellenőrzés alapján a hivatkozások korrektek, gondosan összeállítottak. 547 hivatkozás található a „Hivatkozott irodalom” összeállításban. Az önállóan feltüntetett, saját szerzőségű dolgozatok a szöveges részben szintén citálásra kerülnek. Az értekezés nyelvezete jól érthető, kevés elírást tartalmaz. A táblázatok (11 db.), ábrák (30 db.) a szöveges részben foglalt mondanivalóval összhangban, azokat megfelelően illusztrálva szerepelnek. Az ábrák olvashatósága azonban esetenként a láthatóság határát súrolja (pl. 9, 10, 22 ábra). A rövidítések külön felsorolása táblázatosan hasznos lett volna. Így, pl. a MC, CYN a 31. oldalon, stb. megjelölések minden magyarázat nélkül jelennek meg a szövegben; csak később találja meg az olvasó a rövidítések értelmét. További, ugyancsak nem a lényegre érintő észrevétel, hogy a fajok latin genus neveinek kiírása és rövidítése az indokoltnál gyakrabban nem konzekvens.

Az értekezés felosztása a decimális rendszert követi. A „Bevezetés és célkitűzések” 4 oldal terjedelemben a vizsgálatok fontossága mellett ismerteti azt a 7-8 témakört, melyek részletezésére sor kerül.

Az 2. „Irodalmi áttekintés” (8-44 oldal) rész 8 alfejezetben foglalkozik az algavirágzással. Előbb az értelmezésével, majd a mérgező tengeri algákkal, a fontosabb 8 mérgezési típus leírásával, s a toxikus algavirágzás sajátosságaival. „2.4. A ciánobakteriális vízvirágzások előretörése” címet viselő fejezet alfejezetei a saját munka szempontjából a közvetlenebbül kapcsolódó irodalom áttekintésére koncentrálnak. Ökológiai vonatkozásban fontos a tápanyagok (N és P aránya), a széndioxid, a pH és a sótartalom, valamint a fény szerepének tárgyalása. Ezt követően a 2.5. fejezetben szerepel a cianobaktériumok jellemzése, felépítésük leírása. Bíráló ezt a fejezetet a 2-es alfejezet bevezetőjeként szerepeltette volna, s a tápanyagokra vonatkozó részt a „Cianobakteriális ökostratégiák” fejezethez jobban kapcsolódó helyen mutatta volna be. A 2.7. fejezet „A cianobakteriális toxinok” 7 típusát ismerteti, megadva a leggyakrabban tárgyalt toxinok képleteit és a további tárgyalások során használt vegyületnevek rövidítéseit. (3. ábra). (A 3. ábrán a vegyületek vázának számozásával a 31. oldalon a szubsztituensek elhelyezkedése az olvasó számára követhetőbb lett volna.) A „2.8. A mérgező algavirágzások következményei” c. fejezet az 1. sz. táblázatban, 4 oldal terjedelemben, irodalmi adatok feltüntetésével ad áttekintést a ciánobakteriális vízvirágzásokról, azok következményeiről. Az irodalmi utalások számbavételével az algavirágzások komplex, szerteágazó hatásait szemlélteti a 4. ábra. Ezen egység önálló dolgozatként is felfogható.

A 3-7. fejezetek a 2-vel azonos szinten tárgyalva ugyancsak bőségesen tartalmaznak irodalmi adatokat, gondolatmenetükben, tartalmukban esetenként megismételve a már korábban rögzítetteket. E fejezetek Jelölt munkájához közvetlenül kapcsolódó organizmusokra vonatkoznak, fejezetenként akár önálló esettanulmányokként is számba vehetők.

A „3. *Prymnesium parvum* toxintermelése” fejezetben (45-59 oldal) Jelölt az alga részletes szöveges bemutatását fényképpel egészíti ki. Irodalmi adatokra hivatkozva írja Jelölt a *Prymnesium parvum* fejlődésének leírásakor, hogy a vízvirágzáshoz B12 és B1 vitamint is igényel az alga (p.45). Ez, hogyan értelmezendő? Az 5. ábrán az R1, R2, R3 csoportok hogyan kapcsolódnak a molekulavázhoz? A jelölések peroxid kötésekre utalnak. A *Prymnesium* toxinok hatását irodalmi adatok felhasználásával ismerteti Jelölt. Egy 1953-as hivatkozásra utalva (47 oldal) írja, hogy „a szabad ammónia és nem az ammónium ionok a felelősek a lízisért”. Ezt hogyan lehet elképzelni? Vizes közegben az ammónia ammónium ion formájában lehet jelen. A *Prymnesium parvum* hazai előfordulásával, mérgezésekkel, s azok sajátosságaival 6 eset kapcsán foglalkozik Jelölt. Zselatinbontó proteáz aktivitást tartja jellemzőnek a toxikus törzsek megjelenésekor. A proteázok kimutatása, analízise poliakrilamid aktivitásgélen történt a molekulatömegük alapján. A hatás (toxicitás) és komponensszám pH függését zimogramok formájában és táblázatban (4. táblázat) szemlélteti Jelölt. Olvasóban kérdésként vetődik fel, hogy az egyéb toxinokat is tartalmazó algának miért „csak” ezt a toxinköre került vizsgálatra, mi a helyzet az egyéb toxinokkal? Nyilvánvalóan számos nyitott kérdés merül fel a proteázok toxicitásával kapcsolatban is, ami a vizsgálatok taglalását követő többoldalas diszkusszióból is kiderül. A változó pH esettén kimutatott „összetétel különbségek” kapcsán kérdésként vetődhet fel, hogy magában a sejtekben meglévő, és/vagy csak külső hatásra átalakuló anyagokról van-e szó? A proteázok érzékenységeire utalnak az irodalmi adatok is, melyeket Jelölt is citál (p.56). Természetesen érdekes lett volna a molekulatömegén túl, ha ezen proteázokról többet is megtudhattunk volna, pl. izolálást követő szerkezet-vizsgálatok nyomán. Így pl. koenzimek szerepelnek-e a hatás kifejtésekor, stb.?

A „4. Cianobakteriális toxinok kapilláris elektroforézise” fejezet (60-69) ismerteti azokat a fontosabb módszereket, melyeket a toxinok vizsgálatánál hasznosítani lehet (8. ábra). Ezek közül a kapilláris elektroforézis alkalmazását, a módszer adaptálását sikeresen valósította meg, s alkalmazta a toxinok analízisére. E kifejezetten módszertani fejezet mellett az értekezés végén is szerepel egy módszertani összeállítás. Ezeket lehetett volna együtt tárgyalni, s más értekezésekhez hasonlóan az eredmények bemutatása előtt! Egy ilyen felfogású tárgyalással sem sikerült volna el Jelölt munkájának novum jellege a metodika terén, azaz a *Microcystis aeruginosa* toxinjainak (mikrocisztin-LR, -YR, -YA, valamint a cilindropermopszin, anatoxin-a) elválasztását, így jelenlétük kimutatását lehetővé tevő módszer kidolgozásának újdonsága.

Az „5. A cianobakteriális toxintermelés sajátosságai” (70-102) fejezet 20 oldal terjedelemben (5.1-5.3 alfejezetek) ad átfogó képet a terepi megfigyelések tapasztalatairól, környezeti faktorok toxintermelésre kifejtett hatásáról. (A 72 oldalon Long és munkatársaira a hivatkozás elmaradt). Ismereteket szerzünk a *Microcystis* fajok toxinjáról, bioszintézisük genetikai hátteréről; a toxintermelésért felelős génklaszterről. Részletező a leírás a nodularin bioszintézisével és a cilindropermoxin, szaxitoxinok molekuláris szabályozásával kapcsolatban is. Ezen szintén review jellegű összeállítás a toxinok funkciójának elemzésével egészül ki.

Az „5.4 nitrogén- foszfor-, és kénéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cilindropermopszin termelésre” c. alfejezet (90-102 oldal) ismerteti és megfelelően szemlélteti Jelöltnek a baktérium tenyészetekkel kapcsolatos munkáját. 11 ábrán meggyőzően illusztrálja a tápanyagmegvonás (S, N, P) hatásait. (Megjegyzés: A 98 oldalon a 16. ábra kerülhetett volna egy korábbi helyre, pl. 95 oldalra). A cilindropermopszin tartalom száraz tömegre és sejtszámra vonatkozó változásának követése új, többlet információval szolgált a változás mikéntjének leírásában, mintha csak az egyik viszonyítási alapot vette volna számításba. A leírást korrektnek, érdekesnek és értékesnek tartom. A tápanyagelvonás jelensége egy a korábbi megállapítással, azaz azzal, hogy pl. a csökkent N koncentrációk közegben nő meg a toxicitás (p. 71), itt Jelölt az ellenkezőjét tapasztalta. Ez hogyan magyarázható?

A „6. Mérgező cianobakteriális vízvirágzások - esettanulmányok” (103-127) fejezet első témája a *Microcystis aeruginosa* és *Planktothrix* (*P. agardhii*) fajok 14 hazai víztérben az előfordulásáról szól. Az 5. táblázat (p. 104) a mikrocisztin koncentrációt az IC50 értékeket és a kimutatott mikrocisztin formákat szerepelteti. Kérdésként vetődik fel, hogy a toxikusság értékét mire

vonatkoztatja Jelölt? Amennyiben csak csíranövényeken mérték a toxicitást, akkor hogyan lehet az IC50 értéket meghatározni? Ezek más élőlényekre mennyire vonatkozathatók? Az áttelelésre vonatkozó megállapítások, a jégből izolált élő *Microcystis* kolóniák vizsgálata, a toxinképességük megőrzése, ill. módosulása érdekes új megfigyelésnek számít. Egy szegedi tóból származó mintában 4 *Microcystis* fajt mutattak ki. Kérdés, hogy ezek más hazai tavakban is jelen voltak/lehetnek? A toxinok más növényekre kifejtett vizsgálata metodikai és gazdasági, ökológiai szempontból is érdeklődésre számot tartó kérdés. A *M. aeruginosa* tenyészetéből 9 mikrocisztint valószínűsítettek, melyek közül MALDI-TOF mérésekkel négyet a mol tömegével is jellemeztek (6. táblázat). E fejezetben a cianobaktériumok kivonatának angol perjére kifejtett hatását is vizsgálták. Egyértelmű gátlást mutatnak a 22. ábra adatai. Kérdés, miért ezt a növényt választották a gátló hatás vizsgálatára? (A kérdésre valószínűleg a 7. táblázatban a mikrocisztin és cilindrospermopszin növényekre kifejtett hatásvizsgálatok adatai szolgálhatnak válaszul. E négy és fél oldalas táblázatban Jelölt az irodalomban a toxintartalomnak a növényekre kifejtett hatását foglalta össze.)

A *Planktothris agardhii* és a *Microcystis aeruginosa* mikrocisztinek termelésében *mcy* klaszter génszakaszának elemzése, az egymást követő gének leírása, egyes szakaszok mutációja magyarázatul szolgál a toxintermelés alakulására. A *P. rubescens* (mely alpesi tavakra jellemző előfordulású erősen toxikus szervezet) leírása hazánk területéről érdekes adatnak számít. Előfordulására vonatkozó adatok, beleértve a toxintermelő molekuláris háttér értékelése, a mikrocisztin-RR azonosítása mind-mind értékes új megállapításnak tekinthetők. A hazai előfordulást értelmező magyarázat logikusnak tűnik.

„7. A *Cylindrospermopsis raciborskii* toxintermelésének sajátosságai a mikroalgák hasznosítása során” (128-133) fejezet nem tartalmaz alfejezeteket. 11 *Cylindrospermopsis raciborskii* törzset vizsgáltak cilindrospermopszin tartalomra. Ellentétben külföldi törzsek mintáitól a hazaiak nem tartalmazták ezt a toxint. Kérdésként vetődik fel, hogy ez minden időben, minden hazai vízterre igaz lehet? (A 9. táblázatban a mintavételezések időpontját is érdemes lett volna feltüntetni.)

„8. A cianobakteriális toxinok jelentősége a mikroalgák hasznosítása során” c. (p 134-142) fejezet a címnek megfelelően a mikroalgák táplálékkénti, vagy biológiai, humán vonatkozású hasznosíthatóságát elemzi Jelölt az irodalmi adatok alapján. Összefoglalót ad a metabolitok sajátosságairól, így a magasabb rendű növények hatóanyag-termelésének sajátosságairól is ezt saját vizsgálatokkal illusztrálva. (p.137, 29. ábra). Megítélésem szerint ennek itt nincs relevanciája. Ezek, a más területen végzett kutatásokra történő utalások kiesnek a disszertáció tárgyköréből. Leginkább Jelölt kapilláris elektroforézis módszerének más területeken történő alkalmazását példázza. A 8.3 fejezetben a cianobakteriális alkaloidok ismertetése is szerepel egyebek mellett képletek feltüntetésével.

9. Összefoglalás (143-147 oldal) fejezet a disszertációban tárgyalt hét területre vonatkozó megállapításokat sűriti. Ez a rész egy az egyben szerepel a doktori tézisek füzetben is. Utóbbival kapcsolatban megemlíthető, hogy az hűen tükrözi felosztásában, ábra anyagában a disszertáció lényegét 34 oldal terjedelemben. Itt is külön szerepelnek Jelölt saját munkái és a legfontosabb egyéb hivatkozások.

10. Anyag és Módszer (148-153 oldal). Az elhelyezésére vonatkozó megjegyzésemet már korábban megtettem. E fejezet összegzi a legfontosabb módszereket, melyeket a munka során felhasznált Jelölt. Ezek a minták az analízisére koncentrálnak, s azon információk a részletesebbek, helyesen, melyeket a jelölt végezett. A kooperációban folytatott vizsgálatok érthetően elnagyoltabbak. (Pl. A szöveges részben pl. NMR vizsgálatok nem szerepelnek, csak irodalmi összevetésre történik utalás.) A fejezetben nem szerepelnek olyan részletek, melyek alapján a módszerek reprodukálhatóságáról lehetne tájékozódni. (A referált folyóirat hivatkozások nyilvánvalóan ilyen adatokat is tartalmaznak.) Hivatkozások korrekt módon utalnak az alkalmazott módszerekre. Szépen illusztrálják a sokrétű munkát.

11. Köszönetnyilvánítás (154. oldal) helyesen utal a kooperációban elvégzett munkákra is.

12. Irodalomjegyzék (155-195) A már említett imponálóan széles körű jegyzék kiegészül a saját felhasznált irodalommal. Ez utóbbi önálló jegyzéket jelent, de a szöveges részben hivatkozásként nem különül el az egyéb hivatkozásoktól. Itt időben visszafelé menő, nem abc szerinti felsorolást használ Jelölt, míg az egyéb hivatkozásoknál abc szerinti és növekvő időrendi sorrendet. A „Harvard system” szerinti közléseknél az azonos évben társszerzőkkel közölt hivatkozások a szöveges részben, és az irodalomjegyzékben abc megjelölésekkel nincsenek minden esetben ellátva, pl. Vasas et al, 2013, 2011, stb., több dolgozatot is jelent a jegyzékben.

A fentebb megfogalmazott kérdésekhez továbbiak:

- Mennyire látja általánosíthatónak a dolgozatban tált vizsgálatok eredményeit más hazai algavirágzások eseteire?
- Kimutathatók-e a nitrogén és foszfor környezetszennyezőkön kívül más szennyezők hatása a vízvirágzásokra, melyek pl. a mezőgazdasági művelésből adódnak?
- A kémiai ágensek ismerete mennyire vehető figyelembe s, milyen taxonómiai szinten a nagymértékben változó cianobakteriumok osztályozásánál?

Jelölt néhány általam fontosnak, novumnak tekintett eredménye:

- Öt nemzetségbe (a *Prymnesium*, *Planktothris*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*) tartozó fajok által okozott hazai tavak vízvirágzásait jellemezte, toxikológiai szempontból
- A *Prymnesium parvum* toxinjai közül a proteázok jelentőségére felhívta a figyelmet, s aktivitásukat jellemezte moltömeg és pH érzékenyséjük alapján.
- Kapilláris elektroforézis technikán alapuló módszert dolgozott ki a hazánkban előforduló fontosabb mikrocisztin toxinvariánsok gyors és biztonságos elválasztására mennyiségi mérhetőségére
- Kimutatta a N, P, és S éheztetés hatását az *Aphanisomenon ovalisporum* fitomassza, sejtszám és cilindropermopszin termelésére
- *Cylindrospermopsis raciborskii* hazai állományai nem termelnek a fajra egyébként jellemző cilindropermopszint. Ezt a toxintermelésért felelős génklaszter vizsgálatával is alátámasztotta.

Összegző véleményem az értekezéséről a következő: A szerteágazó tevékenységet összesítő értekezés a morfológiai, ökológia, kémiai és molekuláris biológiai szemlélet ötvözeteként megjelenő értékes interdiszciplináris jellegű munka, mely Jelöltnek a szakterülettel kapcsolatos széles látókörére is utal. Az értekezésben foglaltak, valamint Jelölt eddigi munkássága alapján az értekezés nyilvános vitára kitűzését javaslom. Jelöltet alkalmasnak tartom az MTA doktori fokozat elnyerésére.

Budapest, 2015. január 22.

Dr. Máthé Imre
a biol. tud. doktora