

dc_819_13

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Algavirágzások környezetterhelése és toxinjainak
variabilitása**

Dr. Vasas Gábor

Debreceni Egyetem

Debrecen, 2014.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	4
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Vízvirágzás, algavirágzás	8
2.2. Mérgező tengeri algák: toxinok és mérgezések	12
2.2.1. Bénulósos kagylómérgezés (PSP)	14
2.2.2. Neurotoxikus kagylómérgezés (NSP)	14
2.2.3. Ciguatera halmérgezés (CFP)	15
2.2.4. Azaspirsavakhoz köthető mérgezés (AZP)	16
2.2.5. Jesszotoxin mérgezések (YTX)	16
2.2.6. Palytoxin mérgezések (PTX)	16
2.2.7. Domoénsav (DOM) és az amnéziás kagylómérgezések (ASP)	17
2.2.8. Okadainsav (OA)	18
2.3. A tengeri toxikus algavirágzások sajátosságai	18
2.4. A cianobakteriális vízvirágzások előretörése	21
2.4.1. A hőmérséklet és vízszlop stabilitása	21
2.4.2. A tápanyagok	22
2.4.3. A széndioxid, pH és a vizek sótartalma	23
2.4.4. A fény	23
2.4.5. A növekedés üteme és a populációk állandósága	24
2.5. A cianobaktériumokról	25
2.6. Cianobakteriális ökostratégisták	27
2.7. Cianobakteriális toxinok	29
2.7.1. Ciklikus peptidek: mikrocisztinek, nodularinok	29
2.7.2. Cilindrospermopszin	31
2.7.3. Anatoxinok	32
2.7.4. Szaxitoxinok	33
2.7.5. BMAA	34
2.7.6. Dermatotoxikus alkaloidok – az apliziatoxinok és a lingbiatoxinok	35
2.7.7. Irritáló hatású toxinok – a lipopoliszacharidok	35
2.8. A mérgező algavirágzások következményei	37
3. A <i>Prymnesium parvum</i> toxintermelése	45
3.1. Az „aranyalga”, <i>Prymnesium parvum</i>	45
3.2. A <i>Prymnesium parvum</i> toxinjai	46
3.3. <i>Prymnesium parvum</i> által okozott algavirágzások	47
3.4. Proteázok	49
3.5. A <i>Prymnesium parvum</i> hazai előfordulásai, mérgezések és proteolitikus hatások	50
4. Cianobakteriális toxinok kapilláris elektroforézise	60
4.1. Kihívások az algatoxin analitikában	60
4.2. Mintaelőkészítés	62
4.3. Biológiai módszerek	62
4.3.1. <i>in vivo</i> vizsgálatok	62
4.3.2. Immunológiai vizsgálatok	63

4.3.3. Biokémiai vizsgálatok	63
4.4. Fizikai és kémiai módszerek	63
4.5. Elektroforetikus technikák	65
5. A cianobakteriális toxintermelés sajátosságai	70
5.1. Terepi megfigyelések, tapasztalatok	70
5.2. A cianobakteriális toxintermelés laboratóriumi vizsgálatai	72
5.2.1. Mikrocisztin - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata	72
5.2.2. A mikrocisztin bioszintézise és molekuláris szabályozása	72
5.2.3. Nodularin - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata	74
5.2.4. A nodularin bioszintézise	75
5.2.5. Cilindropermopszin - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata	76
5.2.6. A cilindropermopszin bioszintézise és molekuláris szabályozása	76
5.2.7. Szaxitoxin és származékai - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata	78
5.2.8. A szaxitoxin bioszintézise és molekuláris szabályozása	79
5.2.9. Anatoxinok - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata	79
5.2.10. Az anatoxin bioszintézise és molekuláris szabályozása	80
5.3. A cianobakteriális toxinok funkciója	81
5.3.1. Versenyelőny	81
5.3.1.1. Versenyhátrány, ragadozó jelenléte	82
5.3.1.2. Fogyasztók elleni védelem	82
5.3.1.3. Allelopátia	84
5.3.2. Toxinok, mint fiziológiai segédanyagok	85
5.3.2.1. Tápanyag felvétel segítése	85
5.3.2.2. Hatás a vas-forgalomra	86
5.3.2.3. Oxidatív stressz és/vagy C-N metabolizmus	87
5.3.2.4. Homeosztázis fenntartása	87
5.3.2.5. Jelátvivő molekulák	88
5.3.3. A toxinok szerepének megértése	89
5.4. Nitrogén, foszfor és kénéhezés hatása az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> cilindropermopszin termelésre	90
5.4.1. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetek növekedésének nyomon követése	91
5.4.1.1. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetek növekedése a kénéhezés körülményei között	91
5.4.1.2. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetek növekedése a foszforéhezés körülményei között	93
5.4.1.3. Az <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetek növekedése a nitrogénéhezés körülményei között	94
5.4.2. A toxintartalom vizsgálata	95
5.4.2.1. A toxintartalom változása a kénéheztetett <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetekben	95
5.4.2.2. A toxintartalom változása a foszforéheztetett <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetekben	96
5.4.2.3. A toxintartalom változása a nitrogénéheztetett <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> tenyészetekben	97
5.4.2.4. A toxintartalom változásának összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között	99
6. Mérgező cianobakteriális vízvirágzások – esettanulmányok	103
6.1. Mikrocisztinek, mikrocisztin-termelők előfordulása	103
6.2. Toxintermelő <i>Microcystis</i> kolóniák azonosítása jégből, egy alternatív áttelelési stratégia	105
6.3. <i>M. aeruginosa</i> tömeges megjelenése egy kerti tóban	109
6.4. <i>Planktothrix</i> fajok toxintermelése	118
7. A <i>Cylindropermopsis raciborskii</i> toxintermelésének sajátosságai	128
8. Cianobakteriális toxinok jelentősége a mikroalgák hasznosítása során	134
8.1. Táplálék kiegészítők	134
8.2. Metabolitok hasznosítása	137
8.3. Cianobakteriális alkaloidok	139

9. Összefoglalás	143
10. Anyag és Módszer	148
10.1. A cianobaktérium és alga törzsek	148
10.2. A vízvirágzást okozó planktonikus szervezetek azonosítása	148
10.3. A cianobaktériumok izolálása és tenyésztése	148
10.4. A heterociszták izolálása	149
10.5. A nitrogénáz enzimkomplex kimutatása a nitrogénéhezés körülményei között	149
10.6. A minták előkészítése a toxinteszthez	150
10.7. A toxintesztek	150
10.8. A kromatográfiás eszközök	151
10.9. Kapilláris elektroforézis (CE)	151
10.10. NMR analízis	151
10.11. MALDI-TOF analízisek	151
10.12. Toxin-gének detektálása - PCR analízisek	152
10.13. A proteáz és nukleáz enzimaktivitások kimutatása poliakrilamid aktivitásgégeken	153
10.14. A poliakrilamid gélek értékelése	153
11. Köszönetnyilvánítás	154
12. Irodalomjegyzék	155

1. Bevezetés és célkitűzések

Földünk vízkészlete felbecsülhetetlen értéket jelent a teljes bioszféra számára. Halmazállapotától függően többek között változatos élőhelyeket biztosít élőlények sokaságának, értékes reakcióközeg biokémiai és biogeokémiai folyamatokban, valamint pótolhatatlan szubsztrát az oxigéntermelő fotoszintézis számára.

A Föld felszíni és felszín alatti készleteinek szennyeződése és ennek következményei a tengeri és édesvízi élőhelyek drasztikus átalakulása, az élőlények pusztulása, fajok eltűnése és az élőlényközösségek átrendeződése gyakran hangoztatott probléma.

Az eutrofizációt, mint a környezetszennyezés egyik következményeként számon tartható jelenséget a 20. század közepén ismerték fel. Azóta a jelenség 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. A vízhasználatot érintő problémák része az eutrofizáció alkalmával megfigyelhető gyakran igen látványos, szembetűnő jelenség, a vízvirágzás, mely egyes planktonszervezetek (eukarióta algák és cianobaktériumok) tömeges elszaporodását jelenti. A felszíni vizekben megjelenő, változatos színanyagainak köszönhetően gyakran színpompás jelenség számos, mind a mai napig részben tisztázatlan folyamatot és következményt rejt magában. Egyes fajok tömeges elszaporodása éjjelente lumineszcens fénybe borítja környezetét, míg más fajok ilyen jellegű túlszorodása kiváló táplálékot jelent egyes fogyasztó szervezetek számára. Ugyanakkor a kialakult mikrobiális, gyakran gigantikus méretű biomassza jelentős terhelést is okozhat az adott élőhely számára, részben az igen változatos és gyakran szokatlan anyagcseretermékeivel is. Egyes metabolitok íz- és szagrontó hatásaikkal képesek komoly vízminőségi problémát előidézni, míg más metabolitok ígéretesek lehetnek a jósolt energiaválság megoldásában. Talán a legfeltűnőbb következményekkel mégis azok a plankton eredetű erős biológiai aktivitással bíró komponensek bírnak, melyek az élőlények széles spektruma számára megbetegedéseket, elhullást, elhalálozást néha szokatlan mértékű mérgezéseket idéznek elő.

Az elmúlt néhány évtizedben széles körben elterjedt az a felismerés, hogy az eutrofizáció következményeként megjelenő algatoxinok, humán-egészségügyi problémaként is jelentkezhetnek. A fotoszintetizáló planktonikus szervezetek 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.

Az evolúció kulcsfontosságú eseménye volt a cianobaktériumok megjelenése és elterjedése Földünkön. Már 3,4 milliárd évvel ezelőtt igen nagy mennyiségben voltak jelen

bolygónkon. Jelentőségüket az adja, hogy a mai cianobaktériumok ősei tették lehetővé az aerob élet magasabb szervezetségű formáinak a kialakulását azáltal, hogy oxigéntermelő fotoszintézisük révén nagy mennyiségű oxigént juttattak a légkörbe. A földtörténeti múltban és a bioszféra fejlődésében betöltött szerepükkel ellentétesen, napjainkban a cianobakteriális algavirágzások előretörése a toxinjaik révén számos, már említett problémát vetnek fel egyes élőlényközösségek kapcsán. Tömeges, egyre nagyobb mértékű megjelenésük miatt leggyakrabban mérgező metabolitjainak funkciója, szerepe és következményei kerülnek előtérbe a tudományos megközelítés és a hétköznapi ember számára egyaránt. A fotoszintetizáló makroszkópikus szervezetek, a virágos növények biológiailag aktív anyagcseretermékeinek kutatása, termelési körülményeik, analitikájuk, hatásmechanizmusuk részletes megismerése, alkalmazhatóságuk nagy hagyományokkal, több száz éves múlttal rendelkezik. Az általában mikroszkópikus méretű cianobaktérium- és algaszervezetek esetében elsősorban a tömeges megjelenés és azok következményei voltak azok, amelyek felhívták a figyelmet e szervezetek biológiailag aktív anyagcseretermékeire és a róluk szóló ismeretek hiányosságaira. Részben a tömeges megjelenés adott lehetőséget arra is, hogy a különböző biológiai és kémiai módszerekkel megkezdjék e különleges metabolitok azonosítását, funkciójának, mérgezőképességének megismerését. Egyes toxintermelő fajok elterjedésével, megjelenésével kapcsolatosan az utóbbi években egyre gyakrabban merültek fel problémák a toxinok kimutatása, detektálása kapcsán, ugyanakkor a környezet-egészségügyi problémák miatt egyre nagyobb az igény a biológiailag aktív komponensek, toxinok és azok következményeinek megismerésére a különböző régiók vizeitében.

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

Míg az édesvízi vízvirágzásokban főként a cianobaktériumok dominánsak, addig az eukarióta algák okozta mérgezések főként tengeri fajokhoz köthetőek, és elsősorban a dinoflagelláták közül kerülnek ki azok a szervezetek, amelyek tömeges elszaporodása közegészségügyi, gazdasági és természetvédelmi problémát okoz. Kontinentális vizekből 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 felszíkes 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. Az algatoxinok, mint ahogyan azt részletezni fogjuk, egyik igen jellemző sajátossága az a kémiai és egyben

hatástani sokszínűség, ami nagyban megnehezíti a toxinok analitikáját. Célunk olyan rutin analitikai módszer kidolgozása volt, aminek 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 sejtömegekből és a víztérből közvetlenül a toxinok jelenlétét igazolni tudjuk, rutin mérésük megoldható legyen. Célunk volt továbbá a mikrocisztinek, mint a leggyakoribb cianobakteriális toxinok esetében olyan módszer fejlesztése, amivel a környezetben előforduló mikrocisztin származékok nyomon követhetőek.

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 nitrogénéhezés körülményei között a nitrogénkötés során képződő heterociszták, illetve a vegetatív sejtek termelnek-e cilindrospermopsint?

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 tömegtermelésben 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 képességén 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 cinaobaktériumokon belül is unikálisnak tekinthető. Az ausztráliai, egyes ázsiai és egyes afrikai populációk esetében cilindrospermopszin termelést azonosítottak, míg a dél-amerikai populációk esetében szaxitoxint és annak analógjait detektálták egyes előfordulásai kapcsán. A hazai megjelenések miatt és egy általa okozott vízvirágzás következményei mentén, megvizsgáljuk a faj európai kemo típúsának 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. Irodalmi áttekintés

2.1. Vízvirágzás, algavirágzás

A vízvirágzás kifejezés alatt részben a planktonszervezetek tömeges elszaporodását értjük a felszíni vizekben, amely a víz intenzív elszíneződéséhez (zöld, kékeszöld, sárgászöld, sárga, vörös, barna) és zavarosodásához vezet. A nemzetközi irodalom jó néhány szinonim kifejezést használ a jelenség leírására pl. "Water-bloom, Flos-aquae, Wasserblüthe, Tsvetenie vody". Jellemző lehet a „virágzó” vizekre a felszínen felgyülemelő élő, vagy elhalt algatömeg, amely felszíni réteg, hab, hártya illetve darabos massa-formát ölthet (Reynolds és Walsby, 1975), de egyes leírásokban a vízvirágzás kifejezést használják a víz felszínén hirtelen felhalmozódó szokatlan (nem feltétlenül növényi) propagulumokra is. Látványos „virágzásokat” képesek okozni például egyes növényi pollenek, szaporító-képletek megjelenése a víz felszínén, de a vízvirágzás kifejezést használták már árvaszúnyogok lárvabőrének tömeges megjelenésekor, a kirajzás időszakában is (Entz és Sebestyén, 1942; Felföldy, 1981; Carmichael és Skulberg, 1993; Chorus és Bartram, 1999). Összességében a vízvirágzás (waterbloom) a tudományos irodalomban, napjainkban kevésbé használatos, sokkal inkább elterjedtebb az algavirágzás (algal bloom) megnevezés.

Maga az alga kifejezés nem tekinthető taxonómiai kategóriának, rendszertani szempontból, morfológiai és fiziológiai értelemben is különböző élőlénycsoportokat foglal magában, változatos anyagcsere-utakkal, különböző hatóanyag-mintázattal. Az egyes becslések szerint mintegy 40 000 (mások szerint ennél jóval több) fajt magába foglaló alga elnevezés éppúgy takar 1-2 μm -es egysejtű élőlényeket (*Ostreococcus tauri*), mint robusztus, 60 méter hosszúságot is elérő szervezeteket (*Macrocystis pyrifera*). Talán éppen a méretbeli változatosságnak köszönhetően is terjedt el a makroalga illetve a mikroalga kifejezés, amelyek ugyancsak nem tekinthetőek rendszertani egységeknek, tekintve hogy egyazon taxonhoz tartozó fajok (pl. *Chlorophyta*) esetében is fennállhat jelentős méretbeli különbség (Kiss, 1998; Whiton, 2012).

Az alga kifejezés alatt elsősorban eukarióta taxonok képviselőit (pl. *Chlorophyta*, *Phaeophyta*, *Bacillariophyta*, *Dynophyta*) értjük, de számos tanulmány kapcsán, nem csupán hagyományörzés céljából, hanem fiziológiai, morfológiai és ökológiai megközelítés alapján is a cianobaktériumok (régebben kéalgák) képviselőit az eukarióta taxonokkal együtt tüntetik fel (Hallmann, 2007; Courties et al., 1994). Ettől függetlenül a cianobaktériumok prokarióta szervezetek. Nevezzük őket akárhogyan is (*Cyanophyta*, *Cyanoprokariota*, *Blue-Green* elnevezés mind a mai napig feltűnik a szakirodalomban) és tárgyalhatjuk őket bármilyen élőlénycsoportokkal is, speciális szerveződésüket, evolúciós jelentőségüket nem lehet figyelmen kívül hagyni.

Az algavirágzások témakörbe a cianobaktériumok által okozott virágzásokat is beleérti a tudományos szakirodalom, a már említett indokon túl egyes toxinok termelésének (pl. szaxitoxin analógokat a páncélosalgák és cianobaktériumok fajai is termelnek) átfedése miatt is. További indok az algavirágzásokon belül az eukarióta algák és a cianobaktériumok által okozott tömeges megjelenések együtt-tárgyalására, hogy tengerekben néhány kivételtől eltekintve egyes eukarióta algataxonok, míg édesvizekben a cianobaktériumok idézik elő

ugyanazt a jelenséget, amely során fotoszintetizáló planktonikus sejttömeg halmozódik fel felszíni vizeinkben (Reynolds és Walsby, 1975; Skulberg et al., 1993; Chorus és Bartram, 1999; Reynolds, 1987; Anderson, 2000; Chorus, 2001; Peperzak, 2003; Heisler et al., 2008; Pearl és Huismann, 2008). Az ártalmas vagy mérgező algavirágzások (Harmful Algal Bloom, HAB) kifejezés alatt tehát a cianobakteriális virágzásokat is érti a szakirodalom, néhány esetben cianobakteriális mérgező algavirágzásként (Cyanobacterial Harmful Algal Bloom, CyanoHAB) különbözteti azt meg (Pearl és Ustach, 1982; Pearl, 1998; Pearl és Fulton, 2006). Dolgozatunkban mi is hasonlóképpen járunk el. Az algavirágzás kifejezés alatt értjük a cianobakteriális (alga)virágzásokat is, de ahol tehetjük, főként az édesvizekben előforduló jelenségek esetében, a jelenség előidézőjének tárgyalása során a cianobaktérium elnevezést használjuk, vagy a szóban forgó eukarióta algára hivatkozunk.

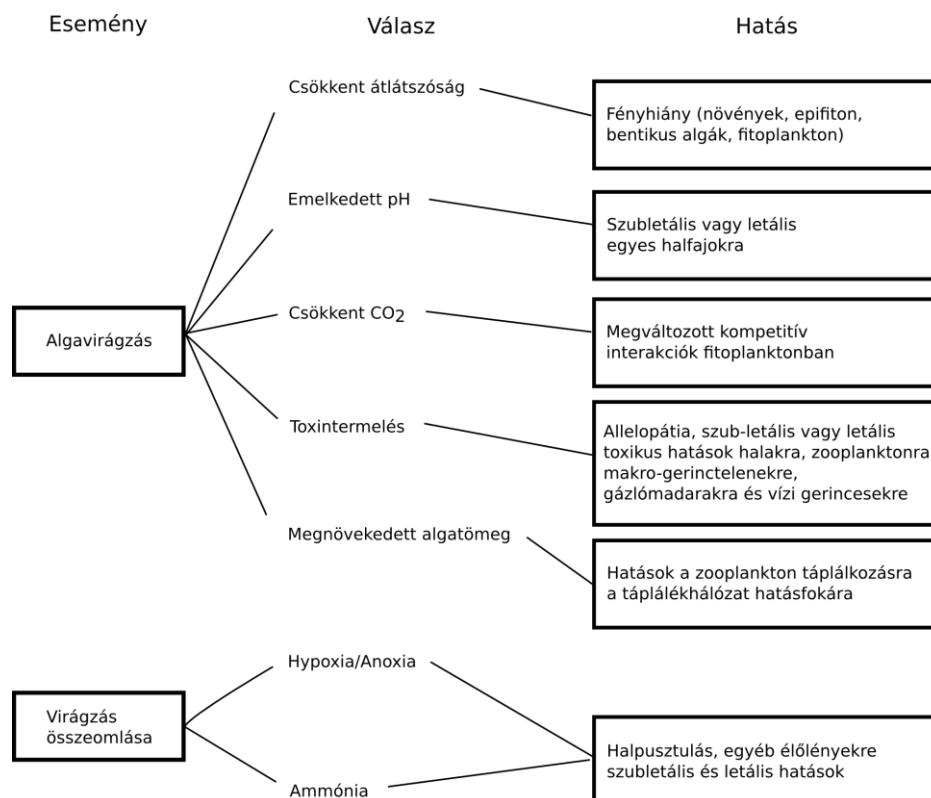
Az algavirágzás alatt egyes algaszervezet(ek) elszaporodását értjük, amikor adott területen makro-, illetve mikroszkópikus algák tömegesen, látható mennyiségben jelennek meg (Peeters et al., 2007). A makroszkópikus algák esetében ritkábban használatos a kifejezés, hiszen néhány esetben akár többszáz méteres egyedeik önmagukban is jelentős biomasszát képviselnek. A különböző algafajok méreteinek, és morfológiai sajátosságainak köszönhetően a jelenséget nehéz csupán egyedszámhoz kötni, ráadásul a különböző planktonikus alga-szervezetek esetében sajátos fotoszintetikus apparátussal, változatos színanyag-tartalommal számolhatunk. Így a különböző karotinoid és számos egyéb komponenseknek köszönhető változatos és látványos elszíneződéseket a különböző fajok eltérő egyedszámai képesek előidézni (Reynolds és Walsby, 1975; Skulberg et al., 1993; Chorus, 2001; Peperzak, 2003; Heisler et al., 2008; Pearl és Huismann, 2008).

Az algavirágzás jelenségének megértéséhez nem csupán az egyedszámot, hanem az időbeni lefutást is figyelembe szokás venni. Az algavirágzások adott területen néhány órán belül is kialakulhatnak és eliminálódhatnak, de akár több hónapon keresztül is fennmaradhatnak (Reynolds és Walsby, 1975).

Az algavirágzás jelenségét értelemszerűen az adott víztér fizikai, kémiai sajátosságai éppen úgy befolyásolják, mint ahogyan az időjárási valamint geológiai viszonyok is, de a legfontosabb, ami igazán unikálissá tesz egy ilyen látványos jelenséget (és egyben lehetetlenné teszi, hogy általánosságban definiáljuk azt) a virágzást előidéző faj maga. Az adott térben és időben elszaporodó faj morfológiai, fiziológiai, genetikai sajátosságai kellőképpen egyedivé teszik a jelenséget ahhoz, hogy a különböző taxonómiai csoportok (cianobaktériumok, kovaalgák, páncélos algák, barna- illetve vörösmoszatok) által előidézett algavirágzásokat, amennyiben tehetjük, egyedileg vizsgáljuk és értelmezzük (Pearl et al., 1985; Butterwick et al., 2005; 2008; Elliott, 2010; Esquenazi et al., 2011).

Az algavirágzások csoportosítását talán a legkézenfekvőbb, ha a jelenséget előidéző fajok alapján végezzük, de számos más megközelítés is létezik (Reynolds és Walsby, 1975). A látványos alga-tömegnek, mint ahogyan részleteiben is tárgyalni fogjuk, számos, kellemetlen velejárója lehet (Chorus, 2001). Munkánk kapcsán a legfontosabb kérdés, mikor beszélhetünk ártalmas, esetleg toxikus (mérgező) algavirágzásokról.

A gyakran gigantikus mértéket öltő, felszaporodó fotoszintetizáló sejttömeg önmagában véve is komoly problémákat okozhat több vízben található életközösség számára és számos anomáliát a víztér egészére nézve (1. ábra).



1. ábra. Algavirágzások ártalmas hatásai.

Az ártalmas algavirágzásokat okozó algafajokat Hallegraeff a következőképpen csoportosítja (Hallegraeff, 1993):

1. Alapvetően ártalmatlannak mondható kisebb mértékű algavirágzásokat okozó fajok, mérgező metabolitok termelése nem jellemző rájuk, azonban adott körülmények között olyan mértékű, sejtsűrűségű tömeget alkotnak, hogy az általuk okozott oxigénhiány halakat és más vízi gerincteleneket pusztít el. Például *Gonyaulax polygramma* Stein, *Noctiluca scintillans* (Macartney) Ehrenberg.

2. Erős toxinokat termelő fajok, amelyek közvetlenül, vagy a táplálkozási láncon közvetve hatnak az emberekre és különböző gyomor-bélrendszeri, idegrendszeri betegségeket okoznak. Néhány példa:

- Bénulósos kagylómérgezés (PSP). Például *Alexandrium acatenella* Whedon et Kofoid Balech.
- Hasmenéses kagylómérgezés (DSP). Például *Dinophysis acuta* Ehrenberg.
- Amnéziás kagylómérgezés (ASP). Például *Nitzschia pungens* f. *Multiseriis* Hasle.
- Ciguatera mérgezés. Például *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo.
- Neurotoxikus kagylómérgezés (NSP). Például *Gymnodinium breve* Davis.
- Cianobakteriális toxinmérgezés. Például *Microcystis aeruginosa* Klützing.

3. Emberre nem, de halakra és egyes vízi gerinctelenek csoportjaira mérgező fajok, melyekre specifikus metabolitok vagy károsító külső morfológiai képletek jellemzőek lehetnek. Például *Prymnesium parvum* Carter, *Chaetoceros convolutus* Castracane.

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 (Carmichael et al., 1990; Carmichael és Falconer, 1993; Hallegraeff, 1993; Carmichael, 1994).

Toxikus, mérgező algavirágzásokat édesvizekben elsősorban az egyes cianobaktérium fajok idéznek elő (Carmichael et al., 1990; Carmichael és Falconer, 1993). A mérsékelt éghajlati övben az alga- és cianobaktérium-közösségek összetétele jellegzetes mintázatot mutat az évszakok váltakozásával. A télen és kora tavasszal, elsősorban az iszapban nagy mennyiségben jelenlévő, gyors növekedésű, kisméretű ostorosokat a zöldalgák követik a tavasz második felében, és a nyár elején. Késő nyáron és ősszel olyan fajok jelennek meg, amelyek nehezen fogyaszthatók a zooplankton számára, mint a páncélos-ostorosok (*Dinoflagellata*) vagy a sárgászöld algák. Az eutróf és hipertróf vizekben a cianobaktériumok domináló előfordulása a nyári fitoplankton jellegzetessége. A trópusokon a szezonális változások nem elég nagyok ahhoz, hogy önmagukban indukálják a cianobaktériumok tömeges elszaporodását más fajok felett (Whitton, 1992; Chorus és Bartam, 1999; Kanoshina et al., 2003; Kardinaal et al., 2007).

A cianobakteriális vízvirágzások kialakulásában kitüntetett szerepet játszik a nitrogén és a foszfor. Az eukarióta algák számára optimális N:P arányt (16-23:1/N:P) összehasonlítva a vízvirágzást előidéző cianobaktériumok számára optimális aránnyal (10-16:1/N:P), látható, hogy ez az arány a cianobaktériumoknál alacsonyabb (Reynolds és Walsby, 1975; Pearl, 1988; Chorus és Bartam, 1999; Pearl, 2008).

A vízvirágzás nemcsak a modern civilizáció okozta foszfát és nitrát terhelt vizekre jellemző. Már 1188-ból származnak írásos emlékek arra vonatkozóan, hogy felfigyeltek a jelenségre (Reynolds és Walsby, 1975). Hangsúlyozandó azonban, hogy az 1950-es évek előtt meglehetősen ritka volt, a beszámolók különleges és nem szokványos eseményként tárgyalták azt. A vízvirágzások történetében fontos időszak a műtrágyák illetve a foszforalapú mosószeres használatának világméretű elterjedése. Általánosan elfogadott az a nézet, hogy az említett vegyületek bekerülése a felszíni vizekbe idézte elő korunk egyik aktuális problémáját, az egyre fokozottabb mértékű és gyakoriságú toxikus vízvirágzásokat. A vegyipar fellendülésével, az ezerkilencszázötvenes, de különösen a -hatvanas évektől kezdődően a világ minden tájáról egyre gyakoribbak a toxikus algavirágzásokról szóló jelentések (Pearl és Huismann, 2008, 2009).

A mérgező algavirágzásokról szóló jelentésekkel kapcsolatosan fontos megjegyezni, hogy napjainkra a Föld minden tájáról, beleértve az arktikus területeket is, számoltak be ilyen jellegű jelenségről (Landsberg, 2002).

Hazánkban az első vízvirágzással kapcsolatos közlés 1934-ben jelent meg. Sebestyén Olga a tihanyi Biológiai Kutatóintézet előtti Kis-öbölben augusztus 11-én zöldessárga *Microcystis aeruginosa* és *Microcystis flos-aquae* okozta vízvirágzást figyelt meg (Entz és Sebestyén, 1942). A második közlés 1960. július 30-áról való, világoszöld, sávós vízvirágzást észleltek Balatonbogláron a part közvetlen közelében egy védett beöblösödésben, melyet *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb. f. *jacutica* (Kissel.) Elenk. idézett elő. A következő vízvirágzást Hortobágyi közölte: 1960. augusztus 23-án a balatonboglári part menti részeken

kisebbs-nagyobb *Microcystis flos-aquae* csomók úsztak a vízben. A *Microcystis flos-aquae* további szórt megjelenésű virágzásairól tettek jelentést, 1960. augusztus 19-én és 1961. szeptember 17.-19. között (Hortobágyi, 1962). Az első fokozott mértékű és hosszan tartó balatoni vízvirágzásra 1966. szeptember 2-án figyeltek fel. A jelenség a Keszthelyi-öbölben mutatkozott, a Zala torkolatához közel. A vízvirágzás 6 km széles és 11 km hosszú területen alakult ki, melyet egyetlen cianobaktérium faj okozott: az *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs (Hortobágyi, 1967). A hetvenes évek balatoni vízvirágzásait szintén ez a faj idézte elő. Rendszeretelenül a nyári hónapokban vízvirágzást idézett elő 1982-ben, 1992-ben és 1994-ben a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Padisák, 1997). A Velencei-tavon elsősorban a *Microcystis aeruginosa* okozott jelentős virágzást (Kós et al., 1995). A hazai algavirágzások kutatása kapcsán feltétlenül említést kell tennünk Kiss István munkásságáról, aki többek között a Szeged környéki szikesek algáival foglalkozott (Kiss, 1985).

2.2. Mérgező tengeri algák: toxinok és mérgezések

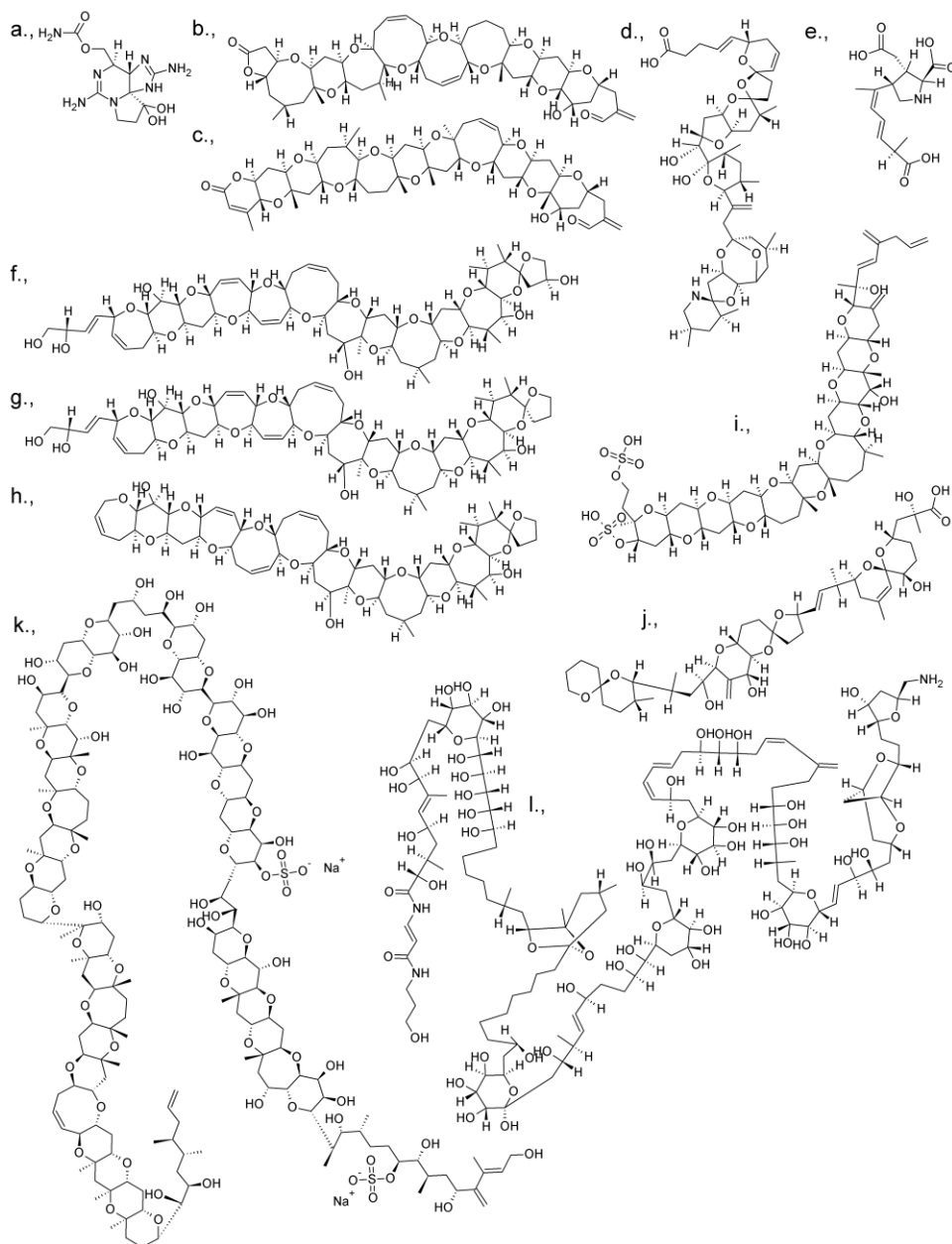
A tengeri és édesvízi algák mind morfológiailag mind fiziológiai szempontból változatos élőlények (Kiss, 1998). Az algák speciális anyagcseretermékeinek sokszínűsége, változatos hatása ismert tény, ugyanakkor toxinjainak szerkezetileg és funkcionálisan különböző jellege és gyakran egyedülálló biológiai aktivitása szintén hangsúlyozandó (Hallegraeff, 1993; Dolah, 2000, 2001, 2005; Hallegraeff, 2003; Sellner et al., 2003). Az elmúlt évtizedek tapasztalatai, tudományos ismeretanyagai kapcsán kijelenthetjük: a planktonikus tengeri algák esetében a páncélosalgák illetve a kovaalgák egyes képviselőit tekinthetjük leginkább mérgezőknek (Landsberg, 2002).

A leggyakrabban hivatkozott első algavirágzás a Bibliában fellelhető eset, ami arról számol be, hogy a Nílus vérré változott, benne a halak elpusztultak és a víz annyira szennyezetté vált, hogy az egyiptomiak nem tudtak inni belőle. Az Ószövetségben (Mózes 7:20-21) megtalálható feljegyzés kapcsán több teória is született valójában mi is okozhatta a jelenséget. Ezek közül az egyik feltételezés az, hogy az eset nem volt más, mint az *Alexandrium minimum* alga által, a torkolatvidéken okozott mérgező algavirágzás. A másik korai feljegyzés a Florida környéki szezonális vörös dagályokról *Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve* tömeges megjelenései) szólnak, miszerint a helyi őslakosok a Mexikói-öböl mentén pontosan regisztrálták a vörös elszíneződések során bekövetkező tömeges halpusztulásokat (Hallegraeff, 1993; Landsberg, 2002).

Észak-Amerikában, az amerikai őslakosok arról voltak híresek, hogy figyelték a tenger elszíneződését nappal és a lumineszcencia jelenségét éjjel, ha ezek a jelenségek előtűntek, a helyi közösségek vezetői megtiltották a kagylók betakarítását, fogyasztását, kereskedelmét. Mint látható, a helyi őslakos indiánok tisztában voltak az ilyen jellegű veszélyekkel, az első európai hódítók viszont nem. Az egyik első dokumentált eset a paralitikus mérgezést okozó kagylómérgezés tüneteit idézik, amikor is Vancouver kapitány legénysége 1793-ban (Brit Columbia, Kanada) kagylófogyasztás után súlyosan megbetegedett és néhányuk meghalt (Hallegraeff, 2003).

Az öt nagy tengeri algamérgezés okozta szindróma a bénulásos kagylómérgezés (PSP), a neurotoxikus kagylómérgezés (NSP), amnéziás kagylómérgezés (ASP), hasmenéses

kagylómérgezés (DSP) és ciguatera halmérgezés (CFP). Mindezek mellett számos új mérgezéses szindróma kerül leírásra az újonnan megjelenő, illetve azonosított algatoxinoknak köszönhetően. Például azaspirsavak, jesszotoxin, palytoxin okozta mérgezések az utóbbi időben növelték a tudományos csoportok és általában a fogyasztói társadalom érdeklődését, aggodalmát a téma iránt (Hallegraeff, 1993; Dolah 2000, 2001, 2005; Hallegraeff, 2003; Sellner et al., 2003). A tengeri algák toxinjai kapcsán jelentős számban találunk neurotoxikus, akut módon lezajló mérgezéses eseteket, amelyek változatos kémiai szerkezetű és többé-kevésbé ismert, többféle hatásmechanizmussal bíró molekuláknak köszönhetőek (Landsberg, 2002).



2. ábra. A leggyakoribb tengeri algatoxinok szerkezeti képlete (a: szaxitoxin; b: brévetoxin A; c: brévetoxin B; d: azaspirsav; e: domoénsav; f: ciguatoxin 1; g: ciguatoxin 2; h: ciguatoxin 3; i: jesszotoxin; j: okadainsav; k: maitotoxin; l: palytoxin).

2.2.1. Bénulósos kagylómérgezés (PSP)

A PSP egy világméretű toxinmérgezés neurológiai és gyomor-bélrendszeri tünetekkel, ami elsősorban páncélosalgával és/vagy annak toxinjával szennyezett kagylók elfogyasztása kapcsán alakul ki. Az első PSP eseményt 1927-ben jelentettek San Francisco környékéről, és egy páncélosalga, az *Alexandrium catenella* idézte elő. 102 ember megbetegedését és hat halálesetet jegyeztek fel az eset kapcsán. Azóta három páncélosalga genusz esetében számoltak be PSP toxinok termeléséről: *Alexandrium*, *Gymnodinium* és *Pyrodinium* (Hallegraeff, 1995). A bénulósos kagyló toxinok (PST) termelésére jellemző, hogy adott fajok különböző populációi más arányban és mennyiségben termelik azokat. A toxinok vízoldékony hőstabil triciklikus 3,4 - propionperhidropurin származékok (Wang, 2008). A PSP toxinokat három főbb csoportra lehet osztani: a karbamát vegyületek, amelyek magukban foglalják a szaxitoxint, neoszaxitoxint, gonyautoxint; az N-szulfokarbamoil vegyületek, amelyek magukban foglalják a C és B toxinokat; és végül a dekarbamoil vegyületek. Az elmúlt évtizedben számos PSP analógot azonosítottak (Wiesse, 2010). A szaxitoxin a leginkább mérgező és egyben a leginkább tanulmányozott PSP toxin (2. ábra). Egerekben az LD₅₀ értéke peritoneálisan 3-10 ng/kg testtömeg, orálisan 263 µg/kg testtömeg. A letális orális dózis emberben 1-4 mg nem és fiziológiai állapottól függően. A toxin gyorsan szívódik fel a gyomor-bél traktusban, vizelettel ürül. A PSP mérgezéses tünetei közé tartozik a csiklandós érzés az ajkakon, szájon és a nyelven, végtagok zsibbadása, gyomor-bélrendszeri problémák, nehézlégzés, majd a teljes bénulás. Súlyos mérgezéseknél légzésleállás, szív-érrendszeri sokk vagy halál is előfordul (Dolah, 2005). A szaxitoxin és analógjai hadászati potenciállal is rendelkeznek, mint minősített vegyifegyverek tartása, felhasználása szigorúan szabályozott. Nagy affinitással kötődnek a feszültségfüggő nátrium csatorna 1-es kötőhelyére ($K_d \sim 2$ nM), megakadályozva a nátrium ionok beáramlását a sejtekbe (Strichartz et al., 1986). A szaxitoxin befolyásolja a vázizmok működését, befolyásolja a perifériás idegek működését a neuromuszkuláris csomópontokon (Dolah, 2000).

2.2.2. Neurotoxikus kagylómérgezés (NSP)

Az NSP jelenséget a páncélosalga *Kerenia brevis* (korábban *Gymnodinium breve*) által termelt toxinok okozzák. Elsősorban egyes kagylófajokban akkumulálódnak, melyeket elfogyasztva alakulnak ki a súlyos mérgezések (Pierce et al., 2005). A faj kétféle lipofil karakterű toxint termel: egy hemolitikus és egy neurotoxikus hatásút, melyek hatalmas halpusztulást, madarak és tengeri emlősök mortalitását idézik elő (Flewelling et al., 2005). A neurotoxikus toxinok brévetoxinként ismertek, melyek policiklusos poliéterek. Brévetoxinoknak két fő típusa van: brévetoxin B (1-es típusú ; PbTx -2 , 3, 5 , 6, 8 , 9) és brévetoxin A (2-es típus ; PbTx -1 , 7,10) (2. ábra). Az utóbbi években a *Chatonella marina*, *C. antiqua*, *Fibrocapsa japonica* és *Heterosigma akashiwo* is brévetoxin-termelőnek bizonyult. A brévetoxinok íztelen, szagtalan, sav- és hőstabil (300 °C) molekulák. Az LD₅₀ 170 µg/kg testtömeg intraperitoneálisan, 94 ng/kg testtömeg intravénásan, és 520 µg/kg testtömeg orálisan egérben (Sellner et al., 2005). A tünetek az NSP esetében émelygés, bizsergés, zsibbadás, motoros funkciók elvesztése és súlyos izomfájdalmak.

Hatásmechanizmusa tárgyalásánál kiemelendő, hogy szintén a feszültségfüggő Na-csatornához kötődik szelektíven, azonban szemben a PSP toxinokkal, amelyek blokkolják a nátrium csatornát és megakadályozzák a nátrium ionok beáramlását, az NSP toxinok növelik a Na^+ befelé áramlást a sejtekbe, megváltoztatva azok ingerlékenységét (Wang, 2008).

2.2.3. Ciguatera halmérgezés (CFP)

A CFP a leggyakrabban előforduló tengeri mérgezés, amely elsősorban korallzátonyok élőlény-közösségeihez köthető. Amint azt neve is mutatja, egyes halfajok (leginkább sügérfélék) bioakkumulációs képességük miatt halmozzák fel az algák által termelt mérgező metabolitokat és képesek mérgezéseket okozni (Halstead et al., 2003). A becslések szerint évente körülbelül 25.000 embert érint ciguatoxinok okozta mérgezés. A CFP mérgezéseket világméretű egészségügyi problémának tekintik (Landsberg et al., 1998). A ciguatera toxinok egy páncélosalga fajhoz (*Gambierdiscus toxicus*) köthetők, amely termeli a maitotoxint (MTX), a ciguatoxinok lipofil prekursorait (Wang, 2008). Ezek a prekursorok a trofikus szintek fogyasztó, ragadozó, csúcsragadozó szintjein halmozódnak föl és biotranszformáció révén alakulnak át mérgező komponensekké. A ciguatoxinok hőstabil, lipidoldékony, a brévetoxinra emlékeztető ciklikus poliéter molekulák, melyeknek több mint 20 toxinvariánsa ismert (2. ábra). A ciguatoxinok biológiai aktivitását részletesen tanulmányozták, az egyik leghatásosabb aktivátorai a sejtek nátrium és/vagy kalcium csatornáinak. Az általuk előidézett több mint 175 ciguateriás tünet, négy kategóriába sorolható: gyomor-, neurológiai, szív-érrendszeri és általános tünetek (Yasumoto et al., 1985). Hangsúlyozni kell, hogy a ciguatera tünetek változatosak lehetnek a különböző óceánokban: a Csendes-óceánon neurológiai tünetek dominálnak, míg a Karib-tengerre a gyomor-bélrendszeri tünetek a jellemzőek a toxinvariánsok eltérő összetétele miatt. A ciguatoxin (CTX) és a maitotoxin a két leggyakoribb toxin, amely a CFP mérgezésekhez köthető. Farmakológiai tanulmányok kimutatták, hogy a CTX aktiválja a feszültségfüggő nátrium csatornákat nM és pM koncentrációban. Egerekben ip., a ciguatoxin 0,45 $\mu\text{g/kg}$ dózisban letális, a maitotoxin esetében ez 0,15 $\mu\text{g/kg}$. Orális bevitel esetén mindössze 0,1 μg ciguatoxin felnőtt ember esetében betegséget okoz. A ciguatoxin hatásmechanizmusa hasonló a brévetoxinéhoz, a neuronális nátrium-csatornák 5. kötőhelyének α -alegységéhez kötődnek szelektíven, ugyanakkor az affinitásuk 30-szor nagyobb a brévetoxinokénál (Hallegraeff 1993, 2005). A maitotoxin egy másik fontos neurotoxin, amely a CFP mérgezésekhez köthető. A toxin egy vízben oldódó, policiklikus molekula számos hidroxil- és szulfát-csoportokkal (2. ábra), melyet a *G. toxicus* termel. Három formája, az MTX-1, MTX -2 és MTX -3 ismert. Az MTX esetében bebizonyosodott, hogy az egyik leghatásosabb azonosított toxin. Az LD₅₀ egerekben kisebb, mint 0,2 $\mu\text{g/kg}$ (intraperitoneálisan), és ez a legalább 5-ször nagyobb érték, mint a tetrodotoxin esetében. Farmakológiai tanulmányok azt mutatják, hogy az MTX erős aktivátora a feszültségfüggő kalcium csatornáknak. A Ca^{2+} beáramlás a sejtekben befolyásolja egyes hormonok és neurotranszmitterek szekrécióját, foszfoinozitidek bontását, és a depolarizációt (Landsberg, 2002).

2.2.4. Azaspirsavakhoz köthető mérgezés (AZP)

Az azaspirsavakhoz köthető mérgezést (AZP), elsőként Hollandiában regisztráltak, de később egyre inkább probléma lett szerte Európában. Ez egy viszonylag újonnan azonosított tengeri toxin betegség, melyet a *Protoperdinium crassipes* okoz. A pánccélosalgafaj magas koncentrációban termel intracelluláris azaspirsavakat (AZA1), melyek lipofil, poliéter karakterű toxinok és elsősorban kagylófajokban halmozódnak fel kritikus mennyiségben. Ma körülbelül 12 származéka ismert a toxinnak (Hallegraeff, 1993, 2005). Szerkezetük jelentősen eltér a pánccélosalgák egyéb toxinjaitól, terminális karboxil csoportjaiknak köszönhetik savas karakterű (2. ábra). A mérgezésre a hányinger, hányás, súlyos hasmenés és hasi görcsök valamint neurotoxikus hatások, mint tünetek jellemzőek (Sellner, 2003). Részletes hatásmechanizmusa nem ismert, az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a toxin a sejtek Ca^{2+} homeosztázisára hatnak. Egyes variánsai a Ca^{2+} beáramlását serkentik, míg mások éppen azt gátolják (Dolah, 2000).

2.2.5. Jesszotoxin mérgezések (YTX)

A YTX és analógjai diszulfatált poliéter vegyületek, melyet legelőször Japánban a Mutsu öbölben talált fésű-kagylófajból (*Patinopekten yessoensis*) izoláltak (Aasen et al., 2005). Azóta számos helyen írtak le Európában, Dél-Amerikában és Új-Zélandon YTX-t és az ahhoz köthető mérgezéseket (Ogino et al., 1997). Három pánccélosalgafajhoz (*Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* és a *Gonyaulax spinifera*) köthető termelésük, (Tubaro et al., 2003). Az utóbbi időben számos új YTX analógot azonosítottak különböző alga és kagylófajokban (karboxijesszotoxin, karboxihomojesszotoxin) (Murata et al., 1987). Eredetileg a YTX-t kifejezetten a hasmenést okozó algatoxinok közé sorolták, de vizsgálatok kimutatták, hogy fő támadáspontja nem az emésztőtraktus, hanem kifejezetten a szív (Draisci et al., 1999). Sejtbiológiai szinten a pontos támadáspont nem ismert, de jelen ismereteink szerint a Ca^{2+} csatornák működését befolyásolja a toxin kötődése (Amzil et al., 2008).

2.2.6. Palytoxin mérgezések (PTX)

A PTX polihidroxilezett policiklikus vegyület igen erős biológiai aktivitással. A toxint először egy lágykorall fajból izolálták (*Palythoa toxica*), majd ezt követően számos más szervezetből, mint például tengeri algákból és kagylókból is azonosították (Moore és Scheuer, 1971). Nemrégiben palytoxint találtak egy tengerfenéken élő pánccélosalgában is, az *Ostreopsis siamensis*-ben, ami tömegesen képes elszaporodni számos Európában található tengeri élőhelyen. Virágzásuk puhatestűek és tüskésbőrűek tömeges pusztulásához vezethet, és gyakran okoz emberi megbetegedéseket (Franchini et al., 2008). Halálos kimenetelű PTX mérgezésekről számoltak be toxinnal szennyezett rákok (Fülöp-szigeteken), tengeri sünök (Brazíliában) és hal (Japán) fogyasztása során, de a PTX világszerte aggodalomra adhat okot elterjedése és hatásmechanizmusa miatt (Wattenberg, 2007). A PTX egy nagy, komplex molekula, ami lipofil és hidrofil régióval egyaránt rendelkezik (2. ábra). A természetes

hatóanyagok közül a mai napig ismert legnagyobb monomer szerves molekula (Sosa et al., 2009). A közelmúltban több analógot azonosítottak *O. siamensis*-ből, az osztreocin-D-t és a maskarenotoxint. Jelenleg a PTX-t tekintik, az egyik leghatásosabb ismert toxinnak. A 24 órás LD₅₀ értékek intravénás injekció során 0,025 µg/kg és 0,45 µg/kg-nak adódtak különböző állatkísérletes rendszerekben. A mérgezés tünetei közé tartozik a láz, tétlenség, álmoság és gyengeség a végtagokban majd halál (Malagoli et al., 2008). Farmakológiai és elektrofiziológiai tanulmányok azt mutatják, hogy a PTX egyfajta hemolizin és megváltoztathatja a sejtek működését, ingerlékenységét, a molekula szelektíven kötődik a sejtek Na⁺, K⁺-ATP-áz pumpájához (Taniyama et al., 2002; Louzao et al., 2008).

2.2.7. Domoénsav (DOM) és az amnéziás kagylómérgezések (ASP)

A domoénsavat egy 1987-es mérgezéses esetről azonosították Kanada partjainál, amikor kékkagyló fogyasztása után többen meghaltak vagy rosszul lettek. Kifejezetten jellemző volt, hogy több szervrendszerre hatott a mérgezés. A gyomor-bél traktust, a központi idegrendszert (CNS) és a szív-és érrendszert is érintették az elváltozások. A legjellemzőbb és talán legfeltűnőbb tünet a memóriazavar volt, amiről a mérgezés a nevét is kapta: amnéziás kagylómérgezés - ASP (Scholin et al. 2000). A DOM legfőbb és legjellemzőbb termelői a kovaalgák közül kerülnek ki. A *Pseudonitzschia* genusz képviselői és egyes vörösalga fajok, mint a *Chondria armata* nevezhetők a legfőbb toxinforrásnak. A DOM tapasztalatok szerint könnyen bekerül a táplálékláncba egyes kagylókon és egyéb tengeri állatokon (rákfélék) keresztül, de a legjellemzőbb közös vektor a kék kagyló (*Mytilus edulis*; Dolah, 2000). Gyakori jelenség, hogy az algák tömeges elszaporodása már lecsengett, de a betakarított tengeri kagylók és rákok súlyos állati és emberi mérgezésekhez vezetnek az akkumulálódott toxinnak köszönhetően. Ezért számos országban szigorú intézkedéseket vezettek be az akkumulált toxinok mérésére. Bár ezen intézkedések sikeresek voltak és visszaszorultak az emberi megbetegedések, számos beszámoló szerint a DOM mérgezések a vadon élő állatok esetében komoly problémákat jelentenek, ideértve a tengeri oroszlánokat, bálnákat, tengeri vidrákat és a tengeri madarakat (Hallegraeff, 1993, 2005). Mivel egyre több helyről jelentenek ilyen típusú mérgezéseket, a DOM kiemelkedő környezeti kockázatnak tekinthető. E neurotoxin jelentős, globális problémát jelent az emberek egészségére, biztonságára és az élővilágra egyaránt. A DOM egy vízben oldható trikarbonsav (2. ábra), ami viszonylag rosszul szívódik fel a bélben, és megy át a vér-agy gáton, a felezési ideje rövid. A DOM szerkezetileg a kainsavhoz hasonló kémiai struktúrával és hatással rendelkezik. Mindkét excitatórikus aminosav a glutamát analógja, ami az agyban jól ismert neurotransmitter és aktiválja a glutamát receptorokat [GluRs]. A mérgezés után a gasztrointesztinális tünetek 24 órán belül, a neurológiai tünetek 48 órán belül jelentkeznek. A jellemző tünetek a hányinger, hányás, hasi görcsök, hasmenés, fejfájás, instabil vérnyomás, szívritmuszavarok és neurológiai zavar, beleértve a kómát, görcsöket, különböző rohamokat és a memória elvesztését is. Az elhalálozások a mérgezéseket követően a 12-90. nap után következtek be (Landsberg, 2002).

2.2.8. Okadainsav (OA)

Az okadainsav egy lipofil vegyület, melyet számos tengeri páncélosalga nemzetséghez (*Dinophysis* és *Prorocentrum*) tartozó faj termel (Kumagai et al., 1986). Az úgynevezett DSP jellemzően súlyos gyomor-bélrendszeri tüneteket okozó toxin, szinte mindig kagylókban felhalmozott formában fejt ki hatását (Dounay et al., 2002). Az OA gátolja a szerin/treonin protein-foszfatazokat (PP1 és PP2A), mely hiperfoszforilezett fehérjék megjelenéséhez vezet. Figyelembe véve az intracelluláris kináz-foszfataz rendszer szerepét a sejtciklusban, a szignáltranszdukciós folyamatokban, a toxin hatásaként számos sejt- és szövet-szintű elváltozással számolhatunk (Edebo et al., 1988). Az erős hasmenéssel és hányással járó problémákkal járó tünet mellett a toxin tumorindukáló hatását is bizonyították (Bialojan et al., 1998).

2.3. A tengeri toxikus algavirágzások sajátosságai

Az elmúlt évtizedek általános jellemzője, hogy az Északi- és a Déli- Féltekén egyaránt újabb és újabb területen jelennek meg addig még nem ismert mérgező algavirágzások és velejáró mérgezéses esetek (Hallegraeff, 1993, 2005). A 70-es évekhez képest az ezredfordulóra, számos ez idáig nem ismert algamérgezés megjelenése volt jellemző újabb területeken. Az újabban dokumentált mérgezések mögött értelemszerűen számos esetben az adott méreg-termeléssel rendelkező alga-fajok terjedéséről (és tömeges megjelenéséről) beszélhetünk, ugyanakkor több esetben az ellenőrzések, célzott kutatások, felmérések vezettek oda, hogy egyes algatoxinok leírásra kerültek (Dolah et al., 2001). Jellemző példa Új-Zéland, ahonnan az 1970-es években még nem volt ilyen jellegű eseményre példa, de az 1992-ben bekövetkező algatoxin-mérgezéseknek köszönhetően létrehozott átfogó monitorozó program újabb négy-öt mérgezés-típus és toxincsalád előfordulását regisztrálta. Másik nagyon jellemző példa az 1987-es Kanadában kitört ASP mérgezés, amely típus előtte ismeretlen volt, pedig a leírt szimptómák alapján számos tengeri emlős állománycsoport elhalálását okozta az azt megelőző években, évtizedekben az Észak-Amerikai kontinens nyugati partvidékén, ahol a toxin termeléséért felelős *Pseudonitzschia* fajok elterjedése ismert volt. Az ASP mérgezések és azok hátterének világos felderítése után, mint új típusú és megjelenésű esetekként regisztráltak algavirágzásokat, holott az azelőtti időszakban is utólagos elemzések feltártak ASP típusú mérgezéseket tengeri emlősök körében a nyugati partvidéken (Hallegraeff, 1993; 2005).

A nagyobb időintervallumot átfogó fitoplankton adatok és elemzések hiánya több helyen hátráltatják, nehezítik annak feltárását, hogy valóban újabb megjelenésekről beszélhetünk-e. Emberi megbetegedések miatt ugyanakkor nyomkövethető és kijelenthető, hogy egyes algatoxin mérgezések és mérgező algavirágzások újabb és újabb területeket hódítanak meg. Jellemző példa a PSP Délkelet-Ázsiában és Dél-Amerikában történő terjedése. Kulcskérdés az, hogy milyen mértékben felelősek ezért egyes emberi tevékenységek.

A legfontosabb emberi tevékenységektől sem mentes behatások, amelyeken keresztül a tengeri mérgező algavirágzások mértéke és elterjedésének határai kiterjedhetnek a következők: algafajok terjesztése állatok és emberi transzport tevékenységek révén, part menti vizek tápanyagterhelése, szokatlan időjárási események és a globális éghajlatváltozás (Landsberg, 2002).

A teherhajók stabilizálására használt ballasztvíz, az egyik legkritikusabb közeg az adott kemotípusos algafajok elterjesztésében. A szállítmánnyal éppen nem rendelkező teherhajók stabilizálására a partmenti vizekből töltik fel tartályaikat és tesznek meg több ezer kilométert az adott víztömeggel és az abban található élőlényközösséggel együtt. Úgy becsülik, évente mintegy 10 milliárd tonna ballasztvizet szállítanak ezek a hajók a Föld különböző területeiről, és engednek ki az érkezési területeken szinte minden kontroll nélkül (Hallegraeff, 1993). Több vizsgálat egyértelműen kimutatta, hogy a ballasztvíz mikroszkópikus szervezetei számára, beleértve eukarióta és prokarióta élőlénycsoportokat, tökéletes lehetőséget nyújt a terjedésre, mely során újabb élőhelyeket fertőzhetnek meg és idézhetnek elő tömeges megjelenést. A PSP megjelenésére és elterjedésére az ausztrál partok mentén leginkább ezt a magyarázatot szokták előhozni. További ilyen jellegű terjedés megakadályozására már számos irányelv létezik, amiben előírják a ballasztvizek nyílt óceánon történő cseréjét (Hallegraeff, 1993; 2005).

A zoochoria jelenség kapcsán az állatok, mint vektorok közül egyértelműen a puhatestűek, azokon belül is néhány kagylófaj emelendő ki. Nem csupán az algatoxinok képesek felhalmozódni a puhatestűek szervezetében, hanem egyes algafajok motilis és nem motilis (ciszták) formái is jelentős egyedszámban találnak menedéket e fajok képleteiben. A humán fogyasztásra szánt kagylók emberek által történő szállítása ilyen vonatkozásban is káros lehet, hiszen a kiszabaduló algaegyedek fontos inokulumai lehetnek újabb meghódított területeken bekövetkező algavirágzásoknak (Landsberg, 2002; Sellner, 2003).

Az eutrofizáció jelensége a tengerekben, óceánokban legerőteljesebben a partmenti víztömegeket érinti, azon belül is kifejezetten fokozott az édesvizek, brakkvizek torkolatvidékein. A különböző folyóvizek által szállított és közvetlenül a partmenti területekről származó tápanyagtartalom elősegítik az obligát és fakultatív fotoautotróf szervezetek szaporodását. Ahogyan azt az édesvizek esetében is tárgyaljuk, elsősorban a különböző nitrogén és foszforformák azok a tápanyagok, amelyek terhelése leginkább kritikus az algavirágzások kialakulásában, de néhány más tápelem, mint például a vas szerepe is számos esetben meghatározó lehet. Erősen vizsgált problémakör a különböző műtrágyák használatából fakadó következmények, hiszen a szárazföldi növényi kultúrák kapcsán elvárt fokozott produktivitás miatt a felszíni illetve felszín alatti vizekbe került tápanyagtartalom, egyre fokozottabban generálja egyes területeken az algák elszaporodását (Hallegraeff, 1993). Egy gyakran idézett példa, hogy Hong Kong partjainál az algavirágzások száma 8-szorosára emelkedett, miközben az 1976 és 1986 közötti időszakban 2,5-szörösére nőtt a tápanyagterhelése a tengernek. Bár a fitoplankton hosszútávú adatsorainak hiánya ebben az esetben is megemlíthető, számos tengerparti nagyváros esetében a vizek tápanyagterhelésének növekedése együtt járt az algavirágzások számának drasztikus növekedésével. Ugyanakkor néhány faj esetében ez nem tűnik releváns magyarázatnak, hiszen néhány PSP (*Alexandrium tamarense*) vagy NSP (*Gymnodinium breve*) okozó

kifejezetten oligotróf vizekben él és szaporodik. A Florida partjainál jellemző algavirágzások frekvenciájáról elmondható, hogy az elmúlt 120 évben különösebb változás nem következett be. A toxintermelő algavirágzások ugyanolyan gyakorisággal és mennyiségi viszonyokkal jelentkeznek, annak ellenére, hogy a tápanyagterhelés jelentősen nőtt. Ilyen esetekben és a Föld más területein is a szokatlan, hirtelen bekövetkező időjárási jelenségekkel találtak összefüggést (Hallegraeff, 2005). Ilyen anomáliákat okoz az El Niño, ami egy természetes éghajlati jelenség, a tengervíz áramlásával van összefüggésben és ciklikusan jelentkezik. A Csendes-óceán vidékén 2-7 évente előforduló anomália, amely egyaránt érinti a tengeráramlásokat, az óceán fölötti légkörzést és az óriási térségen belüli légnyomáseloszlást. Karácsony tájékán kulminál és 9-12 hónapig tart. Az El Niño beköszöntét az uralkodó légnyomásviszonyok radikális megváltozása jelzi. Ekkor Indonézia, Ausztrália és általában az Indiai-óceán felett megnő a légnyomás, míg a Csendes-óceán keleti medencéjében lecsökken. Az uralkodó szélirány is megváltozik: a keletről nyugatra fújó passzátszelek gyengülnek, esetleg meg is fordul az irányuk. Ezzel egy időben az Indiai-óceán és a Csendes-óceán nyugati része felől erős meleg áramlatok indulnak Dél-Amerika partjai felé. A Csendes-óceáni térség Egyenlítő közeli területe karácsony táján erősen felmelegszik. Hatására aszályos, száraz időszak lép fel Afrikában, míg a Karib-tengeren óriási esőzéseket okoz. Ellentéte a normálisnál hidegebb tengerfelszint jelentő La Niña, mely a Csendes-óceán trópusi területeinek középső és keleti részén fordul elő. Az El Niño jelenség a 70-es, de leginkább a 80-as 90-es években megfigyelhető gyakorisága volt az, ami felhívta a figyelmet a jelenséggel együttjáró gazdaságot is érintő problémákra (halászat, viharok) is (IPCC, 2007). Egyes területeken a mérgező algavirágzások megjelenése éppen az említett jelenségekkel mutatott összefüggést. Az El Niño jelenségtől sem lehet függetlenül tárgyalni a globális felmelegedésről szóló teóriákat, amelyekkel szintén összefüggésbe hozzák a mérgező algavirágzások előfordulását. Globális felmelegedésnek a Föld átlaghőmérsékletének emelkedését nevezzük, amelynek során emelkedik az óceánok és a felszín közeli levegő hőmérséklete (Hallegraeff, 1993; 2005).

Az éghajlatváltozási keretegyezmény a globális éghajlatváltozás kifejezést az ember által okozott klímaváltozásra használja. A hőmérséklet növekedésére számos közvetlen és közvetett bizonyíték létezik a levegő és az óceánok hőmérsékletének melegedésétől a gleccserek olvadásán át a tengerszint emelkedéséig. A Föld átlagos felszíni hőmérsékletére illesztett lineáris trend szerint 1906 és 2005 között $0,74 \pm 0,18$ °C-kal emelkedett (Houghton et al., 2001; IPCC, 2007). A vizsgált időszak második felében a melegedés üteme kétszeresére gyorsult a kezdetben megfigyelthez képest ($0,13 \pm 0,03$ °C a $0,07 \pm 0,02$ °C évtizedenkéntivel szemben). A városok magasabb hőmérséklete csupán elenyésző, mintegy $0,002$ °C-kal járult hozzá évtizedenként ehhez a változáshoz (Heisler et al., 2008). A troposzféra alsó részének hőmérséklete műholdas mérések szerint $0,13$ és $0,22$ °C közötti mértékben emelkedett évtizedenként 1979 óta (Houghton et al., 2001; PCC, 2007). A globális hőmérséklet rövidtávú fluktuációi könnyen felülírhatják és elfedhetik a hosszabb trendeket, ez azonban konzisztens a 2002 és 2009 között megfigyelt relatíve stabil hőmérséklettel. 1880 óta a 13 legmelegebb év közül 11 2001 és 2011 között volt. A 20. században és különösen az utóbbi évtizedekben a klímaváltozás gyorsabb volt, mint a megelőző néhány évszázadban. A folyamat várhatólag folytatódik. A kérdés, hogy a

hőmérséklet változása milyen mértékben az emberi tevékenység következménye. A megelőző öt interglaciális szakasz 50–400 ezer évig tartott, ami arra utal, hogy még melegebb időszakban vagyunk természetes módon is. Kérdés azonban, hogy az emberi tevékenység ezt mennyivel gyorsítja és így mennyivel nehezíti a felmelegedéshez való alkalmazkodást. A témával foglalkozó tudósok több mint 90%-a szerint a legutóbbi évtizedekben zajló felmelegedés mértéke, leginkább emberi tevékenység eredménye (IPCC, 2007).

A fent említett okok közül nehezen lehetne kiválasztani azt az egyetlen okot, ami az algavirágzások gyakoriságának a növekedését idézi elő. Minden esetet érdemes egyedileg megvizsgálni, a kiváltó okokat feltárni. De az világosan látszik, hogy a tömeges megjelenést elősegítő faktorok, a vizek tápanyagterhelése, toxintermelő fajok terjedése-terjesztése, a globális felmelegedéssel járó szélsőséges időjárási események kedveznek a mérgező algavirágzások kialakulásának nemcsak az édesvizekben, hanem a tengeri élőhelyeken is (Dolah, 2005).

2.4. A cianobakteriális vízvirágzások előretörése

Az algavirágzások, azon belül is a cianobakteriális virágzások egyre nagyobb mértékű elterjedését egyértelmű adatok támasztják alá. Fontos hangsúlyozni, hogy számos algavirágzásnak egyedi okai lehetnek, de általánosságban néhány faktor kitüntetett szerepet játszik a jelenség kialakulásában (Pearl és Huisman, 2009; Wagner és Adrian, 2009), amelyeket a továbbiakban röviden áttekintünk.

2.4.1. A hőmérséklet és a vízoszlop stabilitása

A 20. században a fosszilis tüzelőanyagok elégetése és a légköri széndioxid mennyiségének növekedése a föld felszínének a hőmérsékletét megközelítőleg 1°C-kal növelte. A 21. században a globális hőmérséklet valószínűleg 1,5-5°C-al fog növekedni (Houghton et al., 2001; IPCC, 2007). Míg az eukarióta fitoplankton növekedési sebességének optimuma 20 °C körül vagy azon túl már stabilizálódik vagy csökken, addig a cianobaktériumok növekedése fokozódik, így biztosítva számukra kompetitív előnyt (Paerl and Huisman, 2009). A közvetlen hatásokon túl a növekvő hőmérséklet megváltoztatja a vízi környezet fizikai karakterisztikáját, ami kedvez a cianobaktériumoknak. Például a növekvő hőmérséklet lecsökkenti a felszíni víz viszkozitását és növeli a tápanyag eloszlását. Ez fontos folyamat, amikor versengés folyik a tápanyagért az előforduló fajok között (Peperzak, 2003). Másodszor, néhány cianobaktérium tudja szabályozni a felhajtóerő nagyságát gáz vezikulumok kialakításával, így ellensúlyozzák a süllyedésüket a csökkenő viszkozitás mellett, ami számukra további előnyt jelent más, nem mozgékony fitoplanktonnal szemben (Paerl and Huisman, 2009). Harmadszor, a felmelegedés a vizek rétegződésének a gyakoriságát, erősségét és időtartalmát megnöveli. Ez a folyamat általánosan lecsökkenti a felszíni vizekben fellelhető tápanyagok elérhetőségét a nem mozgékony fajok esetében. A mélyebb vizekből felúszó cianobaktériumok képesek hozzájutni a tápanyagokhoz azáltal,

hogy tudják változtatni a felhajtóerőt vagy nitrogén megkötésére képesek (Wagner és Adrian, 2009). Összegezve a megfigyeléseket, a cianobaktériumok hajlamosak a dominanciára a fitoplankton egyéb alkotóival szemben az év legmelegebb periódusaiban, a mérsékelt ökoszisztémákban. A globális fölmelegedés nagy hatással lehet a cianobakteriális vízvirágzások elterjedésére (Peeters et al., 2007).

2.4.2. A tápanyagok

A vízvirágzások expanziójáért felelős potenciális környezeti tényezők közül kiemelten kell foglalkozni az emberi tevékenységek által előidézett tápanyagterheléssel. A kutatási eredmények rámutatnak az eutrofizációs folyamatok és a megnövekedett népesség szoros kapcsolatára, amelyek serkentően hatnak a káros algavirágzások előfordulására. (Heisler et al., 2008). Az édesvizek megnövekedett tápanyag tartalma közül a foszfor az egyik, amely változást eredményez a fitoplankton közösségben, mégpedig a cianobaktériumok dominanciájához vezet. A nitrogén-fixáló cianobaktériumoknak a meleg édesvizekben történő szaporodását gyakran a foszfor szabályozza, míg a nem nitrogén-fixáló cianobaktériumok elterjedését a foszforon kívül még a nitrogén is limitálja. A vízvirágzások számára a szerves N és P készletek mellett fontos tápanyagforrásnak számítanak az oldott vagy részecske formában hasznosítható szerves N és P vegyületek is (Davis et al., 2010). A mikrotápelemek közül a vasnak van meghatározó szerepe, különösen a nitrogén-fixáló fajoknál, mivel a nitrogenáz enzim aktív centrumának kialakításához vasra van szükség (Kustka et al., 2003).

Mivel a cianobakteriális vízvirágzások gyakran eutróf tavakban alakulnak ki, eredetileg azt feltételezték, hogy ezeknek az élőlényeknek nagy mennyiségű foszforra és a nitrogénre van szükségük (Reynolds, 1987). Ezt a hipotézist még akkor is fenntartották, amikor a legalacsonyabb oldott foszfátkoncentrációnál is gyakran bekövetkeztek a cianobakteriális vízvirágzások. A kísérleti adatok azt mutatták, hogy sok cianobaktériumnak nagyobb az affinitása a nitrogénhez és a foszforhoz, mint más fotoszintetikus élőlénynek. Ez azt jelenti, hogy előnyhöz juthatnak más fitoplankton fajokkal szemben akkor, amikor a foszfor és a nitrogén mennyisége limitált (Stanier, 1977; Rai, 1990; Whitton, 1992; Skulberg, 1996; Weber et al., 1996).

A tápanyagokhoz való erős affinitásukon kívül a cianobaktériumok jelentős mértékben képesek tárolni a foszfort (Bryant, 1994). Elegendő foszfort tudnak felhalmozni ahhoz, hogy 2-4 sejtosztódás lejártszódjon, ami megfelel a biomasszában bekövetkező 4-32-szeres növekedésnek. A nitrogén és a foszfor koncentrációk kis hányadosa elősegítheti a cianobakteriális vízvirágzások kialakulását (Reynolds és Walsby, 1975). Ha az eukarióták számára optimális N:P arányt (16-23N:1P) összehasonlítjuk a vízvirágzást képző cianobaktériumok számára optimális hányadossal (10-16N : 1 P), azt kapjuk, hogy ez az arány a cianobaktériumoknál alacsonyabb (Carmichael és Falconer, 1993).

2.4.3. A széndioxid, pH és a vizek sótartalma

Az elmúlt két évszázadban a fosszilis tüzelőanyagok égése során jelentősen megnőtt a légkör széndioxid (CO_2) koncentrációja, ez a trend a következő évtizedekben is folytatódni fog (IPCC, 2007). A vizek kémiai jellemzőiben erőteljes változást eredményezhet a növekvő CO_2 tartalom, ennek hatásra a pH csökkenhet (Cao és Caldeira, 2008). A vizek pH-ja közvetlenül befolyásolt a különböző oldott szervesetlen szénvegyületek által. A legtöbb vízi rendszer pH-ja 7,5-8,1 között van, amit elsődlegesen a hidrogénkarbonát ion tart fenn. A pH és a szervesetlen szénvegyületek mértéke a tavakban széles skálán képes mozogni napi és szezonális szinten. Az eutróf tavakban a nagymértékű oldott szervesetlen szénvegyületek napi szintű csökkenése a vízvirágzásokkal hozható összefüggésbe, amely a fitoplankton rövid idejű szén limitációját válthatja ki. A vízfelszín közelében élő cianobaktériumoknak előnyük van más fitoplanktonnal szemben, mivel a légköri CO_2 gyors diffúzióval bekerül a felszíni vízrétegbe, így ez elősegíti a növekedésüket, amikor a vízoszlop CO_2 koncentrációja lecsökken a virágzások alatt (Paerl és Huisman, 2009). Csaknem az összes eukarióta alga és az összes cianobaktérium rendelkezik szénmegkötő mechanizmussal. Ugyanakkor bizonyított, hogy a cianobaktériumok szénmegkötő mechanizmusa alacsony CO_2 koncentrációnál hatékonyabb, mint más algák vagy magasabb rendű növények mechanizmusa és így ez elősegíti dominanciájukat a közösségben (Price et al., 2008). A világ több pontján a nyári szárazságok, az emelkedő tengerszint és a megnövekedett mezőgazdasági öntözés vezettek a tengeri torkolatok és az édesvízi rendszerek sótartalmának a növekedéséhez. A vizek sótartalmának változása hatással van a fitoplankton fajok összetételére (Bordalo és Vieira, 2005). Az eukarióta fitoplankton általában nehezen tolerálja a víz sótartalmában bekövetkező változásokat, ezzel szemben a cianobaktériumok csoportja tág határok között képes elviselni az ilyen jellegű folyamatot. Az édesvizek és a brakkvizek megnövekedett sótartalma kedvez a cianobaktériumoknak, és így hatással van a közösség összetételére és egyes fajok elszaporodására (Tonk et al., 2007).

2.4.4. A fény

Az eukarióta algákhoz hasonlóan a cianobaktériumokban is a klorofill-a az a fontos pigment, amely kulcsszerepet játszik a fény megkötésében. Más pigmenteket, például az allofikocianint (kék), fikocianint (kék), és ritkán fikoeritrin (vörös) magukban foglaló fikobiliproteineket is tartalmaznak (Cohen-Bazire és Bryant, 1982). Ezek a pigmentek a fénynek a spektrum zöld, sárga és narancs tartományába eső részét (500-650 nm) gyűjtik össze, amelyet más fitoplankton fajok alig tudnak hasznosítani. A fikobiliproteinek a klorofill-a-val együtt lehetővé teszik a cianobaktériumok számára azt, hogy hatékonyan összegyűjtsék a fényenergiát, valamint azt, hogy olyan környezetben is tudjanak élni, ahol csak zöld fény van. Sok cianobaktérium érzékeny a hosszantartó, magas fényintenzitásra. A *Planktothrix* (korábban *Oscillatoria*) *agardhii* növekedését gátolja, ha tartósan $180 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ fölötti fényintenzitás éri. $320 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ erősségű tartós fény sok faj számára letális (Van Liere és Mur, 1980). Azonban, ha a cianobaktériumokat időszakosan éri ilyen nagy intenzitású fény, majdnem maximális ütemben növekednek (Loogman, 1982). Ez a fényintenzitás a tavak

felszínét érő $700-1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ erősségű fénynek kevesebb, mint a felével egyenértékű. Úgy tűnik, hogy a felszíni vízvirágzást okozó cianobaktériumok jobban elviselik a magas fényintenzitást. Pearl és munkatársai (1983) ezt a megnövekedett mértékű karotinoid termeléssel hozták összefüggésbe, amely megvédi a sejteket a fotoinhibíciótól. Ezen kívül a cianobaktériumok kedvező energiaegyensúllyal jellemezhetők. A fenntartó anyagcsere-konstansuk alacsony, ami azt jelenti, hogy kevés energiára van szükségük ahhoz, hogy sejteik működését és szerkezetét fenntartsák (Gons, 1977; Van Liere et al., 1979). Ennek eredményeképpen, alacsony fényintenzitásnál a cianobaktériumok növekedési rátája viszonylag magasabb, mint más fitoplankton szervezeteké. Ezért a cianobaktériumok kompetíciós előnyben vannak azokban a tavakban, amelyek más fitoplankton fajok sűrű elszaporodása miatt zavarosak. Ezt bizonyították be egy kísérletben, amely során különböző fitoplankton fajok növekedését mérték meg egy norvégiai eutróf tó különféle mélységeiben (Kallqvist, 1981). Az eredmények azt mutatták, hogy egy méteres mélységben az *Asterionella*, *Diatoma* és *Synedra* kovaalga fajok gyorsabban növekedtek, mint a *Planktothrix* nevű cianobaktérium faj, míg két méteres mélységben e fajok körülbelül azonos ütemben növekedtek. A három méter alatti nagyon alacsony fényintenzitásnál csak a *Planktothrix* növekedett. A cianobaktériumoknak az a képessége, hogy alacsony fényerősségnél is tudnak növekedni és a klorofill-a elnyelési maximumától eltérő hullámhosszúságú tartományt is képesek hasznosítani, lehetővé teszi számukra azt, hogy más fitoplankton fajok "árnyékában" is növekedjenek. Van Liere és Mur (1979) bebizonyították a cianobaktériumok és más fitoplankton fajok közötti versengést. Amíg a zöldalga (*Scenedesmus protuberans*) magas fényintenzitásnál nőtt gyorsabban, a cianobaktérium (*Planktothrix agardhii*) növekedése alacsony fényintenzitáson volt gyorsabb. Abban az esetben, amikor mindkét élőlény ugyanabban az állandó tenyészetben, alacsony fényintenzitáson növekedett, a *Planktothrix* előnyhöz juthatott a *Scenedesmus* szemben. Magas fényintenzitáson a zöldalga tömege gyorsan növekedett, emiatt nagyobb lett a zavarosság, és csökkent a felhasználható fény mennyisége. Így megnőtt a cianobaktérium növekedési rátája, és emiatt 20 nap után túlsúlyba került. Bár a cianobaktériumok nem képesek olyan maximális ütemben növekedni, mint a zöldalgák, nagyon alacsony fényintenzitásnál azonban az ő növekedési rátájuk magasabb. Ezért erősen zavaros vizekben nagyobb esélyük van arra, hogy felülkerekedjenek más fajokon. Ez megmagyarázhatja, hogy az erősen tápanyagszegény körülmények között is növekedni képes cianobaktériumok miért hoznak létre gyakran vízvirágzásokat a tápanyagban dús, eutróf vizekben (Reynolds és Walsby, 1975).

2.4.5. A növekedés üteme és a populációk állandósága

Egyes cianobaktériumok növekedési rátája kisebb, mint sok algafajé (Hoogenhout és Ames, 1965; Reynolds, 1984). 20°C -on és fényteltési körülmények között a legközönségesebb planktonikus cianobaktériumok növekedési rátája eléri azt az értéket, hogy naponta 0,3-1,4-szer duplázódnak meg, míg a kovaalgák naponta 0,8-1,9-szer, az egysejtű zöldalgáknál megfigyeltek olyan gyorsaságú növekedést, amikor 1,3-2,3-szor duplázódtak meg egy nap alatt (Van Liere és Walsby, 1982). Alacsony növekedési ráta esetén hosszú

tartózkodási idejű vízre van szükség ahhoz, hogy cianobakteriális vízvirágzás alakuljon ki. Ezért rövid retenciós idejű vizekben nincs cianobakteriális virágzás. Reynolds munkáiban (1997) megtalálható azon mechanizmusok minden részletre kiterjedő áttekintése, amelyek meghatározzák a különböző körülmények között élő planktonikus algák és cianobaktériumok növekedésének ütemét.

Amíg sok planktonikus algával evezőlábú rákok, vízibolhák és protozoák táplálkoznak, a cianobaktériumokat nem fogyasztják ugyanolyan mértékben, és az egyes differenciálódott csillós és gyökérlábú protozoák táplálkozásának hatása általában sem jellemző. A cianobaktériumokat vírusok, baktériumok és sugárgombák támadják meg, de a természetes ellenségek jelentőségét a populációk összeomlása miatt nem ismerik teljes mértékben. Mivel kevés természetes ellenségük van, és a lebegést szabályozó képességük megakadályozza ülepedésüket, a cianobakteriális populációk csökkenésének mértéke általában alacsony. Ezért növekedésük lassú ütemét kompenzálja, hogy a már egyszer létrehozott populációk jelentős túlsúlyban vannak (Reynolds, 1997).

2.5. A cianobaktériumokról

Az édesvizekben és néhány esetben a tengerekben is a cianobaktériumok idézik elő a mérgező algavirágzásokat (Carmichael, 1992). A cianobaktériumok kozmopolita élőlényként számos igen szélsőséges élőhelyen is megjelennek a Földön. A legkülönbözőbb sajátosságokkal bíró vizes élőhelyeken (hőforrások, mélytengerek, sóstavak, rizsföldek), szárazföldi területeken, a légkörben és egyes élőlényekkel (szivacsok, zsákállatok, növények) szimbiózisban egyaránt megtalálhatóak (Rai, 1990). Evolúciós jelentőségüket az adja, hogy a mai cianobaktériumok ősei tették lehetővé az élet magasabb szervezettségű formáinak a kialakulását azáltal, hogy oxigéntermelő fotoszintézisük révén nagy mennyiségű oxigént juttattak a légkörbe. A cianobaktériumok már 3,4 milliárd évvel ezelőtt igen nagy mennyiségben voltak jelen a Földön. Ennek bizonyítékát találták meg Nyugat-Ausztráliában a Cápá-öbölben *stromatolitok* formájában (Whitton, 1992).

A cianobaktériumok prokarióta élőlények, vagyis az eukarióta mikroalgákkal ellentétben sejtjeik nem tartalmazzak valódi sejtmagot és más, membránnal határolt sejtorganelumot. A fehérjeszintetizáló apparátus felépítésében 70S riboszómák vesznek részt (Fay, 1965; Bryant, 1994). A központi helyzetű, színtelen centroplazmát színes kromatoplazma veszi körül. A sejtmembrán a tipikus, kettős foszfolipid réteg alkotta egységmembrán. A citoplazmát lizozim-érzékeny Gram-negatív sejtfal veszi körül. A sejtek meghatározott alakját peptidoglikán réteg biztosítja, a sejtfalszintézis penicillinnel gátolható (Bryant, 1994).

A cianobaktériumok fotoszintetizáló élőlények, a fotoszintetikus pigmentek tilakoid membránrendszerbe szerveződtek, amelyek a citoplazma perifériális részén helyezkednek el (kromatoplazma). A sejtek színe a kékeszöldtől az ibolyászörszínig változik, a klorofill-a zöld színe általában elfedi a karotinoidok (pl. β -karotin) és a járulékos pigmentek, mint a fikocianin, allofikocianin és a fikoeritrin (fikobiliproteinek) színét. A fikobiliproteinek fikobiliszómákba szerveződnek, amelyek a tilakoidok külső felszínén, sorokban helyezkednek

el (Bryant, 1994). Klorofill-a molekulákat és fikocianinokat minden cianobaktérium tartalmaz. A cianobaktériumok fotoszintetikus apparátusában az oxigéntermelő szervezetekre jellemző mindkét reakciócentrum (PS I és PS II; Ormerod, 1992) megtalálható. A járulékos pigmentek megfelelő arányban való szintézisével rendkívüli mértékben képesek alkalmazkodni környezetük fényviszonyaihoz (kromatikus adaptáció a környezethez – Bryant, 1994).

A fényellátottsághoz való alkalmazkodásban fontos szerepet töltenek be a sok fajnál megfigyelhető gázvakuólumok. Ezek a gázzal telt hólyagocskák a külső felszínükön hidrofil, a belső felszínükön hidrofób kamrák, a sejtek fajsúlyának szabályozását végzik (Ormerod, 1992). A gázvakuólumok mérete különböző környezeti hatásokra változik, lehetővé téve a baktériumsejt (telep vagy fonal) számára a megfelelő élettér megtalálását.

A cianobaktériumok képesek az alapvető tápanyagok és anyagcseretermékek raktározására. Elektronmikroszkóppal jól megfigyelhetők a citoplazmatikus zárványok (pl. glikogén szemcsék, zsírcseppek, cianoficin szemcsék, polifoszfát testek, karboxiszómák; Fay és Van Baalen, 1987). Kizárólag a cianobaktériumokra jellemzőek a nitrogén „depóként” működő cianoficin szemcsék. A citoplazmában a tilakoidmembránok között helyezkednek el. A kromatoplazmában tápanyagraktárként glikogén szemcsék és polifoszfát testek fordulhatnak elő. A protoplazma jellemző képletei még a karboxiszómák, melyek a széndioxid felvételében játszanak szerepet, a Calvin-ciklus karboxiláló enzimét, a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxilázt és a szénsavanhidrázt tartalmazzák (Bryant, 1994).

A légköri nitrogén megkötésének képessége egy alapvető anyagcsere-folyamat a cianobaktériumok egy részénél. A nitrogénmolekulát a nitrogenáz enzim működése révén közvetlenül ammóniummá (NH_4^+) alakítják. A nitrogénfixálás képessége általánosan előfordul a fonalas, heterocisztát képző nemzetségekben (*Anabaena*, *Nostoc* sp.). Sok adatokkal jól alátámasztott példa azonban azt igazolja, hogy a heterocisztát nem képző cianobaktériumok (pl. *Trichodesmium* sp.) is képesek megkötni a molekuláris nitrogént (Fay, 1965; Fay és Van Baalen, 1987). A heterocisztás Nostocales rend képviselőinek másik jellemző tulajdonsága az akinéta képzés. Az akinéta spóraanalóg, kiszáradás-rezisztens képlet, gazdag glikogénkészlettel és nitrogénraktárral. Az akinéta lehetővé teszi a képzésére képes faj légkörben való terjedését is. A Stigonematales rend fajai ugyancsak rendelkeznek heterocisztával és akinétával is (Fay és Van Baalen, 1987).

Az Oscillatoriales rendbe tartozó egyes fonalas fajok a fonalak végén ún. hormogóniumot fejlesztenek, mely vékony nyálkaburokkal körülvett szaporító képlet, fiziológiai egységeket képező sejteket tartalmaz. A hormogóniumok jól elhatárolható reprodukzív részei a fonalnak, melyek szabadulásuk után aktív sikló mozgásra képesek, a szülői fonalról leválva a szétterjedést szolgálják (Whitton, 1992).

A fenti képletek (heterociszta, akinéta, hormogónium) a multicelluláris, fonalas morfológiájú cianobaktériumok sajátjai. A fonalat alkotó sejtláncolatot trichomának nevezik. Mind a heterociszta, mind pedig az akinéta és a hormogónium a vegetatív sejtek differenciálódásával jön létre (Chorus és Bartam, 1999).

Az unicelluláris formák sejtei gömb, henger vagy ovoid alakúak (pl. Croococcales rend). A sejtek rendezetlen kolóniákba aggregálódhatnak, amelyekben a sejtfalat borító poliszacharid nyálkaburok tartja össze őket. Tok vagy hüvely szekretálásával rendezettebb

telepek alakulhatnak ki. A Pleurocapsales rend bizonyos fajainál pszeudoparenchimatikus telepfelepítés figyelhető meg (Chorus és Bartam, 1999).

A cianobaktériumok szaporodása aszexuális. Az unicellulárisak sejtjei izopolárisak vagy heteropolárisak lehetnek (ez utóbbi esetben a sejtek megnyúltak, az utódsejtek az anyasejt meghatározott részéről válnak le – pl. az ún. exospórák a Chamaesiphonales rend esetében). Egyes csoportoknál megfigyelhető az anyasejt sok apró leánysejtté való feldarabolódása egymást követő kettéosztódásokkal (baeociták vagy endospórák). A fonalas formák reprodukciója történhet a trichóma fragmentációjával vagy az előbbieken tárgyalt hormogóniumok segítségével. A trichomás szerveződésűek kitartó szaporítóképletei a már ismert akinéták (Bryant, 1994).

2.6. Cianobakteriális ökostratégisták

A cianobaktériumok fentebb áttekintett élettani tulajdonságai a különböző fajoknál változatosan alakulnak. Ennek következtében a különböző "ökostratégisták" eltérő típusú algavirágzásokat hoznak létre. Mivel bizonyos cianobaktériumok hasonló ökológiai és ökofiziológiai tulajdonságokat mutatnak, a planktonikus ökoszisztémában való viselkedésük alapján „ökostratégistákként” csoportosíthatók, amelyek tipikusan a vízi ökoszisztémák különböző nicheiben élnek (Chorus és Bartram, 1999).

A felszíni réteget képző ökostratégista cianobaktérium fajok a vegetációs periódus alatt gömb alakú sejtek vagy fonalak nagy tömegeit hozza létre, amelyek nem oszlanak el egyenletesen a vízoszlopban. A *Microcystis*, az *Anabaena* és az *Aphanizomenon* azon fontos nemzetségek, amelyek ilyen fejlődést mutatnak. A víz felszínén a telepek fotoszintézisének üteme gyors, és a sejtek nagy mennyiségű szénhidrátot raktároznak. Bár a sejtek gázvezikulumokat tartalmaznak, a nagy sűrűségű szénhidrátok nehezéket jelentenek, és a telepen belül előidézik a süllyedést. Stoke törvénye szerint a süllyedés üteme a víz és a sejtek sűrűsége közötti eltéréstől és a telep nagyságának négyzetétől (d^2) függ. A nagy telepek gyorsabban süllyednek, mint a kicsik, az egyedülálló sejtek pedig alig végeznek függőleges mozgást. A süllyedés miatt a telepek az eufotikus zónából a mélyebb, sötét vízrétegekbe kerülnek, ahol a légzés és az új gázvezikulumok szintézise során felhasználják szénhidrátjaikat (Utkilen et al., 1985). Azután újra könnyűek lesznek (sűrűségük újra lecsökken), és visszakerülnek az eufotikus zónába. Az úszóképesség szabályozása lehetővé teszi a kolóniák számára azt, hogy a növekedésükhöz legkedvezőbb fényviszonyok között helyezkedjenek el. Ennek egyik előfeltétele az, hogy a víz ne legyen túl zavaros. Éjjel az összes telep könnyűvé válhat, és a populáció bizonyos része összegyűlhet a víz felszínén, ahol a szél összefújhatja őket, és így a tópart szélirányba eső részén tartós felszíni réteget hoznak létre. A vertikális mozgás gyakorisága a telep nagyságától függ. Mivel a mérsékelt övi területeken ősszel csökken a hőmérséklet, a fotoszintézis gyorsabb, mint a légzés, és a szénhidrát "nehezék" nem kerül felhasználásra. Ezért a telepek a vízfenékre süllyednek, ahol átvészeltetik a telet úgy, hogy a légzés vagy az erjedés során fokozatosan elfogyasztják a szénhidrát készleteket. A fenékről tavasszal újra feljövő sejtek egysejtűek vagy nagyon kis telepeket alkotnak. Ebben az időszakban a planktonból vett mintában nehéz felismerni a

Microcystis sp.-t, amely csak akkor válik láthatóvá, ha nyár elején megnő a telepek mérete (Reynolds és Walsby, 1975).

Az úszóképesség szabályozása lényeges előnyt jelenthet a többi fitoplankton szervezettel szembeni versenyben. Azonban ilyen szabályozás csak olyan vizekben lehetséges, amelyek sekély eufotikus zónája kapcsolatban van a függőleges keveredés mélységével ($Z_{eu} < Z_m$). Ezért a mérsékelt övi éghajlaton a *Microcystis* sp. főleg a három méternél mélyebb vizekben okoz vízvirágzást, mivel itt az eufotikus zóna valószínűleg lényegesen sekélyebb, mint a keveredési mélység. Azonban, mint ahogy azt Magyarországról, Ausztráliából és főképpen a szubtrópusi és a trópusi területekről jelentették, a *Microcystis* sp. olyan sekély tavakban is túlsúlyba kerülhet, és jelentős vízvirágzást hozhat létre, ahol nincsen a függőleges mozgásból származó kompetíciós előnye. Reynolds (1997) a *Microcystis* sp.-t olyan tavak közismerten és mindent felülmúlóan domináns elemeként jellemzi, amelyekre az évi kétszeri rétegződés jellemző. Sok cianobaktérium nem képes életben maradni tartósan magas fényintenzitás esetén. Ez limitálhatja az elterjedésüket, eutróf ökoszisztémákban. A *Microcystis* fajok azonban kevésbé érzékenyek a magas fényintenzitásra, mivel úszóképességük szabályozása révén képesek arra, hogy növekedésükhöz optimális fényviszonyokat találjanak. Ez azt jelenti, hogy a *Microcystis* jelenléte nem hozható szigorú kapcsolatba az eutrofizálódás szintjével. Emiatt ez a nemzetség megtalálható mezotróf, eutróf és hipertróf vizekben. Azonban a faj által elérhető biomassa mennyisége függ az eutrofizálódás szintjétől. A legtöbb *Microcystis* virágzás olyan tavakban fordul elő, amelyekben az átlagos klorofill-a koncentráció nyáron 20-50 µg/l és a Secchi átlátszóság 1-2 méter (Carmichael, 1992).

A **homogén eloszlású ökostratégisták** olyan fonalas fajok, mint például a *Planktothrix* (*Oscillatoria*) *agardhii* és a *Limnothrix* (*Oscillatoria*) *redekei*. Ezek a fajok különösen érzékenyek a magas fényintenzitásra, és nem hoznak létre telepeket (Reynolds, 1984; 1987). Mivel a fonalak eléggé kicsik, az úszóképesség szabályozás útján történő függőleges mozgás kevésbé jellemző, mint a vízáramlással való passzív sodródás. Ezért ezek a fajok egyenletesen oszlanak el az epilimnionban. Az ilyen típusú ökostratégisták eutróf és hipertróf sekély tavakban fordulnak elő. A vízvirágzást mutató, eltérő ökotípusú tavak nem mélyebbek három méternél, és bennük a klorofill koncentráció 50 µg/l, kivételes esetekben nagyobb, mint 200 µg/l. A fonalas szervezetek alig fogyaszthatók, és nem ülepednek. Ennek a típusnak a virágzása gyakran valódi monokultúrákat eredményez, amelyek sok éven át egész évben túlsúlyban vannak. Ilyen tavakban a populációdinamika korlátozható. Mérsékelt övi területeken az őszi populáció a jég alatt akár télen is képes életben maradni. Ilyen körülmények között a tavaszi populáció viszonylag magas egyedsűrűségű, amikor növekedni kezd, és így kompetíciós előnyhöz juthat a többi fajjal szemben (Visser, 1990). Ezek a cianobakteriális populációk nagymértékű zavarosságot okoznak, és így hatékonyan elnyomják más fitoplankton fajok növekedését. Ennélfogva a következő nyári populáció csaknem a különböző fitoplankton fajok évszakonkénti váltakozása nélkül jön létre. A populáció nagyfokú állandósága eleve megakadályozza a foszfor és a nitrogénnek az ökoszisztéma más komponenseihez viszonyított újbóli megoszlását, és ez előmozdíthatja a tavak helyreállítására irányuló terveket (Reynolds, 1987).

A rétegződést mutató ökostratégisták a képviselői stabil nyári populációkat hoznak létre a termikusan rétegződő tavak és víztározók metalimnionnak nevezett közbülső zónájában. Az élőlények vörös színű pigmentet, fikoeritrin tartalmazzak, hogy elnyeljék az ebben a mélységben uralkodó zöld fényt. Az ilyen fajok között a *Planktothrix* (*Oscillatoria*) *rubescens* a leggyakoribb, de más *Planktothrix* fajok vörös típusai is alkotnak metalimnikus populációkat (Aune et al., 1997). Ezen fajok egyedülálló fonalai alig végeznek függőleges mozgást. Azonban késő ősszel, a növekedési időszak végén a sejtek könnyűvé válnak, és vörös színű réteget hoznak létre a felszínen (Walsby et al., 1983). Ennek a *Planktothrix* fajnak a niche erősen korlátozott. A metalimnikus zónában megfelelő mennyiségű fényre van szüksége, de a túl sok fény gátlást jelenthet számára. A legtöbb metalimnikus vízvirágzás a felszínt érő sugárzás 1-5%-át kitevő fényintenzitásnál és 0,7 -1,2 Z_{eu}/Z_m tartományban fordul elő (Walsby, 1978; 1981; 1987).

2.7. Cianobakteriális toxinok

2.7.1. Ciklikus peptidek: mikrocisztinek, nodularinok

A vízvirágzásokból leggyakrabban kimutatott cianotoxinok a ciklikus peptidek köréből, a mikrocisztin és nodularin családból kerülnek ki (Carmichael, 1992). Egértésztben ezek a vegyületek a máj-kapillárisok permeabilitását károsítva néhány órán belül a kísérleti állatok pusztulását váltják ki (Carmichael és Skulberg, 1993). Mikrocisztineket termelő szervezetek a planktonikus *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, és *Anabaenopsis* fajok és a szárazföldi *Hapalosiphon* genusz. Nodularin termelést eddig csak a *Nodularia spumigena* fajnál mutattak ki (Chorus és Bartam, 1999).

A ciklikus peptidek a sejtben általánosan előforduló oligo- és polipeptideknél kisebb méretű vegyületek (molekulatömeg: ~800-1100 Da). Öt (nodularinok) vagy hét (mikrocisztinek) aminosavból épülnek fel (Gorham és Carmichael, 1988). A lineáris molekula gyűrűvé záródásával, az amino- és karboxiterminális végek kondenzációjával alakul ki a ciklikus szerkezet. Vízoldhatók és - néhány, sok hidrofób csoportot tartalmazó mikrocisztin kivételével - nem képesek közvetlenül áthatolni az állati, növényi és bakteriális sejt membránján. A sejtbe való bejutásukban olyan transzporterek vesznek részt, amelyek egyébként esszenciális vegyületek szállításáért felelősek. A környezetbe ezek a toxinok csak a cianobakteriális sejtek pusztulása után, azok lízise alkalmával kerülhetnek, kémiai stabilitásuk és vízoldhatóságuk következtében kiszabadulásuk után hosszabb-rövidebb ideig jelen lehetnek a felszíni vizekben (Falconer, 1993). A cianobakteriális ciklikus peptidek kémiai szerkezetének felderítése a nyolcvanas években kezdődött. A kilencvenes években nagyszámú toxinvariáns pontos struktúráját írták le. Általánosságban elmondható, hogy e vegyületek felépítésében az L- és D-aminosavak mellett szokatlan, ritka aminosavszármazékok vesznek részt (Harada et al., 1990). A mikrocisztin típusú toxinokat elsőként a *Microcystis aeruginosa* cianobaktérium fajtából izolálták, innen ered e toxincsalád elnevezése (Carmichael et al., 1988). Több mint 100 strukturális variánst azonosítottak a különböző cianobaktérium törzsekből. A szerkezeti eltérések a cianotoxinban előforduló hét aminosav bármelyikét érinthetik,

leggyakrabban a 2. és a 4. L-aminosav szubsztituáltságában, valamint a 3. és a 7. aminosav demetilációjában jelentkezik (Harada et al., 1988; 3. ábra).

A brakkvizekben előforduló cianobaktérium faj, a *Nodularia spumigena*, a mikrocisztinokkal azonos hatású, egyszerű szerkezetű ciklikus pentapeptidet tartalmaz, amelyet az organizmus nevére nodularinnak neveztek el. E vegyületnek is több szerkezeti variánsát izolálták. A *Theonella swinhoei* tengeri szivacsban találtak egy nodularin-analógot, a motuporint, amely csak egyetlen aminosavban különbözik a nodularintól. Feltételezhetően cianobakteriális eredetű a toxin, mivel ismert, hogy a szivacsnak cianobakteriális szimbiontái vannak (Annala et al., 1996). A mikrocisztinek és nodularinok toxicitásának alapja, hogy erősen képesek kötődni az eukarióta sejtek kulcsenziméhez, a szerin-treonin protein-foszfatazok speciális típusaihoz (PP1, PP2A, PP4). A kötődésben az 5. és 6. aminosavaknak van kitüntetett szerepe (Chorus és Bartam, 1999). E területen bármilyen szerkezeti változás a toxicitás elvesztésével jár. Lineáris formában mindkét vegyületcsoport alacsonyabb toxicitást mutat. Egérteszten, intraperitoneálisan a ciklikus forma 50-300 µg/kg testtömeg mennyisége mutatkozott nagymértékben toxikusnak (Harada et al., 1990; Rinehart et al., 1994).

A gerincesek szervezetébe került mikrocisztinek és a nodularinok a máj sejteiben felhalmozódnak aktív membrán transzportnak köszönhetően, amit az organikus anion transzporter polipeptid (OATPs) hajtanak végre (Runnegar et al., 1995; Fischer et al., 2005). Az OATPs felelősek az epesavak, a szteroidok és egyes fehérjék aktív membrán transzportjáért (Hagenbuch és Meier, 2003). A hepatotoxinok a májon kívül a vesében, a szívben, az ivarmirigyekben, az emlősök és a halak izomzatában, a vízi gerinctelenek láb szöveteiben halmozódnak fel (Chen és Xie, 2005; Kankaanpää et al., 2002). A mikrocisztinek és nodularinok gátolják a proteinfoszfataz 1 és 2A enzimeket, ezáltal a sejtekben a foszforilációs/defoszforilációs reakcióinak egyensúlya megbomlik és végül a sejtszerkezet visszafordíthatatlanul károsodik (Gácsi et al., 2009). Az enzimek gátlása akkor jön létre irreverzibilisen, amikor a MC Mdha egysége és az enzim között kialakul a kovalens kötés. A hepatotoxinok oxidatív stresszt is kiváltanak azáltal, hogy növelik a káros reaktív oxigénformák mennyiségét és/vagy csökkentik a sejt antioxidáns aktivitását (detoxifikációs enzimek gátlásával) ami végül a DNS degradációját és/vagy a sejt pusztulását okozza (apoptózis és nekrosis). A mikrocisztinek növelik a káros szabad gyökök termelését, az antioxidáns enzim aktivitást, a lipid peroxidációt, a DNS károsodást és a sejtek pusztulását okozhatják (Ding et al., 2001; Pinho et al., 2003; 2005; Zegura et al., 2004; 2006; Komatsu et al., 2007). A nodularinok csökkentik a glutation-peroxidáz, a szuperoxid-dizmutáz, és a kataláz enzimek aktivitását (Lankoff et al., 2002). Végezetül elmondható hogy, a hepatotoxinok jelentős tumor promótereknek számítanak (Codd, 1994).

A hepatotoxinok hátrányosan hatnak a vízi gerincesekre és gerinctelenekre laboratóriumi valamint terepi körülmények között is. A nodularin a tengerben élő pisztráng (*Salmo trutta*) májának szöveti károsodását eredményezte. A néhány napig igen magas hepatotoxin koncentrációnak (2,5-300 µg/l) kitett édesvízi és a tengeri kagylók túlélése azt mutatja, hogy ezek a fajok - legalábbis rövid ideig - toleránsak a toxinnal szemben. A máj és a középbél mirigy károsodása visszafordítható, ha a vízi organizmusokat eltávolítjuk a toxikus környezetből, azonban ha nem távolítjuk el őket vagy nagymértékű dózisnak vannak kitéve, akkor a toxinok jelenléte pusztulásukhoz vezethet. A gerincesekben a hepatotoxin LD₅₀ értéke

50 µg/kg és 300 µg/kg között változik, ez az érték fajtól függő (Pflugmacher, 2002). A hepatotoxinok negatív hatással lehetnek az akvakultúrák termelékenységére, ahol a tenyésztett fajok növekedése nagyban függ az alacsonyabb trofikus szintek populációinak (baktériumok, mikroalgák, vízi növények) a gyarapodásától. Ökológiailag lényeges a mikrocisztin-LR variáns 0,5 µg/l és 1,0 µg/l közötti koncentrációja, mivel ezeknél az értékeknél négy vízi növény és egy *Cladophora sp.* makroalga fotoszintézise és/vagy növekedése jelentősen lecsökkent. A nodularint tartalmazó kivonat egy másik makroalgánál a *Fucus vesiculosus*nál oxidatív stresszt váltott ki (Pflugmacher, 2002; Pflugmacher et al., 2007). A hepatotoxinok felhalmozódhatnak a természetes vizekben és az akvakultúrákban előforduló pelagikus és bentikus állatokban egyaránt. A legfőbb hepatotoxin tároló szervek a máj/középbél mirigy és az izom, amelyek emberi fogyasztásra is alkalmasak. Embert ért direkt mérgezési esetek nagyon ritkák. A legtöbb halálesetet a brazil Caruaru városából egy hemodialízis központból jelentették, ahol legalább 50 páciens halt meg neurotoxikus és hepatotoxikus tünetekben (Jochimsen et al., 1998). Ezenkívül számos bélrendszeri és máj megbetegedést tulajdonítottak a MC-knek, ilyen például az ausztráliai Armidaleben bekövetkezett betegségek sorozata (Chorus és Bartram, 1999).

2.7.2. Cilindrospermopszin

A cilindrospermopszin az alkaloidok közé tartozó cianotoxin. Ciklikus guanidin alkaloid, melynek molakulatömege 415 Da (3. ábra). A *Cylindrospermopsis raciborskii*, (Hawkins et al., 1985, 1997), az *Umezakia natans* (Harada et al., 1994), az *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al., 1997; Törökné et al., 2004), a *Raphidiopsis curvata* (Li et al., 2001), az *Anabaena bergii* és az *Aphanizomenon flos-aquae* (Preussel et al., 2006) cianobaktérium fajok termelik. Tiszta formában a cilindrospermopszin elsősorban a májra hat, de káros hatást gyakorol a vesére, lépére, timuszra és a szívre is (Runnegar et al., 1994, 1995; Runnegar és Lu, 1994; Falconer et al., 1999; Azevedo et al., 2002). Újabban a toxin genotoxikus volta is felmerült (Kiss et al., 2002; Shen et al., 2002). Az 1994-es Kinneret-tavi (Izrael) vízvirágzásból származó *Aphanizomenon ovalisporum* törzsből izolált biológiailag hatásos vegyület optikai aktivitást mutat, a látható fényt + 10,2° mértékben elforgatja. A forgatás mértéke és iránya bázikus (pH=9,0 NH₃ oldattal beállítva), semleges (pH=7,0) valamint savas (pH=5,0 CH₃COOH-al beállítva) közegben sem változik. Az *Umezakia natans*-ból izolált vegyület ugyanilyen optikai tulajdonságokkal jellemezhető, míg a *Cylindrospermopsis raciborskii* terméke ellentétes értéket mutat (Othani et al., 1992).

Burgoyne és munkatársai közöltek először adatokat a toxin bioszintéziséről. Radioaktív izotópokkal jelölt feltételezett prekursor molekulák felhasználásával tárták fel a cilindrospermopszin képződésének lépéseit *Cylindrospermopsis raciborskii*-ban. Kimutatták, hogy a molekula alapja a guanidino-ecetsav, amely öt acetát egységből épül fel. Az acetát egységek adják a CYN 4. – 13. szénatomjait, a 14. és 15. szénatom, illetve a 16-os számú nitrogén glicinből származik. Az acetát egységek és a glicin összekapcsolását a poliketid-szintáz enzim végzi, a ciklizáció feltételezhetően autokatalitikus úton megy végbe. A 16-os számú nitrogén nem a glicin ismert aminációjával épül be a molekulába, és a NH-CO-NH szegment eredete is ismeretlen. Feltételezik, hogy a guanidino-ecetsav létrejöttében egy

amidino-transzferáz enzim is részt vesz (Burgoyne et al., 2000). Ezt a feltevést látszanak alátámasztani Shalev-Alon és munkatársainak eredményei is. Kutatócsoportjuk egy amidino-transzferázt kódoló gént azonosított az *Aphanizomenon ovalisporum*-ban. A gén a szekvenciaadatok alapján a *Streptomyces griseus*-ból leírt prokarióta típusú amidino-transzferáz enzimet kódolja. A gén egy poliketid szintázt és egy peptid szintetázt kódoló gén között helyezkedik el, „szomszédjai” kulcsfontosságúak a cilindropermopszin szintézisében. A hasonló élettani folyamatokban vagy biomolekulák szintézisében résztvevő enzimeket kódoló gének a prokariótákban az esetek túlnyomó többségében klaszterekbe, szabályozási egységekbe tömörülnek. Mindez azt sugallja, hogy az amidino-transzferáz enzimnek szerepe van a toxin lérejtésében (Shalev-Alon et al., 2002).

A cilindropermopszin sötétben viszonylag stabil vegyület, magas hőmérsékleten (50°C) lassú bomlása figyelhető meg (Chiswell et al., 1999). Napfényben, pigmentek (fikobiliproteinek) jelenlétében relatíve gyorsan bomlik, 2-3 nap alatt a kiindulási mennyiség 90%-a degradálódik. A tiszta toxin napfényben is stabilnak mondható (Chiswell et al., 1999).

A toxin kiülepedése, az iszapban való felhalmozódása nem jellemző folyamat, bioakkumulációjára már több példát láthatunk (elsősorban rákok, kagylók esetében - Saker és Eaglesham, 1999; Saker et al., 2004; Kankaanpää et al., 2005). A cianotoxinok a zooplankon képviselőire sokféle hatással vannak, melyek még nem egyértelműen tisztázottak (Fabbro et al., 2001; Nogueira et al., 2004). A cilindropermopszin vízi gerincesekre való hatásáról lényegesen kevesebb adat található az irodalomban, a vizsgálatok azt mutatják, hogy a mérgezési tünetek hasonlóak, mint az emlősök esetében a laboratóriumi kísérletekben. A táplálkozás során a szervezetbe kerülő, cilindropermopszint termelő cianobaktériumok, vagy maga a toxin a májsejtek nekrozisát okozza, amit a halak pusztulása követ. Az érzékenységekben nagy eltérések mutatkoznak a különböző fajok között. A cilindropermopszin károsíthatja a májon kívül a szívet, vesét, kopolyút is (Chorus és Bartram, 1999).

2.7.3 Anatoxinok

Az anatoxin-a egy kis molekulatömegű (165 Da), szekunder amin alkaloid (3. ábra). A neurotoxinok csoportjába tartozik. A támadáspontja a kolinerg szinapszis és feszültségfüggő Na^+ -csatornák. Az anatoxin-a által indukált neuromuszkuláris blokkolás az izom membrán depolarizációját és deszenzibilizációját okozza. Az anatoxin-a és homoanatoxin-a a nAChR (nikotinos acetilkolin-receptor) agonistái, a nAChR-hoz való kötődése a csatorna nyitódását indukálja, ezáltal a pozitív töltésű ionok áthaladását engedi, mely a membrán depolarizációját eredményezi. Ha a szervezet hosszabb ideig van kitéve anatoxin-a-nak, akkor az a nAChR deszenzibilizációját okozza, amely végül a neuromuszkuláris átvitel gátlásához vezet (Henriksen et al., 1997).

Egerekben toxikus hatásokat figyeltek meg az anatoxin-a szubletális és letális dózis beadása során. Az anatoxin-a erősen csökkentette a vérnyomást, a pulzust, és a légcserét (pO_2 és pCO_2), ezzel hipoxiát és légzés leállást okozva, továbbá végtagrángatózást, eszméletvesztést is megfigyeltek, valamint súlyos acidózist, melyet az állat pusztulása követett (Aráoz et al., 2005, 2010). LD_{50} értéke a homoanatoxin-a-val megegyező, 200-250 $\mu\text{g/kg}$ testtömeg intraperitoneálisan (Carmichael et al., 1992).

Anatoxin-a termelését *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena planktonica*, *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, valamint *Raphidiopsis*, *Planktothrix rubescens* (Ballot et al., 2010), és bentikus zónában élő *Oscillatoria* fajok esetében írták le. A homoanatoxin-a egy anatoxin-a homológ vegyület, melyet egy Norvégiából származó *Oscillatoria formosa*-ban izolálták először. Szerkezetileg abban tér el az anatoxin-a-tól, hogy a 2. szénen lévő acetyl-csoport helyett propionil-csoportot tartalmaz. Kevésbé toxikus hatású, *Planktothrix* és *Raphidiopsis* fajok által is termelt metabolit, melynek természetbeni előfordulása ritka. Anatoxin-a és homoanatoxin-a egyidejű termelését bebizonyították a *Raphidiopsis mediterranea*, és az axenikus *Oscillatoria* PCC 9029 (Aráoz et al., 2005) törzseknél. Az anatoxin-a és homoanatoxin-a jelenléte számos axenikus – mikrobiális szennyeződéstől mentes – cianobakteriális fajnál, melyek az *Anabaena* és *Oscillatoria* nemzetségbe tartoznak, megerősítést nyert (Aráoz et al., 2005; Cadel-Six et al., 2007).

Az anatoxin-a(S) egy foszforilált ciklikus N-hidroxiguanin (3. ábra), melyet egy *Anabaena flos-aquae* törzsből azonosítottak. Acetilcholin-észteráz inhibitor aktivitású vegyület. A mérgezési tünetek között szerepel az intenzív nyáladzás (innen a nevében szereplő S–salivatio). LD₅₀ értéke 20 µg/kg testsúly (Carmichael, 1992). Szerkezeti variánsai nem ismertek. A természetben ritkának mondható szekunder metabolit.

Az anatoxin-a és homoanatoxin-a bioszintéziséért felelős génklaszter nyolc, egymással kapcsolatban lévő, különböző funkciót kódoló gént tartalmaz (*anaA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* és *H*). A bioszintézis első lépéseként prolin acil-karrier proteinnel kapcsolódik, majd öt lépésben oxidáció zajlik a pirrolin oxidációjáig (Méjean et al., 2009). Ez az aktivált gyűrű azután sikeresen kapcsolódik három poliketid-szintáz modulhoz elongáció, redukció, ciklizáció és metiláció révén. A végső lépésben a tioészter hidrolízise zajlik újabb dekarboxilációval. Specifikus PCR amplifikáció alkalmazásával igazolták, hogy az *anaC*, *anaE*, *anaF*, és *anaG* gének mindig jelen vannak a cianobaktérium genomban, ha a szervezet anatoxin-a-t vagy homoanatoxin-a-t termel, viszont hiányoznak a nem-termelő törzsekben. Hisztidinnel jelölt *AnaC* hisztidinnel jelölt *AnaD*-hez történő prolin kapcsolódását katalizálta. Mindezen adatok azt bizonyítják, hogy sikeresen azonosították az anatoxin-a és homoanatoxin-a bioszintéziséért felelős génklasztert az *Oscillatoria* PCC 6506 törzsben (Cadel-Six et al., 2009).

2.7.4. Szaxitoxinok

A szaxitoxint és homológ vegyületeit közösen bénulásos kagylómérgeknek is nevezik (PSP, az angol Paralytic Shellfish Poisons kifejezésből). A karbamát alkaloid neurotoxinok közé tartoznak a nem szulfatált szaxitoxinok (STX; 3. ábra), az egyszerűen szulfatált gonyautoxinok (GTX), valamint a kétszeresen szulfatált C-toxinok. A szaxitoxinnak több mint 30 analógja van, melyek szerkezetileg 4 pozíciónál térhetnek el. A variábilis pozíciók lehetnek hidroxiláltak, szulfatáltak vagy karboxiláltak (Wiese, 2010). A származékok toxicitása igen eltérő, a karbamát toxinok 10-100-szor hatásosabbak, mint az N-szulfokarbamoil származékok. Utóbbiak azonban instabil vegyületek és könnyedén átalakulhatnak a

sokkal toxikusabb karbamát származékokká. PSP tünetek általában 30 percen belül jelentkeznek. Az ajkak, nyelv és torok zsibbadásával vagy égésével kezdődik, majd a teljes arc elzsibbad (Castro et al., 2004). További tünetei lehetnek a verejtékezés, hányás, hasmenés. Súlyos mérgezés esetén a zsibbadtság tovább terjedhet a nyakra és a végtagokra, izomgyengeség, mozgásképtelenség és végül bénulás jelentkezik. A szaxitoxin halálos dózisban rendszerint kardiovaszkuláris károsodást okoz a légzőizmok bénulása miatt. Erős feszültségfüggő Na^+ -csatorna blokkoló vegyület, mely az idegsejtek membránján hat. Ezen felül, a szaxitoxin Ca^{2+} -csatornákat is blokkol, és meghosszabbítja a szívizom sejtekben a K^+ -csatornák bezáródását (Carmichael, 1992; Wiese, 2010).

Az első azonosított PSP toxint termelő faj az *Aphanizomenon flos-aquae* volt. A szaxitoxinok bioszintézisét kódoló génklaszter kb. 35 kb méretű, melyben 26 különböző fehérje 30 katalitikus funkciót lát el. A génklaszterbe tartozik egy *stxA* gén, amely PKS-hez hasonló szerkezetű, és a Claisen-kondenzációt katalizáló enzimeket kódolja. Több, az intermedier vegyületek hidroxilációját kódoló gént (*stxD*, *S*, *U*, *H*, *T*), a transzportban fontos géneket (*stx G*, *B*), valamint ismeretlen funkciójú géneket (*stxJ* és *K*), és elektron transzportért felelős géneket (*stxV*, *W*) tartalmaz a génklaszter (Kellman et al., 2008).

2.7.5 BMAA- β -metil-amino-alanin

A BMAA (β -metil-amino-alanin) már az 1960-as évek óta ismert nem esszenciális aminosav (3. ábra). A vegyületet az ALS-PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis – Parkinsonism Dementia Complex) tünet együttes kialakulásában tartják kulcsfontosságúnak. A betegség az agyi motoros funkciók romlásában, Parkinson szerű tünetekben és az Alzheimerhez hasonló dementiában, butulásban nyilvánul meg (Banack et al., 2003). Elsőként a csendes-óceáni Guam szigetén regisztrálták a Chomorro öslakosok körében. Évek során egyes Japán szigeteken és kanadai, Alzheimer-kórban elhunyt betegek agyszövetében is kimutatták a vegyületet, ami arra utal, hogy nem egyedi, elszigetelt esetről van szó (Cruz-Aguado et al., 2006). A vegyület mindinkább a figyelem központjába került, miután bebizonyosodott, hogy a világon szinte mindenhol megtalálható cianobaktériumok termelik a BMAA-t, amely képes felhalmozódni az élő szervezetekben (Banack et al., 2006). A probléma ezáltal gazdasági és emberi egészségügyi veszéllyé nőtte ki magát. Számos cianobaktérium genusz esetében igazolták a toxin jelenlétét, pontos termelési körülményekről egyelőre nincs kellő információ. Önmagában jelentéktelen ($0,3\mu\text{g/g}$) a cianobaktériumokban termelt BMAA mennyisége, de szimbiózisban élve ez a biomagnifikáció következtében nagyságrendekkel nőhet ($2\text{--}37\mu\text{g/g}$). A cikász növény maghéjában ez a koncentráció elérheti a $1000\mu\text{g/g}$ -ot, míg az ezt fogyasztó denevérekben ennek több mint háromszorosa is felhalmozódhat. A cianobaktériumok BMAA termelésének igazolására több kutatást is végeztek európai és amerikai egyetemeken (Santiago et al., 2006). A kísérletek során szabadon és zuzmókkal, mohákkal szimbiózisban élő algákat vizsgáltak édes és sós vizekből egyaránt. Arra a megállapításra jutottak, hogy a vizsgált telepek 95%-a termel BMAA-t.

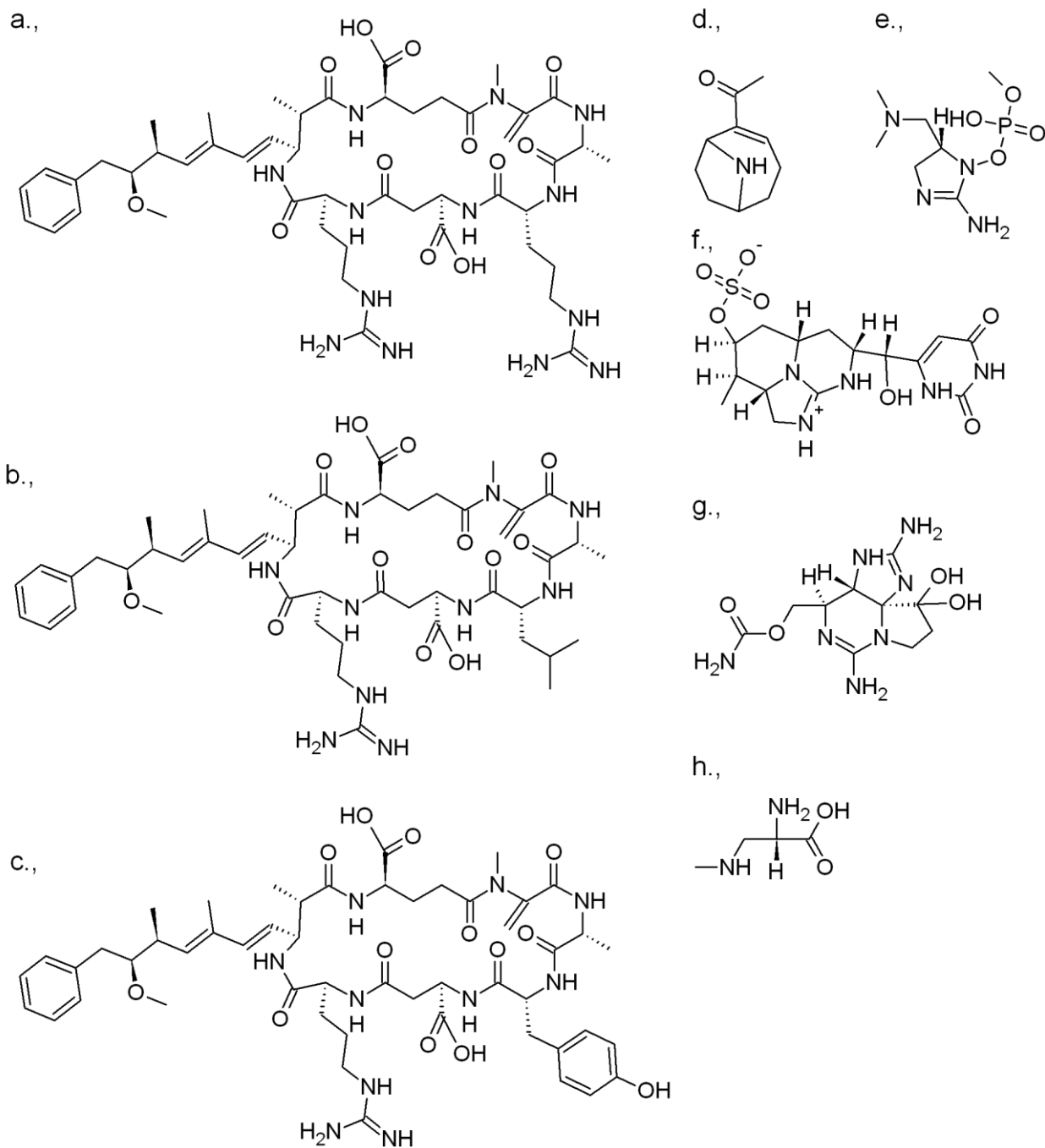
Eltérően más cianotoxinoktól a toxin termelése és raktározása a környezettől és az életciklustól függ, (Cox et al., 2005).

2.7.6. Dermatotoxikus alkaloidok – az apliziatoxinok és a lingbiatoxinok

Tengeri, bentikus cianobaktériumok, mint pl. *Lyngbya*, *Oscillatoria* és *Schizothrix* fajok termelhetnek olyan cianotoxinokat, amelyek komoly dermatitist okozhatnak. A *Lyngbya* gyulladáskeltő hatásáért az apliziatoxinok és debromoapliziatoxinok felelősek, amelyek potenciális tumor promoterek és protein kináz-C aktivátorok. A *Lyngbya majuscula* egy másik törzse dermatitist és súlyos száj és gyomor/bélgyulladást okoz. Ez a faj lingbiatoxin-a-t tartalmaz (Chorus és Bartam, 1999).

2.7.7. Irritáló hatású toxinok – a lipopoliszacharidok

Először Weise és munkatársai izoláltak lipopoliszacharidokat az *Anacystis nidulans* cianobaktérium fajból (Weise *et al.*, 1970). A lipopoliszacharidok általában a Gram-negatív baktériumok sejtfalához tartozó külső membránban találhatók, ahol fehérjékkel és foszfolipidekkel alkotnak komplexet. A lipopoliszacharidok, ahogy a nevük is mutatja egy cukorkomponensből, általában hexózból, és egy lipid alkotórészből, leggyakrabban 14-18 szénatomszámú hidroxizsírsavból állnak. A zsírsav komponens tehető felelőssé az emberben és emlősállatokban kiváltott allergiás tünetekért (Keleti és Sykora, 1982).



3. ábra. A leggyakoribb cianobakteriális toxinok (a: MC-LR, b: MC-RR, c: MC-YR, d: anatoxin-a, e: anatoxin-a(s), f: cylindrospermopszin, g: saxitoxin, h: BMAA).

2.8. A mérgező algavirágzások következményei

Az elmúlt években a világ számos pontján mind gyakoribbá váltak a mérgező algavirágzások és a velejáró mérgezéses tünetekkel járó káros jelenségek. Ez káros hatással van egyes életközösségekre, komoly gazdasági vonatkozásai vannak, valamint környezet-egészségügyi szempontból negatívan érinthet humán populációkat is (4. ábra). Éves szinten 60 000 mérgezést regisztrálnak, melyek algatoxinokkal hozhatóak összefüggésbe és ezen belül 1.5%-os az elhalálozási ráta (Dolah et al., 2001; Sellner, 2003). Az algatoxin-mérgezések csak egy része származik közvetlen a toxintermelő algával történő kontaktusból. Az Egyesült Államokban az élelmiszer-eredetű megbetegedésnek körülbelül 10%-a algatoxinnal szennyezett tengeri élelmiszereknek köszönhető. Egyes algafajok által termelt toxinok emberi megbetegedésekhez, halálesetekhez vezethetnek, de halak, kagylók koralzátonyok közösségeit is komolyan veszélyeztethetik (Landsberg, 2002; Bácsi et al., 2009). Az ismert algafajok kevesebb, mint 2%-a toxintermelő ismereteink szerint. Nagyon gyakran az ilyen tulajdonsággal bíró algafajok viszonylag kis egyedszámban vannak jelen a víztérben illetve más élőhelyeken is csupán ritkán fordulnak elő, ilyen esetben nem merül fel és nem is nagyon érdemes beszélni valószínű bekövetkező mérgezéses esetekről. Azonban ha mérgező algafajok egyedszáma, sejtsűrűsége megnő, értelemszerűen az általuk termelt toxinok tényleges mennyisége is magasabb lesz, ilyen esetben a mérgező anyagcseretermékek tényleges hatása gyakrabban kerül előtérbe, és nagyobb mértékű lehet a tápláléklánc elemeiben, egyedeiben a toxinok felhalmozódása is (Hallegraef, 1993; 2003). A tapasztalatok szerint a toxinok közvetlen elfogyasztásán túl, mind gyakrabban következnek be olyan mérgezéses esetek, amikor a mérgező metabolit kellemetlen, gyakran végzetes hatása magasabb trofikus szinten érvényesül. Számos példát ismerünk arra, amikor az algatoxin mérgezés kagylók, halak és más tengeri vagy édesvízi élőlénycsoport elfogyasztása révén következik be egyes fogyasztó, ragadozó élőlény vagy akár az ember esetében is. A jelenleg ismert adatok szerint az algatoxinok által okozott mérgezéses balesetek száma évente mintegy 50 000-500 000 közé tehető, és globális szinten az eseteken belül a halálozási arány 1,5 %-os. Mindamellet, hogy a káros és végzetes hatásokat említjük az emberi egészség kapcsán, fontos kiemelni, hogy számos esetben algatoxinok lehetnek felelősek halak, kagylók, tengeri emlősök, madarak és más állatok legyengüléséért, elhullásáért a táplálékláncban betöltött szerepüktől függően (Dolah, 2000; 2005). A felszíni vizekben előforduló algavirágzások esetében kézenfekvőnek tűnik, hogy a mérgező anyagcseretermékek, toxinok a vizekben élő szervezetekkel kerülnek kapcsolatba és fejtik ki káros hatásaikat. Azonban az algatoxinok egy nagyon fontos sajátossága, hogy a tápláléklánc egyes elemein keresztül szárazföldi élőlénycsoportokra is képesek hatást gyakorolni. Az expozíció létrejöttéhez értelemszerűen fontos az a kontaktus, amelyet egyes élőlénycsoportok pl. a halak aktív mozgással képesek elkerülni, míg más élőlénycsoport toxinkitettsége állandó lehet, pl. kagylófajoké. Nem meglepő módon azon az élőlénycsoportokban, amelyek esetében ez a kontaktus folyamatos, idővel ellenálló, kevésbé érzékeny szervezetek kialakulása lehet jellemző. Megbetegedéssel, elhalálozással nem reagálnak, ugyanakkor képesek a toxinokat jelentős mennyiségben felhalmozni. Ugyanakkor, azok a vízi illetve szárazföldi élőlénycsoportok, amelyek nem vagy nem rendszeresen kerülnek szembe algatoxinokkal, igen érzékenyen reagálhatnak az adott

toxindózisra (1. táblázat). Ez jellemző lehet vízi madarakra, emlősökre és más szárazföldi élőlénycsoportokra egyaránt (Chorus és Bartam, 1999; Bácsi et al., 2009).

1. táblázat. Néhány cianobakteriális vízvirágzás okozta dokumentált mérgezés* a 19. és 20. századból (Landsberg, 2002). *a mérgezett élőlénycsoportok identitását/besorolását az irodalmi adatok szerint közöljük

Faj	Elpusztult, mérgezett élőlénycsoportok, fajok	Dátum	Helyszín
<i>Anabaena circinalis</i>	halak	1880	Zirke tó, Posen, Lengyelország
+ <i>M. aeruginosa</i>	300 juh, 5 szarvasmarha, ló méhek	1959 1971	Bonney tó, Ausztrália Burrinjuck tározó, New South Wales, Ausztrália
	20 bárány	1975	Young, New South Wales, Ausztrália
	tehén	1985	Sääskjärvi tó, Finnország
	kb. 1000 denevér, 24 vadkacsa és amerikai réce	1985	Steele tó, Albera, Kanada
	1600 juh, halak	1991	Darling folyó, Ausztrália
	14 juh	1994	Forbes, New South Wales, Ausztrália
<i>Anabaena flos-aquae</i>	1 juh, 17 disznó, 50 csirke	1918	Oaks tó, Windoin, Minnesota, USA
+ <i>M. flos-aquae</i>	45 pulyka, 4 kacsa, 2 lúd, tehenek, disznók, lovak	1933	Lac Qui Parle, Milan, Minnesota, USA
+ <i>M. flos-aquae</i>	3 szarvasmarha	1933	Hall tó, Fairmont, Minnesota, USA
	pekingi kacsák, kígyók, szalamandrák, vízi madarak, lovak, borjúk, gémek	1939	Fort Collins, Colorado, USA
	37 disznó, 4 juh, 2 szarvasmarha, 3 ló, kutyák, macskák, mókusok, csirke, pulyka, és énekesmadarak	1944- 1945	East Okoboji, Lower Gam, és Central tavak, Iowa, USA
	kutyák, halak	1948	Storm tó, Iowa, USA
	7000 franklin sirály, 560 kacsa, 400 szárcsa, 200 fácán, 50 róka mókusok, 18 pézsmapatkány, 15 kutya, 4 macska, 2 sertés, 2 héja, 1 görény, 1. nyérc	1952	Storm tó, Iowa, USA
+ <i>Aphanizomenon sp.</i>	20 kutya, 3 szarvasmarha, vadkacsák	1961	Saskatchewan, Kanada
	17 szarvasmarha	1965	Saskatchewan, Kanada
	3 borjú, 12-15 szarvasmarha	1972	Alberta, Kanada
	11 kutya, 1 ló, 1 tehén, lebetegedése, 2 kacsa és hód elpusztult	1976	Long tó, Washington, USA
	30 tehén, 8 kutya	1977	Hegben tározó, Montana, USA
+ <i>M. aeruginosa</i>	11 birka	1984	Montana, USA
	9 kutya, kutyakölykök és 2 borjú	1985	Richmond tó, South Dakota, USA
	5 kacsa, 13 disznó	1986	Illinois, USA
	6 borjú	1988	Oklahoma, USA
	2 kutya	1991	Indiana, USA
	kb. 1000 lazac	1992	Fife, Skócia
<i>Anabaena lemmerntartnii</i>	40 birka	1928	Vesijarvi, Finnország
	9 disznó 2 ló, kacsa, csirke, macska, vadállatok	1948	Fox tó, Minnesota, USA

dc_819_13

	madarak	1993-1994	Knud tó, Dánia
Anabaena sp.	birka	1914	Winnepeg tó, Albion, Minnesota, USA
	szarvasmarha és néhány vadállat	1924	Fraser tó, Ontario, Kanada
	halak, macska, vízi madarak	1940-1942	Ymsen tó, Mariestad, Skaraborg, Svédország
	25 disznó	1967	Saskatchewan, Kanada
	600 000 pisztráng	1989	Észak-nyugat Spanyolország
Anabaena spiroides	10 disznó	1981	Dél-nyugat Illinois, USA
	20 disznó	1987	Kentucky, USA
	18 disznó	1989	Oklahoma, USA
Aphanizomenon flos-aquae	szarvasmarha	1900	Fergus Falls, Minnesota, USA
	halak	1931-1933	Okoboji és Storm tó, Iowa, USA
	halak, békák, gőté	1942	Zuiderzee, Hollandia
	halak	1946	Yahara folyó, Kegonsa tó, Wisconsin, USA
			Manitoba, Kanada
+ <i>M. aeruginosa</i>	nagyszámú vadkacsa	1949-1951	
	1 ló, 9 kutya (spániel)	1951	Dauphin tó, Manitoba, Kanada
	kutya (újfullandi)	1959	Balgonie, Saskatchewan, Kanada
	halak	1964	Winnisquam tó, Laconia, New Hampshire, USA
	halak	1966	Kezar tó, New Hampshire, USA
	2 borjú és 1 kutya ivadékok	1966-1980	Saskatchewan, Kanada Durham, New Hampshire, USA
Cylindrospermopsis raciborskii	13 tehén és borjú	1998	McKinley Shire, Queensland, Ausztrália
Gloeotrichia echinulata	lovak, sertés, szarvasmarha	1882	Sakatah Tetonka tó, Minnesota, USA
	lovak, tehenek	1883	Gorman, Cordova, Sakatah, és Tetonka tavak, Minnesota, USA
Microcystis aeruginosa	több ezer juh, szarvasmarha, ló, őszvér, szamár, kutya, nyúl, pulyka, kacsa, hal nyúl, vízimadarak, háziállatok	1913-1943-1927	NE Otange Free State és SE Transvaal, Dél-Afrika Amersfoort District, Dél-Afrika
	+ <i>M.flos-aquae</i>	1930	Ann, Howard tó, Minnesota, USA
	5 ló, 2 kutya, fécán, gém és a szalonka	1948	Round tó, Minnesota, USA
+ <i>Anabaena spp.</i>	szarvasmarha	1948-1949	Sturgeon tó, Ontario, Kanada

dc_819_13

	lovak, kacs, liba, macskák, kutyák, vízimadarak	1953	Semekhovichi.tó, Zhabchitskii District, Pinsk Province, Oroszország
	halak	1956-1959	Volga delta, Oroszország
+ <i>M. flos-aquae</i> , <i>A. flos-aquae</i> , <i>Aphanizomenon</i> sp.	kb. 30 kutya, 1 liba, ló és szarvasmarha	1959	Saskatchcwan, Kanada
	20 bárány és 66 juh lebetegedése	1965 - 1966	Pleasant Hills and Armatree, New South Wales, Ausztrália
	bárányok szarvasmarhák	1966? 1973-1974	Waipukurau, Új-Zéland Hartbeespoort, Pretoria, Dél-Afrika
+ <i>A. flos-aquae</i>	34 szarvasmarha pulyka	1975 1977	Saskatchewan, Kanada New South Wales, Australia
	4 üsző	1978	Rogaland, Norvégia
	3 rinocérosz (<i>Ceratotherium simum</i>)	1979	Klipvor Dam, Bophuthatswana, Dél-Afrika
	szarvasmarha	1980	Vool tározó, Dél-Afrika
	25 birka	1981	New England, Ausztrália
	halak	1982-1987	Burtnieku, Dunu, Riebizers, Latvia
	72 tehén	1984	Goyena, Argentina
	halak	1984	Aculeo tó, Chile
	11 tehén	1985	Green County, Wisconsin, USA
	5 marha lebetegedése	1987	Mississippi, USA
	4 tehén	1988	Oklahoma, USA
	halak	1988	Forez, Franciaország
	7 vadkacsa	1989	Oklahoma, USA
	20 juh és 15 kutya	1989	Rutland Water, Leicestershire, Anglia
	kutya	1991	Kalifornia, USA
	birka	1992	Lake Mokoan, Victoria, Ausztrália
	3 Holstein üsző	1992	Michigan, USA
	33 birka lebetegedése	1994	Malmesbury District, Dél-Afrika
	20 kacs	1995	Nishinomiya, Hyogo Prefecture, Japán
	30 gém és kacsák	1995	Jehay, Belgium
	halak	1996	Patos öböl, Brazília
	3 bárány	1997	Malmesbury District, Dél-Afrika
	szarvasmarha	1997	South Georgia, USA
	szarvasmarha	1998	Colorado, USA
<i>Microcystis flos-aquae</i>	13 juh, 8 bárány, és számos csirke	1933	Hall tó, Fairmont, Minnesota, USA
<i>Nodularia spumigena</i>	juhok, lovak, disznók, kutyák, és szarvasmarha	1878	Alexandrina tó, Murray River, Ausztrália
	400 kacs	1963	Jasmunder Bodden, Németország
+ <i>Anabaenopsis elenkinii</i>	halak	1964	Fekete-tenger, öböl, Paliastomi, Grúzia

dc_819_13

+ <i>Rhizosolenia fragilissima</i>	34 juh, 52 bárány	1974-1975	Broomhill District, SW Ausztrália
	30 kutya lebetegedése, 20 elpusztult	1975	Aarhus, Balti-tenger, Dánia
	halak	1977	Fekete-tenger, öböl, Paliastomi, Grúzia
	9 kutya	1982	Gotland, Svédország
	16 borjú	1983	Stelasund, Németország
	1 kutya és 3 kutyakölyök	1984	Porvoo, Balti-tenger, Finnország
	2 kutya	1990	Banter See, Németország
	halak	1992	Fekete-tenger, öböl, Paliastomi, Grúzia
	szarvasmarha, juh	1993-1994	Malmesbury, Dél-Afrika
	kutya	1994	Zeekoevlei, Cape Town Dél-Afrika
	hal	1997	Fekete-tenger, öböl, Paliastomi, Grúzia
	24 szarvasmarha	1997	Burlington, Colorado, USA
	2 kutya	1997	Finn-öböl, Finnország
	halak, békák, csirke, kacs, pulyka és marha	1956-1958	Waco, Texas, USA
	3 tehén	1978	Cheshire, Anglia
<i>Planktothrix agardhii</i>	halak	1982	Vesijarvi Lahti, Finnország
	vízimadarak, halak, pészmapöckök	1984	Aland, Finnország
	6 borjú	1994	Soulseat Loch, Skócia
	2 borjú	1995	Soulseat Loch, Skócia
<i>Planktothrix (Oscillatoria sp.)</i>	4 kutya	1990-1991	Loch Insh, Skócia
	kutya	1992	Skócia
	kutya	1992-1994	Caragh tó, County Kerry Írország
	290 tehén	1996	Kareedouw District, Dél-Afrika
	18 kecske	1996	Alldays, Dél-Afrika
<i>Planktothrix sp.</i>	halak	1997	Varese, Olaszország

Direkt expozícióról akkor beszélhetünk, ha a mérgező sejtek vagy azok toxinjai közvetlenül hatnak a szervezetre például táplálkozás vagy folyadék utánpótlás során. Ebben az esetben érdemes külön foglalkozni az intakt és a lizált sejtekkel, sejttömeggel. Az intakt sejtek direkt expozíciója kapcsán egyes fajoknál az intracelluláris, elsősorban a sejteken belül megjelenő toxinok játszanak kulcsfontosságú szerepet (pl. cianobaktériumok), míg más fajoknál kifejezetten aktív tevékenységgel a környezetbe kibocsájtott mérgező anyagok a jelentősek (pl. *Prymnesium parvum*). Egy másik esetben a direkt, elsősorban anatómiai jellegekhez köthető mechanikai behatásnak köszönhető a bekövetkező hatás (pl. kovaalgák; Landsberg, 2002). A lizált algatömeg minden esetben egy más típusú terhelést is jelent a közvetlen környezet számára, hiszen nem csupán a vízbe kerülő toxinterheléssel, hanem egy jelentős szervesanyag terheléssel is számolni kell, aminek gyakori velejárói a megváltozott pH viszonyok, anoxia és változatos gyakran patogén mikrobiális tömeg (1. ábra). Az ilyen, gyakran additív módon fellépő jelenségek esetében sokkal gyakoribbak a súlyos következmények, bár nehezen tisztázható a toxinok pontos szerepe a mérgezésekben (Hallegraef, 2003).

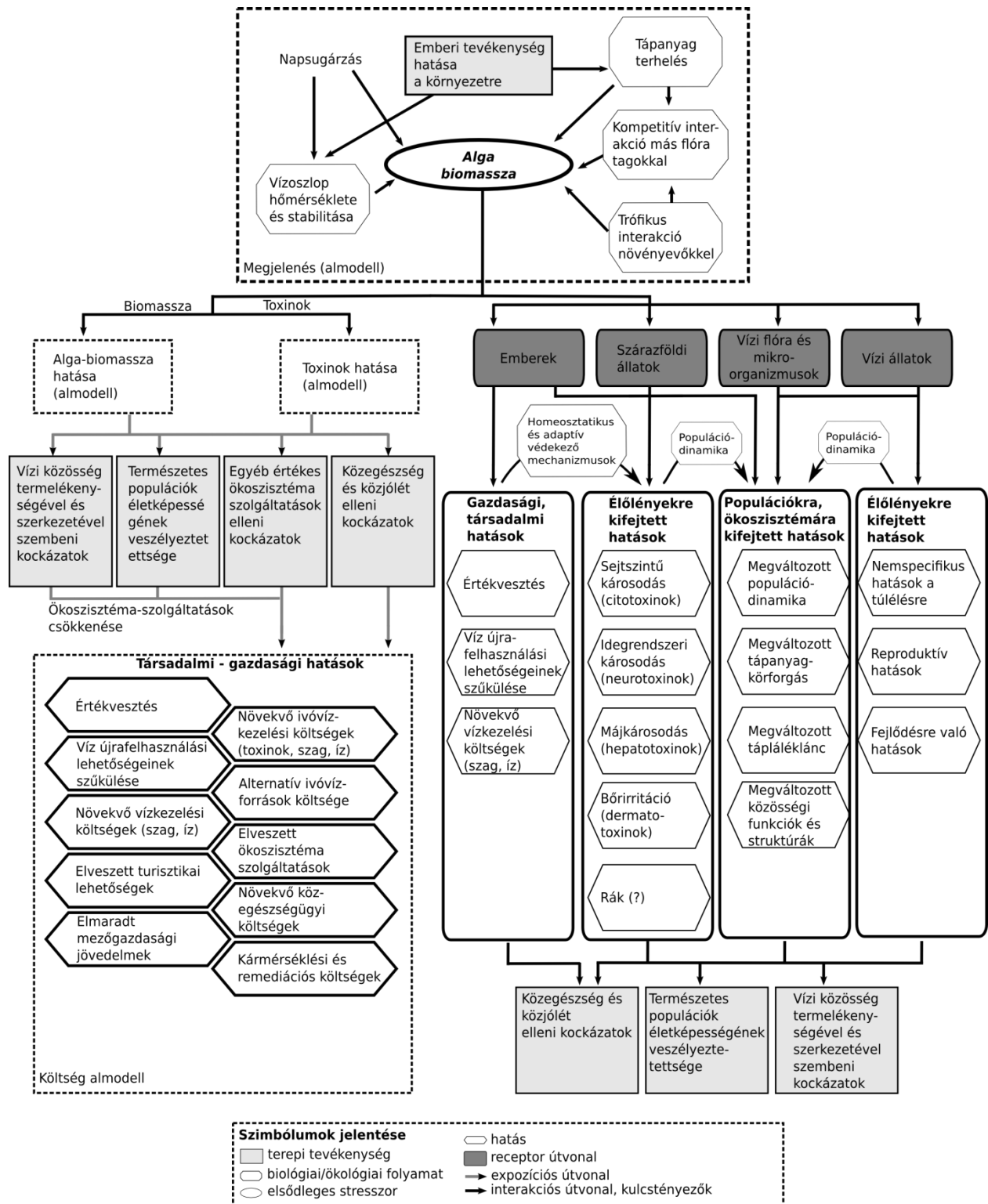
Közvetett expozícióról akkor beszélünk, ha az akkumuláció vagy biomagnifikáció révén egyes élőlénycsoportok az algák által termelt mérgező anyagcseretermékekből elegendő mennyiséget halmoznak fel ahhoz, hogy az őket elfogyasztott (és ezáltal az algatoxinnal kapcsolatba került) élő szervezetre káros hatást legyen képes kifejteni. Ez elsősorban azokra a perzisztens, kifejezetten ellenálló toxinmolekulákra jellemző, amelyek gyakran hő és savállóak, a fogyasztó szervezetben sem degradálódnak. Az algatoxinok jelentős része ilyen stabilnak mondható, beleértve számos cianobakteriális, páncélosalga- és kovaalga toxint is. A közvetett expozíció talán a legérdekesebb esete, amikor az alga által termelt toxinprekursor (előanyag) egy fogyasztó szervezetébe kerül és annak biológiai aktivitása, enzimatis tevékenysége révén válik valójában mérgező anyaggá és halmozódik fel úgy, hogy a ragadozó vagy csúcsragadozó számára mérgezővé válik. A közvetett expozíció jelensége kapcsán nagyon beszédes számos algatoxin mérgezési típus (melyeket az előzőekben már ismertettünk), hiszen ahogyan a nevükben is benne van kagylón (esetleg más vízi gerinctelenen) vagy halszervezeteken keresztül fejtik ki hatásaikat (Hallegraef, 2003).

Az algatoxinok leglátványosabb esetei azok a viszonylag gyors időbeli lefutással rendelkező végzetes mérgezések, amelyek elhullott állati tetemek tömegét hagyják maguk után, nagyon gyakran az algavirágzással egyidejűleg. Az ilyen jellegű mérgezésekhez olyan feltételek kellenek, mint az algavirágzásban kellő számban megjelenő toxintermelő kemotípusok, azok toxintermelésének kellő intenzitása és az algavirágzást okozó faj kritikus sejttömege (Dolah et al., 2001). Ezen feltételek érvényesülésén túl a mérgezés jellegében döntő lehet az, hogy pontosan milyen toxin(ok) termeléséről van szó. Az akut hatások elsősorban a neurotoxikus hatással bíró algatoxinokra jellemzők. Az ilyen toxinok gyakran olyan elemi idegi jelenségeket befolyásolnak, aminek eredményeként az életfunkciók megszűnése hamar bekövetkezik. Vagy olyan toxinok esetében, amelyek kifejezetten élőlénycsoport-specifikusak, mint pl. az ichtiotoxikus primnezinek. Viszonylag gyors és jelentős mortalitással bírhat más egyéb toxin (pl. a mikrocisztinek) is, amikor a mérgező anyagcseretermék hatása más terhelő faktorok (pl. alacsony oxigénszint) mellett fejtik ki hatásukat. Ilyenkor hosszabb időbeni lefutással ható toxinok esetében is számolhatunk

viszonylag rövid idő alatt bekövetkező mortalitással (Francis, 1878; Carmichael, 1993; Jonasson et al., 2010).

Alapvető tévedés és helytelen megközelítés az, amikor egy algavirágzás kapcsán, a jelenséggel párhuzamosan bekövetkező rosszullétek, elhullások, elhalálások elmaradásával kijelentjük azt, hogy az adott algavirágzás nem mérgező. Számos esetben a toxin koncentrációjától, felszívódásától függ, de leginkább annak hatásmechanizmusára vezethető vissza annak krónikus hatása. A hepatotoxikus hatással bíró mikrocisztinek esetében a mérgezés hatása lassabban következik be, mint ahogy a tengerekre jellemző okadainsav esetében is jellemző ugyanez. A mikrocisztinek, nodularinok, okadainsav, dinophysistoxin-1, apliziatoxinok, lingbiatoxin tumor promotereknek tekinthetők, daganatkeltők. Több esetben is leírtak tömeges elhullást számos vízi élőlénycsoport esetében a vízvirágzás lecsengése utáni időszakban, amikor jellemző toxinhatásokat azonosítottak az elhullott élőlényekben (Dolah, 2000). Az algatoxinok krónikus hatásának vizsgálata az elmúlt évek egyik fontos fókuszterülete, hiszen a mortalitás elmaradása mellett gyakran figyelnek meg napjainkban is komoly sejt-, illetve szövettani szintű elváltozásokat, viselkedési és élettani zavarokat, megváltozott immunrendszer működést, reprodukciós zavarokat, csökkent növekedést vagy hozamot a tápláléklánc legkülönbözőbb szintjein (Sellner, 2003). Az ilyen jellegű elváltozások erőteljesen befolyásolhatják az adott vízi élőlényközösséget, táplálkozási kapcsolataikat és válaszukat különböző környezeti feltételekre.

Bár az ilyen krónikus hatások vizsgálata nehezen kivitelezhető, terepi és a laboratóriumi vizsgálatok összehangolásával és megfelelő értelmezésével egyértelműen igazolhatóak (Hallegraef, 1993; 2003). A toxikus algavirágzás kapcsán kijelenthetjük, hogy a jelenség napjainkra ismertté vált minden óceánon és tengeren, valamint minden kontinensen figyeltek már meg (beleértve az arktikus területeket is) ilyen jellegű jelenséget számos sós, fűsós és édesvízi ökoszisztémában. Mivel obligát és fakultatív fototróf élőlényekről beszélünk így evidens, hogy a jelenség többé-kevésbé fénynek kitett felszíni vízterekre vonatkozik. A mérgezéses esetek kapcsán értelemszerűen az emberi elhalálások és megbetegedések kapják a legnagyobb tudományos és hétköznapi visszhangot. Számos ilyen jellegű esetet ismerünk tengeri algatoxinok és édesvízi toxinok kapcsán egyaránt (Dolah et al., 2001; Sellner, 2003). A legtöbb mérgezéses esetet az állatvilágból a halak, madarak kapcsán írtak le, de mindenképpen figyelembe kell vennünk, hogy elsősorban az ember számára gazdaságilag jelentős élőlénycsoportok kerülnek jobban a figyelem középpontjába, ahogyan nagy publicitást kapott számos háziállat (kutya, macska) elhullása is. A puhatestűek esetében a legjelentősebb az algatoxinokkal szembeni rezisztencia, mégis szép számmal írtak le elhullásokat ebből az élőlénycsoportból is (Landsberg, 2002).



4. ábra. Mérgező algavirágzások komplex hatása az élővilágra és a társadalomra.

3. A *Prymnesium parvum* toxintermelése

3.1. Az „aranyalga”, *Prymnesium parvum*

A *Prymnesium parvum* a Haptophyceae osztályon belül a Prymnesiales rendbe, ezen belül a Prymnesiaceae családba és a *Prymnesium* genuszba tartozik. Két ostorral rendelkezik, melyek egyforma hosszúságúak és ezek segítségével mozog a vízben. Az ostorok 9 + 2 mikrotubulus szerkezetűek, a sejt csúcsi részén helyezkednek el (Prescott, 1969). Ezen kívül rendelkezik még egy merev, szőrszerű struktúrával, a haptonémával is. A haptonéma segítségével tud megtapadni különböző felületeken (pl. a halak kopoltyúin is) és egyes elképzelések szerint a táplálék megragadását is szolgálja. A haptonéma a két ostor mellett helyezkedik el és rövidebb az ostoroknál (Larsen et al., 1998). A haptonéma 6 vagy 7 mikrotubulusból épül fel. A mikrotubulusok és az ostor felszíne között endoplazmatikus retikulum található. Az alga két kloroplasztisszal rendelkezik, melyek C-alakban helyezkednek el és nagyrészt kitöltik a sejtet. A plasztisz sárga vagy sárgásbarna színű, mert az akcesszorikus pigmentek (fikoxantin, diadinoxantin, diatoxantin, β -karotin) elfedik a klorofill-a zöld színét. Szintestjeiket periplasztidiális endoplazmatikus retikulum vonja be, tilakodjaik hármásával alkotnak gránumokat. A sejtmag nem látható mikroszkópban, csak festéssel tehető láthatóvá. A sejt felszínét a Golgi-vezikulumokban képződött pikkelyek vagy csomók (kokkolitok) borítják, melyek cellulóz és mész tartalmúak. A Golgi készülék ciszternái az ostor alapi részén és a sejtmag között vannak (Graneli, 2012).

A *Prymnesium parvum* pigmentjeinek analízisekor megállapították, hogy a növekedési stádiumoknak megfelelően a különböző pigmentek aránya változik. Tartalék tápanyagaik a poliszacharid krizolaminarin, valamint olaj vagy paramilon. A tartalék tápanyagok a szintesten kívül, a vakuólumokban találhatóak meg. Gyakran gömb alakú formákat lehet látni a sejtben, ugyanis képes bekebelezni és megemészteni más algákat és baktériumokat a mixotróf anyagcserét folytató élőlény. A szervezet erősen euryterm és euryhalin, illetve általánosságban elmondható, hogy a magas vezetőképességű vizeket kedveli (Larsen et al., 1997; Johansson et al., 1999; Holdway et al., 1978). Vízvirágzásokat idéz elő, a fejlődéséhez B₁₂ és B₁ vitamint igényel. A *Prymnesium parvum* virágzásakor jellemző a víz aranybarna elszíneződése, amit az alga jellegzetes 2-3 sárga plasztisza okoz. A szakirodalom „golden alga”, magyarul aranyalga névvel illeti (Larsen et al., 1998).

Az egysejtű algák sokféle állat számára szolgálnak táplálékkul. A *Prymnesium* populációnak lehet ragadozója, például olyan egysejtű ostoros, mint az *Oxyrrhis marina*. Amikor a *Prymnesium parvum* elkezd toxint termelni, ez a helyzet megfordul. A *Prymnesium parvum* által termelt mérge megtámadja más egysejtűek sejtmembránját, ezáltal először mozgásképtelenné válik a sejt, majd teljesen felbomlik. A *Prymnesium* fajok mixotróf élőlények, az életfeltételeikhez szükséges megfelelő energiát a napfényből, és a táplálékukból nyerik, stratégiájuk dupla haszonnal jár (Tilman, 1998). Amennyiben a környezeti feltételek nem megfelelőek, akkor az alga elkezd toxint termelni (Tilman, 2003). Különböző paramétereket, a víz hőmérsékletét, sótartalmát, a fényviszonyokat és ezzel összefüggésben a *Prymnesium parvum* toxicitását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a különböző helyről származó szervezetek toxintermelése eltérő mértékű (Graneli, 2012).

gazdag régióinál kötődik, így növeli a permeabilitást. A véráramba jutva ugyanezzel a mechanizmussal a vörösvértestek lízisét idézi elő (Tomas, 2002).

Dafni és munkatársai (1972) leírták, hogy a toxicitás nő a foszfortartalom csökkenésével. Paster (1973) szintén toxikusabbnak vélte a *Prymnesium parvum*-ot foszfátszegény környezetben. Johansson és Garnéli hasonló jelenséget tapasztalt a nitrogénnel kapcsolatban is. A foszfátlimitált környezetben a toxinmennyiség (ichthyotoxin, hemolisin és citotoxin) tíz-, hússzorosára is növekedhet (Shilo és Sarig, 1989). Nygaard és Tobiesen (1993) lejegyezték, hogy a *Prymnesium parvum* elfogyasztja a baktériumokat foszfátlimitált környezetben, ebből adódóan arra a következtetésre jutottak, hogy sokféle baktériumot hasznosít, amikor a tápanyagok korlátozottak. Felvetették, hogy ezeknek a baktériumoknak a jelenléte csökkentheti a toxicitást.

A különböző lipidjellegű vegyületek és a magas pH inaktíválhatja a hemolitikus hatást. A lipidek (lecitin, koleszterin, kefalin) esetében feltételezhető, hogy kompetíciót folytatnak a membránon található aktív helyekért. Az ichthyotoxin bejuthat a halak testébe a vízből a bőrön keresztül vagy a kopoltyún át és az algát elfogyasztva felhalmozódhat a toxin a halak testében. Minimum háromféle ichthyotoxint tartalmaz a *Prymnesium parvum*. Glass és munkatársai (1991) szerint a 6 alatti és a 9 feletti pH inaktíválja a toxint. Azt is megállapították, hogy a NaCl koncentráció növelése, csökkenti a toxicitást, valószínűleg úgy, hogy kicserél egy kofaktort (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ami szükséges a toxin aktiválásához. Azt is megállapították, hogy laboratóriumi kísérletek során az UV vagy az erős látható fény elpusztítja a *Prymnesium*-ot. Reich és Parnas (1962) azt tapasztalták, hogy állandó megvilágításnál a tenyészet nem mutat ichthyotoksikus hatást, viszont amikor megváltoztatták a megvilágítási periódust (8 órára sötétbe helyezték a tenyészetet), akkor nagy mennyiségű toxint detektáltak. Shilo és Aschner (1953) rájött, hogy az oxigén és a levegő csökkenti a toxicitást, amikor átbuborékolatják a toxinos oldatot. Arra is rájöttek, hogy a kálium-permanganát és a nátrium-hipoklorit szintén semlegesíti a mérgeket. Továbbá lejegyezték azt is, hogy az abszorbensek, mint például a kaolin, aktív szén, kalcium-szulfát, tavi üledékek is detoxifikálják a *Prymnesium parvum* tenyészeteket.

Moshe Shilo és Miriam Shilo (1953) leírták, hogy az ammónium-szulfátnak litikus hatása van a *Prymnesium parvum*-ra. A litikus aktivitás 2-30 °C és pH 6,5-9,5 között működik, a hőmérséklet és a pH emelésével, egyre fokozottabb az aktivitás, viszont drámaian lecsökken, ha a hőmérséklet 10 °C alá süllyed. Rámutattak arra is, hogy a szabad ammónia és nem az ammónium ionok felelősek a lízisért. Oltatlan mész (CaO) hozzáadása csökkenti a lízishez szükséges ammónia vagy ammónium-szulfát mennyiségét.

3.3. *Prymnesium parvum* által okozott algavirágzások

Míg az édesvízi vízvirágzásokban főként a cianobaktériumok dominánsak - amelyek sejtjeiből a mérgező anyagcseretermék vagy anyagcseretermékek (cianotoxin(ok)) a természetes felszíni vizekbe kerülhetnek (Collins, 1978; Keating, 1977) - addig az eukarióta algák okozta mérgezések főként sósvízi fajokhoz köthetőek, és elsősorban a dinoflagelláták közül kerülnek ki azok a szervezetek, amelyek tömeges elszaporodása közegészségügyi, gazdasági és természetvédelmi problémát okoz. Édesvízi fajokról is vannak ilyen jellegű

ismereteink, bár jóval kisebb számban (Collins, 1978; Shilo, 1967; 1971). Ilyen szervezetek közé tartozik a *Prymnesium parvum*, amely főként édes- és brakkvizekben idézett elő tömeges megjelenésével vízvirágzást és a mérgező anyagcseretermékei által hatalmas halpusztulásokat okozott a világ több országában (Edvardsen et al., 1988; Holmquist et al., 1993;).

Prymnesium algavirágzás során a víz arany-, vagy sárgásbarna színűvé válik, habzás akkor fordul elő, amikor a víz hullámozik. 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 úszkálnak a part közelében. A Texasi Egészségügyi Szolgálat megállapította, hogy a *Prymnesium parvum* nem okoz emberi egészségügyi problémákat, de azért a mérgezéses tüneteket produkáló halak fogyasztását nem ajánlják. Emlősöket, madarakat figyeltek meg, ahogy esznek az elhullott halakból és isznak a toxikus vizekből és semmiféle káros hatást nem detektáltak, de komplikációk, másodlagos fertőzések és más hatások előfordultak. A *Prymnesium parvum*-ot Európában Otterstroem és munkatársai (1939) jelentették először, tömeges halpusztulást okozott. E szervezetet az első, Dánia és Hollandia brakkvizeiben bekövetkezett súlyos halpusztulások okozójaként azonosították (McLaughlin, 1958; Shilo és Aschner, 1953). Az elmúlt évtizedekben több, a *Prymnesium parvum*-mal kapcsolatba hozható nagymértékű halpusztulás történt, melyek pénzügyi és környezeti veszteségeket okoztak Texas állam számára. Az aranyalgát az 1930-as évek óta világszerte ilyen események okozójának tekintik (Reichenbach-Klinke, 1973). A feljegyzések szerint csukák, sügerek, bodorkák, angolnák, keszegek és compók ezrei pusztultak el 1938-ban a Jütland partjaihoz közeli Ketting Noratóban és 1939-ben a Sjalland-sziget egyik félszigetén található Selso-tóban (Reichenbach-Klinke, 1973). Az alga 1947-ben tűnt fel először izraeli pontyos tavakban és nagyon gyorsan terjedt szét az ország vizeiben. Azóta hatalmas károkat okozott a haltenyésztőknek és pillanatnyilag az egyik legkomolyabb probléma a haltenyésztés szempontjából Izraelben (Shilo és Shilo, 1953). A *Prymnesium parvum*-ot tekintik Palesztinában és Skócia, Németország, Spanyolország, Bulgária valamint Dél-Afrika tavaiban bekövetkezett halpusztulások egyik fő okozójának.

Bales és munkatársai (1993) megjegyzik, hogy többszörös halpusztulás jól dokumentált eseteit jegyezték fel a Thurne folyó vízgyűjtőrendszerében (Norfolk Broads, Anglia), amelyek 1969-ben kezdődtek és 1975-ig tartottak, közben az esetek súlyossága csökkent. Beszámolójuk alapján jelentős elhullás következett be 1969. augusztus közepén a Horsey Mere és a Hickling Broad tavakban, szeptember elején a Heigham Sound és Candle Dyke tavakban, valamint a Thurne folyóban, majd egy következő súlyos halpusztulás történt 1970 áprilisában, két kisebb halpusztulás kíséretében 1973-ban és 1975-ben. A szerzők véleménye szerint a *P. parvum* virágzást elősegítette a közelben hatalmas kolóniákban fészkelő feketefejű sirályoktól származó guano. Megjegyezték, hogy a guanofelhalmozódás vezethetett a *P. parvum* tömeges megjelenéséhez, mert ez ásványianyag-forrást jelentett az algák számára, és a sirályok számának csökkenését a *P. parvum* algák számának csökkenése követte. Népi feljegyzések szerint barna színű vízzel (melynek lehetséges okozója a *P. parvum*) kísért halpusztulások történtek 1894-ben, 1911-ben, 1914-ben, 1925-ben (ez az 1969-essel összehasonlítható mértékű volt), 1934-ben, 1954-ben, 1966-ban és 1967-ben

ugyanezen a területen. 1989 júliusában és augusztusában atlanti lazacok és szivárványos pisztrángok pusztultak el a Sandsfjord-rendszer (Délnyugat-Norvégia) halneveldeiben, de kisebb mértékben érintette a pusztulás a fjordrendszer brakkvizeiben szabadon élő halállományt is. 1989 és 1996 között kevert, *P. parvum*-ot is tartalmazó algavirágzások fordultak elő minden nyáron a Sandsfjord-rendszerben. Hallegraeff (1992) megjegyzi, hogy az 1970-es évek óta *P. parvum* virágzással kapcsolatba hozható visszatérő halpusztulásokat jegyezték fel az ausztráliai Vasse-Wonnerup torkolatban, leggyakrabban január és március hónapok közt. A szerző felhívja a figyelmet arra, hogy ezen esetben is, hasonlóan a Sandsfjord-rendszerben történetekhez, a természetben élő halak kevésbé voltak kitéve a *P. parvum* toxinjainak, mint a zárt helyen nevelt halak, egyszerűen azért, mert el tudtak úszni a mérgezésben érintett területekről. A marokkói Oued Mellah víztározóban 1998 novemberében és decemberében, valamint 1999 szeptemberében és októberében következtek be halpusztulások. Visszatérő, a *P. parvum*-mal kapcsolatba hozható halpusztulásokat jelentenek 1963 óta Kínából is.

1982 októberében a Brazos folyó medencéjében található Kalifornia Creekben körülbelül 2 300 hal pusztult el, a halpusztulással a *P. parvum*ot gyanúsítják. Az első, a *P. parvum*hoz kapcsolódó megerősített halpusztulás 1985 októberében és novemberében történt a Pecos folyón, ahol 110 000 hal pusztult el a Pecos megyei Iraan és az Independence Creek torkolata közti szakaszon. További halpusztulások történtek 1986 novembere és decembere közt, amikor 500 000 hal pusztult el ugyanezen a szakaszon. 1988 novemberében és decemberében összesen több mint másfél millió hal pusztult el a Pecos folyón az Új Mexikóbeli Malagától lefelé a Pecos megyei Imperial városig nyúló szakaszon és az Iraan és Sheffield közti szakaszon. James és De La Cruz (1989) megjegyzi, hogy az 1986-os Pecos folyóbeli halpusztulás során 150 millió/l algasejt koncentrációt is feljegyeztek. A halpusztulás a területen jelenlévő minden halfajt érintett. Szintén hátrányosan érintette a halpusztulás az *Unionidae* családba tartozó kagylókat és a *Corbicula fluminea* kagylófajt is. A szerzők leírták, hogy ez a faj a Pecos folyóban korábban nagyon gyakori volt, négyzetlábanként 100 is élt a folyóban, viszont az 1985-ös halpusztulás óta egy élő példányt sem figyeltek meg.

A nagyszámú felsorolt 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.

Hazai vonatkozásait is említhetjük a fajnak, hiszen Kiss István algológiai kutatásai során több alkalommal is beszámolt a faj megjelenéséről és tömeges elszaporodásáról a Szeged környéki szikesekről. A faj további megjelenéseiről és azok kapcsán egyes halfajok elhullásáról is vannak ismereteink az ország több pontjáról is (Woynarovich Elek, Vörös Lajos szóbeli közlései).

3.4. Proteázok

A sejtekben folyó átalakulási folyamatok kiindulási és végtermékei rendkívül sokfélék, így a katalizáló enzimeknek is igen sokféle feladatnak kell megfelelniük, következésképpen az enzimek igen változatos felépítésű fehérjék. A növényi proteázok által

katalizált fehérje lebontásnak, proteolízisnek azon túl, hogy hozzáférhetővé teszi az aminosavakat új szintézisek számára, még számos fiziológiai jelentősége lehet. Ezek közül a hibás fehérjék lebontása az egyik legfontosabb, mert így segíti a sejt belső egyensúlyának fenntartását és a megfelelő stresszválaszok létrejöttét. Proteázok katalizálják a proenzimek és a peptid-típusú hormonok molekuláinak megfelelő hasítását és ezek érési folyamatait. Felelősek még az anyagcsere, a homeosztázis és a fejlődés kontrolljáért a kulcsenzimek és szabályozó fehérjék mennyiségének csökkentésével és a speciális növényi szervek és sejtek programozott halálában (apoptózis) is szerepet játszanak. Mindezekon túl a növényi proteázok egyik alapvető jelentősége a fehérjeraktárak (magvak, raktározásra módosult szervek tápszövelei) mobilizálásában rejlik. Lehetséges biotechnológiai alkalmazásuk, például olyan kísérletekben, amelyek a gabonanövények fehérjetartalmának módosításával azok tökéletesítésére irányulnak (Vierstra, 1996).

Működésüket tekintve a proteázok két fő osztályba sorolhatók: a polipeptid lánc belsejében lévő peptidkötéseket specifikusan bontó endopeptidázokra (proteázokra, EP) és a polipeptidlánc végeiről egy-egy aminosavat lehasító aspecifikus exopeptidázokra (peptidázok). Az endopeptidázok hasítás után megmaradó oligopeptideket tovább bontó exopeptidázok aszerint, hogy N- vagy C-terminálison hasítanak, lehetnek aminopeptidázok vagy karboxipeptidázok. Ezek nem élesen elkülönülő csoportok, ezért más enzimektől eltérően az enzim szubsztrátján, illetve termékén alapuló csoportosítás mellett, az enzimek aktív centrumának felépítésére, az enzim működéséhez nélkülözhetetlen komponensekre utaló csoportosítás is jellemző. Ezek alapján a növényi proteázok körében beszélhetünk szerin-, cisztein-, aszpartát- és metalloproteázokról. A *peptidázoknak* közös jellemzője, hogy csak olyan peptidek és fehérjék hidrolízisét tudják katalizálni, amelyek a természetben előforduló α -helyzetű aminocsoporttal rendelkező L-aminosavakból épülnek föl. A D-konfigurációjú aminosavak peptidjeire a proteázok hatástalanok.

Míg a prokarióták, kiemelten az *Escherichia coli*, illetve az eukarióta többsejtűek, (gombák, emlősök, hajtásos növények) proteáz enzimeiről sok adat áll rendelkezésünkre (Gottesman és Maurizi, 1992; Vierstra, 1996; Láng, 1998), addig jóval kevesebb ismeretünk van az eukarióta fotoautotróf algák proteáz enzimeiről.

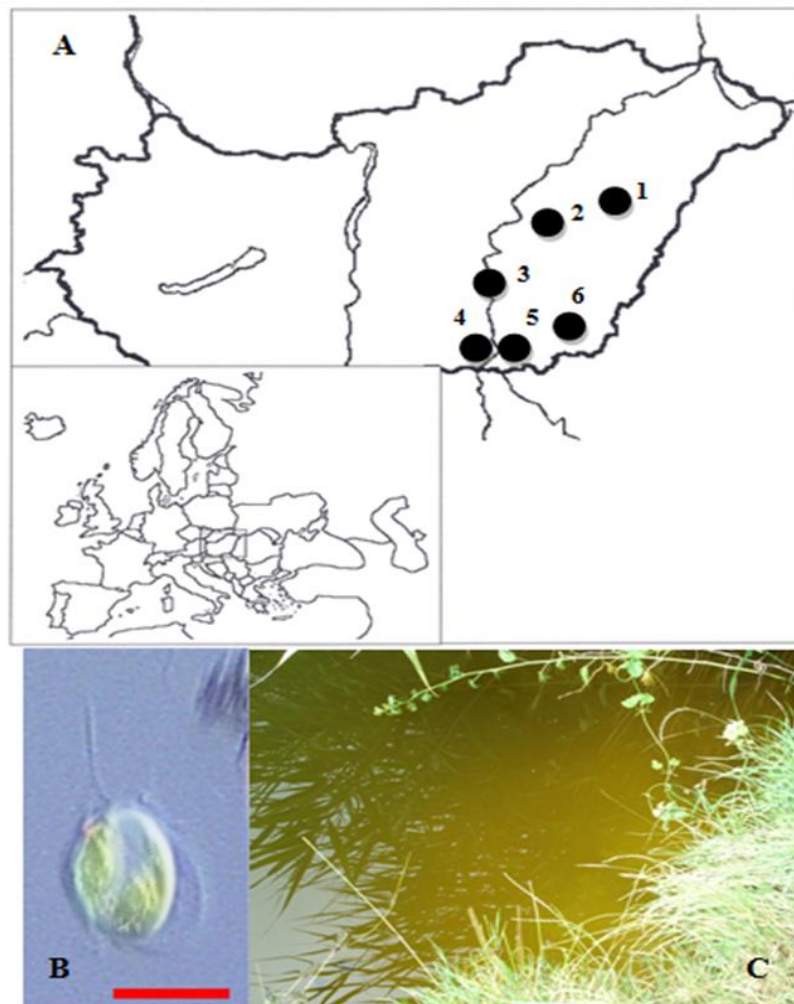
Az élővilágban, elsősorban a heterotróf anyagcserét folytatók esetében a proteázok fontos emésztőfunkciót is betöltenek a táplálék hasznosítása során, de néhány esetben (kígyó, pók és skorpió fajok) a préda elejtésében, mérgezésében is tölthetnek be fontos szerepet.

3.5. A *Prymnesium parvum* hazai előfordulásai, mérgezések és proteolitikus hatások

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. Helybéli horgászok szerint 5-10 évente hirtelen, nagymértékű halpusztulás következik be a tavon, komolyan károsítva a víz halfaunáját. Vízkémiai paraméterek alapján a halpusztulás az oldott oxigén illetve az ammónia tartalom alapján nem volt magyarázható, azonban feltűnő volt a víz magas vezetőképessége (2. Táblázat, Vasas et al., 2007; 2012).

2. táblázat. *P. parvum* virágzással érintett hazai vizek vizsgált változói (Vasas et al., 2012).

	P1 Hajdúszoboszló	P2 Kisújszállás	P3 Szentés	P4 Sándorfalva	P5 Makó	P6 Battonya
<i>P. parvum</i> egyedszám (egyed/ml)	40 000	38 000	700	1 200	800	300
Elpusztult halmennyiség (kg)	2 600	1 500	500	700	300	600
Oldott oxigén-tartalom (mg/l)	7,7	8,2	11,3	6,6	11,2	8,5
pH	8,2	8,8	9,2	8,9	9,1	8,3
Fajlagos vezetőképesség ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	2242	2978	2420	3940	4050	5800
Ammónium koncentráció (mg/l)	0,05	0,04	0,05	0,08	0,06	0,01
Hőmérséklet (°C)	23	28	22	23	22	24
Vízfelület (Ha)	12	4	1,5	1	4	2



6. ábra. Halpusztulással járó *Prymnesium parvum* algavirágzások, magyarországi vizekben (A) 1: Téglaágyári Öregtó (Hajdúszoboszló, 2005), 2: Halastó (Kisújszállás, 2009), 3: Pankota tó (Szentés), 4: Kovács tó (Sándorfalva, 1996), 5: Téglaágyári 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 aranysárga színe az Öregtávon (Hajdúszoboszló, 2005) (C; Vasas et al., 2012).

Ezzel párhuzamosan a tó vize jellegzetes aransárga elszíneződést mutatott (6. 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. Víztöxicológiai tesztek segítségével megállapítható volt, hogy a vízből származó minta erősen mérgező. A haltestt expozíció ideje ugyan 96 óra, de a víz eredeti töménységében már 10 perc elteltével 100%-os mortalitást okozott, és csupán 11 szerez hígítás esetén sikerült LD₅₀ értéket kalkulálnunk. A daphnia-teszt hasonló eredményeket hozott. A csíranövénytesztben erőteljes toxikus hatást nem sikerült kimutatni. A *Prymnesium parvum* toxicitásának megerősítésére beállítottunk egy specifikus tesztet, amely kifejezetten a hemolitikus anyagokat tartalmazó közegek tesztelésére alkalmas. A teszt lényege, hogy hígított fibrinmentes borjúvért kezeltünk vízmintával. Míg a kontroll rendszerben a vörösvértestek a hemoglobin tartalmukkal ülepednek, addig a hemolitikus anyag(ok) hatására a vörösvértestek degradálódnak, szétesnek és a hemoglobin a felülúszóba kerülve nem ülepszik, ezért vörös színűre festi az oldat felülúszóját. Az egyik legismertebb hemolitikus komponenseket tartalmazó anyag a szappangyökér kivonata, amelynél a *Prymnesium parvum* kivonata szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva kb. 500-szor erősebbnek mutatkozott. A hemolitikus tesztet megismételtük szilárd táptalajon, amely borjúvért tartalmazott (későbbiekben véres agar). A véres agarra a *Prymnesium parvum* sejteket tartalmazó vízminta egy-egy részletét, *Prymnesium* sejteket nem tartalmazó vízminta illetve desztillált víz egy-egy részletét cseppentettük fel. A *Prymnesium* sejteket tartalmazó minta esetében a véres-agar felszínén erőteljes „lízis-foltot” figyelhettünk meg, amit a szervezet kivonata a táptalaj komponenseinek kiemésztésével idézett elő (Vasas et al., 2007; 2012).

A Hajdúszoboszlón bekövetkező virágzást követően áttekintettük a régiókban, az elmúlt években történt hasonló eseteket. Az algavirágzások jellemzőit, hatásait a 2. táblázatban foglaltuk össze. 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, 3. 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).

3. 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 enzimei (pH: 8,0; Vasas et al., 2012).

relatív molekula- tömeg (kDa)	<i>Prymnesium</i> <i>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 (3. táblázat).

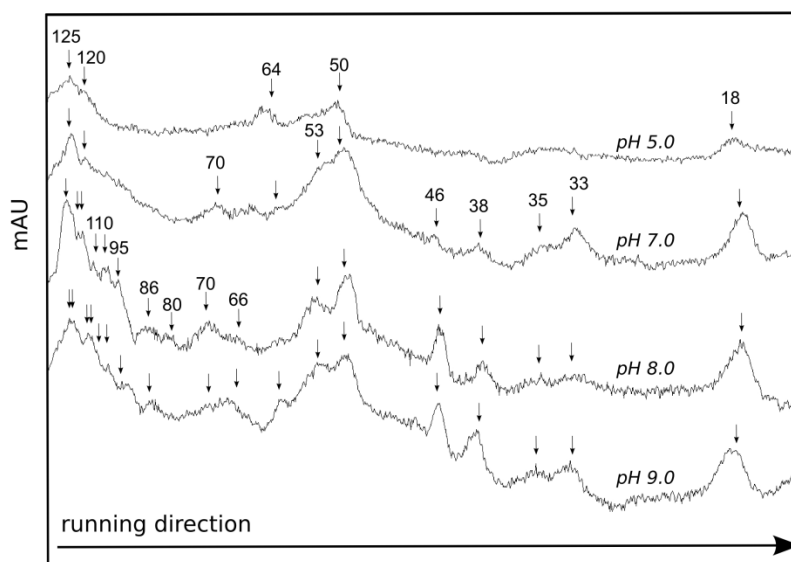
A “P5” jelű (Makó) terepi minta enzimmintázatát részletesebben is megvizsgáltuk, a zselatináz géleket pH 5,0-9,0 pufferekben 5 mM 2-mercaptoethanol jelenlétében, vagy anélkül inkubálva, valamint a pufferekhez specifikus proteáz inhibitorokat adagolva (PMSF, E-64 és EDTA) (4. táblázat), ami bizonyos mértékű karakterizálásukat tette lehetővé. Savas tartományban (pH 5,0) a mintákból (12 µg fehérjetartalom/minta) az 5. napon 5 izoenzim volt detektálható (≥125, 120, 64, 50 és 18 kDa), sokkal kisebb aktivitással, mint semleges (≥ pH 7,0) pH-n. Ha a géleket pH 7,0; 8,0 és 9,0 pufferben inkubáltuk, növekvő számú proteáz vált detektálhatóvá, emelkedő aktivitással (4. táblázat, 7. ábra). Ez a tendencia volt jellemző, ha a “P1” (hajdúszoboszlói) terepi és az UTEX no. 2797 tenyészetek zimogramjainak savas (pH

5,0) és bázikus (pH 8,0) proteáz-mintázatát vetettük össze. A nagy molekulatömegű (≥ 120 kDa) proteázok kazein-bontó aktivitással is rendelkeztek. A proteázok inhibitorokkal szembeni érzékenysége eltérőnek bizonyult (4. táblázat; Vasas et al., 2012).

4. táblázat. A "P5" jelű terepi vízminta (Makó) zselatinbontó proteázainak jellemzői (a zselatingéleket eltérő pH-n, 2-merkaptoetanol (ME), specifikus proteáz inhibitorok (PMSF, E-64 és EDTA) jelenlétében, vagy nélkül inkubáltuk, elemeztük aktivitásukat a szubsztrátként kazeint tartalmazó SDS-poliakrilamid géleken. (2-4) független zimogram eredményeinek elemzése alapján kapott adatok (Vasas et al., 2012).

Relatív molekulatömeg (kDa)	pH: 5,0	pH: 7,0	pH: 8,0	pH: 9,0	néhány poliakrilamid aktivitásgélen megállapítható tulajdonság
≥ 125	+	+	+/++	++	- kazeinbontó aktivitás pH 7,0-9,0 értékeken
120 -115	+	+	++	++	- PMSF gátolta az aktivitását
110 -104			++	++	- PMSF és EDTA gátolta, de a Zn^{2+} nem növelte az aktivitását
95			+	+	- E-64 gátolta
86			+	+	
80			+		
70		+	+	+	
66			+	+	
64	+	+		+	
53-50	+	++	++	++	- ME jelenlétében a kettős sáv méginkább jellemző
46		+	+	+	- PMSF, E-64, EDTA és a ME gátolta
38		+	+	+	- EDTA gátolta, a ME hiánya (nem redukáló körülmények) növelte aktivitását
35		+	+	+	
33		+	+	+	
18	+	+	+	+	

* ++: *dupla sáv*, +: *alacsony* és **+**: *magas aktivitás*



7. ábra. A „P5” jelű terepi minta zselatin zimogramjainak denzitometriai értékelése. A denzitogramokon jól látható, hogy a 12-12 µg összfehérje tartalmú mintákból az inkubáló puffer pH értékétől függően különböző számú és aktivitású proteáz detektálható. A savas proteázok száma 5, míg semleges és bázikus tartományban legalább 17-18 proteáz működése detektálható, általában emelkedő aktivitással (Vasas et al., 2012).

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

Az 1930-as évektől ismertek *P. parvum* okozta, halpusztulásokat okozó vízvirágzások szerte a világon (Reichenbach-Klinke, 1973), amelyeket a víz jellegzetes elszíneződése kísér az arany-sárgától a világos barnáig. Európában, Dániában és Hollandiában az 1920-as és 1930-as években, Izraelben az 1900-as évek közepétől mostanáig észleltek és észlelnek *P. parvum* vízvirágzásokat, de vannak adatok skóciai, németországi, spanyolországi, bulgáriai, dél-afrikai tömegprodukcióiról is, minden esetben tömeges halpusztulásokat okozva (Dietrich és Hesse, 1990; Linam et al., 1991; Reichenbach-Klinke, 1973). Ez a *Haptophyta* szervezet az 1980-as évektől délnyugat-amerikai brakkvizekben is rendszeresen okoz vízvirágzásokat és halpusztulásokat (Manning és Claire, 2010). Munkánk során hat magyarországi, tömeges halpusztulásokkal kísért *P. parvum* okozta vízvirágzást követtünk nyomon, ebből két helyszínről gyűjtött vízminta (P1 és P5) proteáz enzimintázatát is elemeztük. A vízvirágzásokkor mérhető alacsony oldott oxigén koncentráció, és a magas ammónium koncentráció a magas pH értékkel párosulva, önmagában is kedvezőtlen körülményeket teremt a halak számára. A vízmintánkban (P1) azonban a *P. parvum* egyedszám elérte a 4 millió egyed/liter értéket élénksárgára színezve a vizet. 2600 kilogrammnyi hal pusztult el, olyan fajok, amelyek jól reprezentálták a magyarországi tavakra jellemző halfauna összetételét. A tetemek kopolyúja vérzett, és egyéb helyeken is vörös, bevérzéses foltok látszottak rajtuk. A túlélőkön meg lehetett figyelni a *P. parvum* vízvirágzásokkor leírt tünetegyüttest (stresszelt állapot, lassú, koordinálatlan mozgás, a halak a vízfelszínhez közel úsznak és légzési problémákra utalóan „pipálnak”, stb.). Mindezek arra utaltak, hogy a toxikus vegyületek termelésére képes *P. parvum* tömegprodukciója okozhatta a halak pusztulását. Ismert, hogy ezek a toxinok elsősorban a kopolyúval lélegzőekre hatnak, fő

támadási helyük a kopoltyúk epithél sejtjei, amelyek elveszítik szelektív permeabilitásukat és ezáltal a szervezet védtelenné válik a toxikus vegyületekkel (pl. citotoxikus, hemolitikus hatásúakkal) szemben, így azok bejutva az egykörös véráramba hamar kifejtik hatásukat (Shilo 1967). Az ichtiotoxikus vegyületek például a háti aortán keresztül közvetlenül az idegrendszerbe jutnak (Manning és Claire, 2010). Az elvégzett ökotoxikológiai tesztek közül az állati tesztrendszerekben, mind a guppi (*Poecilia reticulata*), mind a *Daphnia magna* tesztekben a *P. parvum* tartalmú higítatlan vízminták mérgezőnek bizonyultak, ami azért is fontos adat, mert ezek a planktonszervezetek a halak fő táplálékaiként a tápláléklánc fontos tagjai. A legérzékenyebb guppik mortalitása már 20 perc után 100%-os volt. Ugyanakkor a mustár csíranövények nem voltak érzékenyek a *P. parvum* toxinjaira. Feltételezhető, hogy a sejtfal valahogy meggátolja, hogy a toxinok eljussanak a sejtmembránig (Vasas et al., 2012).

A mérgező hatásért felelős konkrét vegyület meghatározása azért nehéz, mert a *P. parvum* toxikus vegyületek elegyét (benne: proteolipidek, lipopoliszacharidok, galaktoglicerolipidek /ún. hemolizin/ és polién-poliéterek /ún. primnezinek/) bocsátja ki a környezetébe széles spektrumú toxicitást kiváltva. Igarashi és munkatársai. (1999) tisztázták a *P. parvum* két glikozidokhoz tartozó toxinjának a szerkezetét és elnevezték “primnezin-1” és “primnezin-2” molekuláknak, melyek közel azonos biológiai hatással bírnak; mindkettő hemolitikus aktivitása meghaladja a növényi szaponin (mint Merck egység) aktivitását és ichtiotoxikusak is. A módosított poliakrilamid-gélelektroforézis módszerével történt zselatin-/kollagén-bontó képesség bizonyításával párhuzamosan a standard hemolitikus teszttel (Simonsen and Moestrup, 1997) és a klasszikus véres-agar teszttel bizonyítottuk a minták magas hemolitikus aktivitását (Vasas et al., 2012). Az eredmény 346 ± 42.2 SnE/sejt (szaponin-nano-ekvivalens per sejt). Ezzel egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a *P. parvum* vízvirágzásból származó toxikus vízminták hemolitikus aktivitással rendelkeznek, azaz képesek a halak eritrocitáinak (vörös vérsejtjeinek) lízisére. A hemolitikus aktivitás evolúciós előnyeire világíthat rá Johansson és Graneli (1999) vizsgálatainak azon eredménye, amely szerint a N- és P-éheztetett *P. parvum* tenyészeteknek megnőtt a hemolitikus aktivitása (287.7 ± 14.0 és $21\ 256.8 \pm 38.1$ SnE sejt⁻¹) szemben a kontroll, teljes tápoldatban nevelt tenyészetekkel (42.4 ± 3.3 SnE sejt⁻¹). A vízmintáink hemolitikus aktivitása egyértelműen bizonyítást nyert a véres-agar lemezeken. Ismert, hogy a *P. parvum* toxinja fehérjetartalmú, savakkal szemben érzékeny, hővel szemben stabil és nem dializálható (Prescott, 1968). Graneli és munkatársai. (2012) allelokemikáliákként nevezi a más plankton szervezeteket is bénító, elpusztító *P. parvum* által kibocsájtott anyagokat és kiemeli fénnnyel szembeni érzékenységét. (A proteázok fényérzékenyek, Schlereth et al., 2000.) A toxinban lévő hemolizinek 6 komponensre különíthetők, melyek közül a legfontosabb komponens, a “hemolizin I”, maga is keveréke az 1'-O-oktadekatetraenoil-3'-O-(6-O-B-D-galaktopiranozil-B-D galaktopiranozil)-glicerol és az 1'-O-oktadekapentaenoil-3'-O-(6-O-B-D-galaktopiranozil-B-D-galaktopiranozil)-glicerol vegyületeknek (Kozakai et al., 1982). Jelenlegi ismereteink szerint a *P. parvum* toxinjának kémiai és hatásmechanizmus szempontjából is változatos aktív vegyületei proteolipidek (Ulitzer és Shilo, 1966), lipopoliszacharidok (Paster, 1973), galakto-glicerolipidek (Kozakai et al., 1982) és polién-poliéterek (Igarashi et al., 1995).

A kígyómérgek és a trópusi százlábúak hasonlóan hemorrhágiás és hemolitikus aktivitással rendelkező méreganyagai proteázokat tartalmaznak (97-15 kDa illetve 121, 44-15 kDa körüli molekula tömegekkel), amelyekre a nagymértékű zselatinbontó és a kismértékű kazeinbontó aktivitás jellemző (Hasson et al., 2004; Malta et al., 2008). Ezekben a szakirodalmakban a zselatin zimogrammok készítése (SDS-PAGE belepolimerizált zselatinnal, azaz denaturált kollagénnel) úgy szerepelt, mint hatékony és adekvát eljárás a proteolitikus enzimek és a zselatinbontó aktivitás kimutatására, következésképpen alkalmas a mérgek hemorrhágiás aktivitásának a mérésére (Bee et al., 2001; Hasson et al., 2004). A mérgek által kiváltott véralvadási zavarral kísért vérzések a zselatinbontó aktivitással rendelkező proteázok működésének következményei voltak, amelyek metalloproteázoknak és különböző szerin-proteázoknak bizonyultak (számos közülük 2-mercaptoethanol érzékeny volt; Malta et al., 2008). Az általunk azonosított *P. parvum* proteázok (125-18 kDa) szintén nagymértékű zselatinbontó aktivitással rendelkeztek és közöttük kimutattunk EDTA-ra (metalloproteáz inhibitorra) és PMSF-re (szerin-proteáz inhibitorra) érzékenyeket is.

Tillmann (1998, 2003) kísérletekkel bizonyította, hogy a *Prymnesium* toxinja fontos lehet a táplálékszervezet elpusztításában annak bekebelezése előtt. Eredményei alapján feltételezhető, hogy a hemolitikus, citotoxikus anyagok nem a sérült, elpusztult szervezetekből a tápoldatba kiszivárgó komponensek, hanem aktív módon kerülnek kiválasztásra, folyamatosan akkumulálódnak a tápközegben és hozzákötődnek a potenciális prokarióta és eukarióta áldozathoz. A *Prymnesium* ugyanis képes bekebelezni, fagocitálni a különböző méretű partikulumokat, amelyek előfordul, hogy nagyobbak, mint maga a *Prymnesium* sejt. Ezek a partikulumok lehetnek heterotróf protozoák, amőbák vagy dinoflagelláták (pl. *Oxyrrhis marina*), baktériumok is (Tillmann, 1998). Egyre több adat bizonyítja, hogy számos fitoplankton taxon, - köztük vízvirágzást okozó fajok -, valójában mixotróf táplálkozásúak, így képesek ragadozásra, nagyobb részecskék bekebelezésére (Stoecker, 1999), vagy már oldott szerves szén- és nitrogénvegyületek felvételére (Carlsson és Granéli, 1998), azaz fagotrófiára és ozmotrófiára (Granéli et al., 2012). Látható, hogy számos vízvirágzást alkotó faj képes ozmotrófiával a szerves anyagok hasznosítására. Fitoplankton szervezetek sejt felszínéhez kapcsolódva mutattak ki olyan aminosav-oxidázokat, amelyek működése ammónium ionok felszabadulását eredményezi, amelyet a sejtek, mint nitrogen forrást felhasználtak a növekedésükhöz (Palenik és Morel, 1990; Mulholland et al., 1998). A Haptofita *P. parvum* esetében is bizonyítást nyert a sejt felszínen L-aminosav-oxidázok működése, amelyek aminosavakat és primer aminokat oxidálnak, a keletkező NH_4^+ ionok pedig már felvehetők a sejtek számára (Palenik és Morel, 1990). Jóllehet az aminosavak és egyszerűbb peptid természetű komponensek általában viszonylag alacsony koncentrációban fordulnak elő a természetes vizekben, kötött aminosavak az oldott polimerek, kolloidok, és különböző részecskék alkotóiként jelen vannak a vizekben, és feltételezhető, hogy proteázok működése révén szabad aminosavakká válhatnak. A fehérje-/polipeptid lebontó képesség aminosavakká, a makroméretű szerves anyagok (áldozatok) kisebb méretű, bekebelezhető partikulumokká alakításának képessége óriási kompetíciós előnyt jelenthet a planktonikus fagocitózisra képes szervezetek számára. A *P. parvum* által termelt proteázok számára az optimális pH:8-9, ami megegyezik a szakirodalmi adatokkal, miszerint a *P. parvum* toxinja sokkal hatékonyabb magasabb, bázikus pH-n (Granéli et al., 2012). Ezek alapján lehetséges,

hogy a hiányzó láncszem a felvehető ammónium ionokká átalakuló szabad aminosavak és a kötött formában előforduló aminosavak/áldozatokat alkotó fehérjék között az általunk nagy számban kimutatott proteáz enzim(ek). Granéli és munkatársai (2012) levezették, hogy a *P. parvum* kedvezőtlen N és P ellátottság/arány esetén nagy mennyiségben bocsátott ki allokemikáliákat/toxinokat elpusztítva ezzel a velük együtt élő fitoplankton és baktérium fajokat, majd hatékonyan aknázza ki a megmaradt szerves N és P forrásokat. Képesek voltak ugyanakkor az elpusztult szervezetek lízisével azok szerves anyagainak hasznosítására, a termelt toxinmennyiség függvényében fagotrófiával vagy ozmotrófiával.

A szakirodalomra nézve új adatot jelentett a bizonyítottan toxikus, nagymértékű halpusztulást okozó *Prymnesium* vízvirágzások mintáiból és egy *P. parvum* laboratóriumi referencia törzsből (UTEX no. 2797) a magas proteáz enzimaktivitás bizonyítása. Új adat, az hogy zselatin tartalmú proteáz géleken bizonyítást nyert a fehérjebontó enzimek nagy száma, a módszer alkalmasnak bizonyult működésük optimális körülményeinek meghatározására (pl. optimális pH, ionigény). A *P. parvum* sejtextraktumok már alacsony koncentrációban magas enzimaktivitásokkal bírtak. A sejtekben működő proteázok alátámaszthatják a szervezet táplálkozásának mixotróf jellegét. Ugyanakkor ezek az enzimek extracellulárisan is detektálhatók voltak, pH optimumuk egybeesett a vízvirágzaskor mért terepi adatokkal, ami felvetette, hogy hozzájárulhatnak a toxinok mérgezőképességéhez (hemorrágiás, hemolitikus hatásokhoz) vagy/és az áldozatok fehérjéinek lebontásában, bekebelezhetővé tételében játszanak fontos szerepet (Vasas et al., 2012). Ismereteink szerint *P. parvum* szervezetből nagyszámú proteáz enzim működését mi mutattuk ki először. Claire munkája során a *P. parvum* teljes genom-szekvenciáját meghatározta, és azonosított olyan géneket, amelyek proteáz enzimaktivitással rendelkező fehérjéket kódolnak (Claire, 2006). Egy vízminta sokféle szervezet proteáz fehérjéit tartalmazhatja, ezért fontos a terepi minták enzimmintázatainak jó egyezése a referencia szervezet enzimmintázatával. Heterotróf baktériumoknál az exo- és ekto-proteázok működése általános, de a mi vízmintáink mikroszkópos elemzése alacsony baktérium számot, és a *P. parvum* “egyeduralmát”, kíséző algafajok hiányát bizonyította. A tenyészet növekedésével a tápoldatból detektálható proteázok mennyisége is növekedett, de egy enzim kivételével a sejtekben is azonosítható enzimeket detektáltunk. Granéli (2012) is azt tapasztalta, hogy a kibocsájtott toxin/allokemikáliák koncentrációja sokkal magasabb volt a stacioner és öregedő tenyészetekben, mint a növekedés exponenciális fázisában.

A *P. parvum* mintáink jelentős számú (15-20) és különböző molekulatömegű zselatinbontó proteázt tartalmaztak, amelyek a szervezetben betöltött funkciójuk szerint is eltérőek lehetnek. A *P. parvum* ugyanis egy fotoszintézisre képes eukarióta szervezet. Így hasonlóan egy növényi sejthez különböző proteolitikus anyagcsere útvonalak működése feltételezhető a sejtorganellumokban. Például a kloroplasztiszok, mitokondriumok a prokariótákéhoz hasonló proteáz enzimrendszerekkel rendelkezhetnek, míg a citoplazma és a sejtmag fehérjebontó útvonalai más eukarióta szervezetekkel (pl. élesztők, állati és növényi szervezetek) mutathatnak azonosságot (Vierstra, 1996). Ugyanakkor ezek a szervezetek nem csak fotoszintézisre, hanem a fotoszintézis szempontjából kedvezőtlen körülmények között mixotróf táplálkozásra is képesek (Granéli, 2012). A táplálkozásuk kiegészülhet szuszpendált részecskék elfogyasztásával vagy oldott szerves anyagok felvételével (Carlsson et al., 1999;

Stoecker, 1999). A proteázok segítségével a *Haptophyta* szervezetek a szerves partikulumokat (elejtett áldozatokat) képesek kisebb, már fagocitózissal felvehető méretű részecskékké alakítani. Ezen túl a proteázok fontos szerepet töltenek be különböző taxonok (pl. Dinoflagelláták, kigyók) méreganyagainak működésében. 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).

4. Cianobakteriális toxinok kapilláris elektroforézise

4.1. Kihívások az algatoxin analitikában

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).

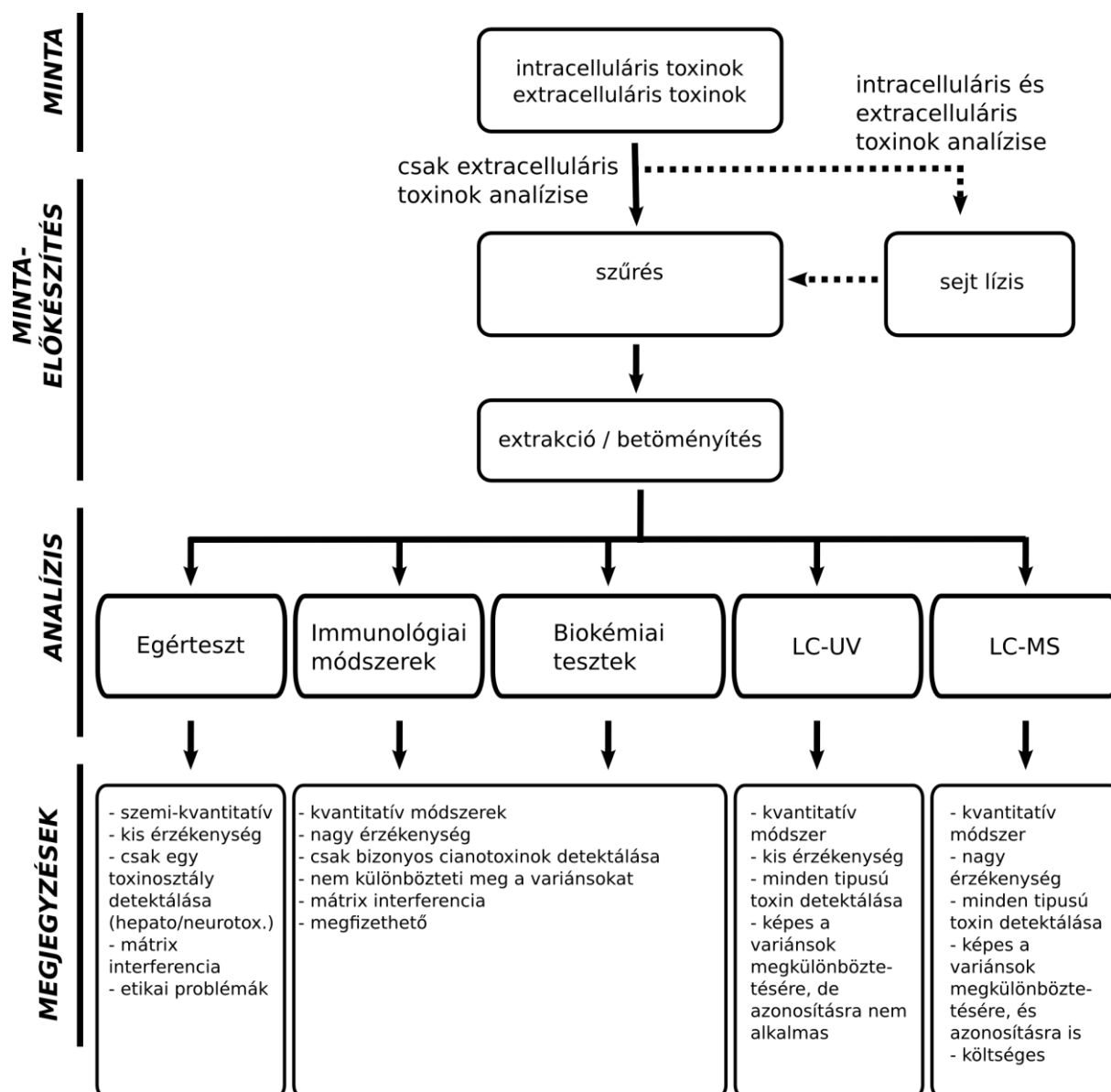
Előzőekben rámutattunk, hogy egyes toxinok termelése, különböző fajokban is lehetséges, ezért az egymástól eltérő fajok elszaporodása más-más típusú sejtömeget jelenthet. Például a kolóniába szerveződött fajok nyálkás kocsonyaburka (pl. *Microcystis* fajok) egészen más kihívást jelenthet az analízis számára, mint néhány egysejtű, vagy éppen fonalas szerveződésű toxintermelő faj elemzése (Codd et al., 2001). Mint ahogyan pl. egy apoláros jellegű zsiradékok felhalmozására hajlamos faj sejtömegének elemzése egészen más megközelítést igényel, mint más fajoké és a sort hosszan lehetne folytatni, ismerve egyes alfafajok sajátosságos felépítését (pl. kova-, cellulózvázaz vagy Gram negatív fajok), és jellemző speciális anyagcseretermék mintázatait (pl. hidrokolloidok, színanyagok, fehérje és szénhidrát tartaléktápanyagok; Watanabe et al., 1992). Ugyanez a változatosság jellemző a különböző vízmintákra, amelyek algatoxin tartalmának ismerete ugyancsak fontos körülmény lehet. Értelemszerűen más elemzést igényel a tengervíz, egy változatos humin-tartalommal bíró édesvíz, vagy a magas só- és lebegő-anyag tartalommal bíró kontinentális víz, és egészen más megközelítést követel a humán expozíciót biztosító közeg, az ivóvíz (Agrawal és Gopal, 2013).

Talán felesleges hangsúlyozni a növényi, állati minták különbözőségét is, melyek az alga toxinok akkumulációja miatt kerülhetnek előtérbe és jól ismertek a humán minták nagy változatossága is (pl. vizelet, változatos kötő- és izomszöveti minták; Merilouto és Codd, 2005).

Megismerve az algatoxinok változatos képviselőit és az eltérő sajátosságú mintákat, melyekben megjelenhetnek e mérgező anyagok, megérthetjük, hogy még az elmúlt évek dinamikusan fejlődő analitikai, környezet-analitikai módszerei mellett is, az ilyen típusú anyagok elemzésekor számos nehézséggel állunk szemben (Bateman et al., 1995).

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).

Az algatoxinok analízisére a módszerek széles választéka áll rendelkezésre (8. ábra). Ezek a módszerek tartalmazznak számos olyan technikát, amelyek biológiai, fizikai és kémiai úton közelítik meg a kérdést. Az alkalmazott módszernek és a várt eredményeknek megfelelően a mintákat gyakran az analízis előtt megfelelően elő kell készíteni (Agrawal és Gopal, 2013).



8. ábra. Az algatoxin-analízisek folyamatábrája.

4.2. Mintaelőkészítés

A mintavételt követően a mintákat alacsony hőmérsékleten kell tárolni (4°C), vagy liofilezással vízteleníteni. Az analízist a lehető leghamarabb el kell végezni azért, hogy a toxinok lebomlását, átalakulását megakadályozzuk. A minták előkészítése annak megfelelően változik, hogy milyen típusú toxint akarunk mérni és milyen típusú mintából (Edwards et al., 1996).

A vízminta közvetlen szűrése csak az extracelluláris toxinok (közvetlenül a vízben oldott) detektálását teszi lehetővé, de egy további lépés, az algasejtek lízise megteremti a lehetőséget az intracelluláris toxinok elkülönített detektálására is. Amennyiben a szűrést (vagy centrifugálást) a sejtek lízise után végezzük el, úgy az extra- és intracelluláris toxinokat egyszerre tudjuk detektálni. A sejtek lízisét például a fagyasztás-olvasztás módszerével vagy szerves oldószer hozzáadásával érhetjük el. Ez a két módszer közvetlenül roncsolja a sejtek membránját és kiszabadítja az intracellulárisan esetleg akkumulált toxinokat (Harada et al., 1990; 1998). A szűrletben lévő toxinokat dúsítani illetve tisztítani lehet, függően a koncentrációtól illetve a mátrix komplexitásától, ez általában szilárd fázisú extrakciót jelent (SPE). Ebben az esetben legalább 500 ml szűrletet öntünk át a tölteten, (ez általában C18-as töltet). A toxinok koncentrációjának a további növeléséhez a töltet leoldása során létrejött oldatot részben bepároljuk. Ez a gyakorlat három nagyságrenddel tudja koncentrálni a toxinokat, és így javítja a további analitikai módszer detektálási határát (Merilouto és Codd, 2005).

4.3. Biológiai módszerek

4.3.1. *in vivo* vizsgálatok

Az *in vivo* vizsgálatok közül a legismertebb az úgynevezett egérteszt. Valójában ez volt az első olyan módszer, amelyet alगतoxinok detektálására alkalmaztak, ami leginkább a toxinok biológiai hatásainak a vizsgálatára alkalmas (Chorus és Bartram, 1999). Az eljárás során a mintákat intraperitoneálisan injekciózzák be egerekbe, amit 24 óra után az elpusztult egerek vizsgálata követ (Falconer, 1993). Az akut idegrendszert érintő hatások valamint elsősorban az emésztőtraktust érintő toxinok esetében eltérő tüneteket figyeltek meg az egyedeken. A cianobakteriális toxinok esetében a kezdeti kutatások során így különítették el gyorsan ölő faktorokat (későbbiekben azonosított neurotoxinok) valamint lassan ölő faktorokat (későbbiekben azonosított peptidek, proteinfoszfataz gátlók; Falconer, 1993). Az egérteszt nem alkalmas a toxin pontos azonosításra (mikrocisztin, nodularin) a mintában. Az egérteszt szemi-kvantitatív módszernek tekinthető, amikor a különböző standard toxinkoncentrációknak kitett egerek segítségével összehasonlítjuk a károsodás mértéket. A biotesztek alkalmazása során úgy általában, de az alगतoxinok kapcsán is kijelenthetjük, hogy az egérteszt használata visszaszorult és más élő szervezetek (*Arterima*, *Daphnia* és *Thamnocephalus*) sejtkultúrák (*HELA*, *CHO*) vették át a szerepét. (Kaushik és Balasubramanian, 2013).

4.3.2. Immunológiai vizsgálatok

Az algaltoxinek detektálhatóak specifikus ellenanyagok segítségével. A kereskedelembe különböző ELISA kiték kaphatóak a toxinok detektálására (Hilbron et al., 2005; Lindner et al., 2004). Az ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) egy immunanalitikai módszer, egyik fajtája, a szendvics immuno teszt azon alapul, hogy az antigén (jelen esetben a fehérje) felületén több olyan régió van, amelyhez ellenanyag készíthető. Az első, antigénre specifikus ellenanyagot a mikrotiter lemez felületén előzőleg immobilizálják, ehhez adjuk hozzá a vizsgálandó antigént (minta). Ez a módszer nagyon érzékeny, a detektálási limit alsó határa 4 ng/l, felső határa pedig (köszönhetően a telítettségnek) 2 µg/l a MC-LR-re nézve (Lindner et al., 2004). Mivel az ELISA módszert sikeresen alkalmazták a mikrocisztinek detektálására, ezért specifikus ellenanyagokat terveztek a cilindrospermopszin és a szaxitoxin detektálására is (Bláhová et al., 2009; Campbell et al., 2009). Azonban az ELISA-ra alapozott módszernek is van néhány limitáló tényezője. Például nem tudja az eltérő variánsokat megkülönböztetni, valamint a mintában jelenlévő más összetevőkkel is reakcióba léphet és ez a toxinok koncentrációinak a túlbecsüléséhez vezethet (Chorus és Bartram, 1999).

4.3.3. Biokémiai vizsgálatok

Egyes algaltoxinek hatásmechanizmusa kellőképpen feltárt, valamint unikálisnak tekinthető ahhoz, hogy aktivitásukat felhasználva azonosítsuk őket (Metcalf et al., 2003). Mivel a mikrocisztinek és a nodularinok erős protein foszfatáz gátlók, ezért a toxinok detektálásához használhatjuk a protein foszfatáz gátló módszert (PPIA; Almeida et al. 2006; Ortea et al., 2004; Rapala et al., 2002). Az inkubáció előtt a reakcióelegy protein foszfatáz enzimet, az enzimaktivitást gátló toxin(oka)t és az enzim-szubsztrátot foglalja magába. Ennek a reakcióelegynek a specifikus hullámhosszokon mérhető abszorbanciája teszi lehetővé a szubsztrát detektálását és az enzim aktivitásának a megbecsülését, amely fordítottan arányos a toxin koncentrációval. Ez a módszer nagymennyiségű mintánál néhány óra alatt biztosítja a toxindetektálást, de nem tud különbséget tenni a variánsok között, valamint a mikrocisztin és a nodularin között sem. Továbbá a virágzásoknál jelenlévő ismeretlen összetevőkkel is kölcsönhatásba léphet, így ez a toxin koncentráció túl vagy alulbecsléséhez vezethet. Mivel a PPIA csak a specifikus hatást okozó metabolitok kimutatására alkalmas, ezért további analízisek szükségesek, hogy a mintában előforduló többi toxint detektáljuk (Almeida et al. 2006; Ortea et al., 2004).

4.4. Fizikai és kémiai módszerek

Az algaltoxinek analízálhatóak kémiai és fizikai módszerekkel, ami két lépésből áll, az egyik a mintákban jelenlévő összetevők szétválasztását jelenti, majd ezt követi a meghatározás, ami speciális detektorokkal történik. Ezen az elven alapul számos olyan

műszeres analitikai technika, melyek használata nélkülözhetetlen a toxinok analízisében (Gago-Martinez et al., 2003).

A legelterjedtebb és leginkább használt analitikai rendszer a HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) a cianotoxinok kimutatására. UV detektorral kombinálva, a HPLC-t kiterjedten lehet alkalmazni pl. mikrocisztinek kimutatására, de ezzel a technikával az azonosítás a retenciós idő alapján történik, szükség van standardokra. Az UV fényabszorpción alapuló detektálás sokkal specifikusabb lehet diódasoros UV detektor használatával. Azonban az előbbi módszer behatárolja a toxinok egyedi azonosításának lehetőségét, mivel nagyszámú algatoxinnak (pl. mikrocisztinek) hasonló az UV spektruma (Kotak et al., 1995; Gago-Martinez et al., 2003).

Ha pl. a mikrocisztinek további azonosítása szükséges, akkor fejlettebb módszert kell alkalmazni. A folyadékkromatográfia/tömegspektrométer (LC/MS) egy igen ígéretes és széles körben elfogadott technika, mivel lehetővé teszi, hogy a mikrocisztinek elválasztása és azonosítása egyidejűleg történjék (Agrawal és Gopal, 2013). Egy fejlett Frit-FAB (Fast Atom Bombardment) LC/MS technika 0.3 mm belső átmérőjű oszlopot használ, amely lehetővé teszi nanogramnyi mennyiségű algatoxin azonosítását a vízi és a biológiai mintákban. Az érzékenységnek ezt a növelését úgy érik el, hogy a pumpa és az injektor közötti mozgó fázist megosztják, így a teljes kifolyó mennyiséget be lehet vezetni a tömegspektrométerbe (Chorus és Bartam, 1999). A HPLC-MS kapcsolat sikeres megvalósítása lehetővé tette a közepesen hidofil molekulák biológiai mintákból, nagyon kis koncentrációkban (a ng/l tartományban) történő mérését. További nagy előrelépés volt az algatoxinok detektálása és azonosítása során a HPLC-MS-MS technikák megjelenése (Bateman et al., 1995; Merilouto és Codd, 2005). A kromatográfiás elválasztás és a két, egymás után kapcsolt tömegspektrométer különleges szelektivitás elérését teszik lehetővé. Az alkalmazások során a kromatográfiásan többé-kevésbé elválasztott komponenseket az első tömegspektrométer a molekulatömegük szerint tovább szelektálja, majd a molekulaion fragmentálását követően a második tömegspektrométer újabb szelektálást hajt végre a fragmensek között. Így a vizsgálandó anyag koncentrációjáról szinte tökéletes szelektivitás mellett kapunk információt (Merilouto és Codd, 2005).

A FAB-MS és LSI-MS (Liquid Secondary Ion) protonált molekulát $[M+H]^+$ szolgáltatnak, így nyújtva információt a molekula tömegéről (Almeida et al., 2006; Ortea et al., 2004). A mikrocisztinek nagyon kis anyagmennyiséggel (kevesebb, mint 1 µg liofilizált minta) történő meghatározására fejlesztették ki a MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight) technikát (Welker et al., 2002). Ez a módszer megadja a mintában előforduló összes peptid molekulatömegét, s így a cianotoxin-variánsok jelenlétére erős jeleket ad. Az eltérő módszerek különböző és gyakran kiegészítő információkat nyújtanak, így ajánlatos a megfelelő technikák kombinálása a célnak megfelelően. Ez azért is elengedhetetlen, mert a jelenleg alkalmazott módszerek egyike sem nyújtja az összes szükséges információt a szóbanforgó molekuláról (Chorus és Bartam, 1999). A cianotoxinok szerkezeti meghatározása gyakran NMR (Nuclear Magnetic Resonance) módszerrel történik. A kétdimenziós NMR technika bevezetése, a korszerű fejlesztések az ismert és ismeretlen algatoxinok szerkezeti meghatározásában alapvetőnek bizonyultak (Harada et al., 1998). Az NMR és MS (kivéve az LC/MS-t) általában nagy anyagmennyiséget és teljesen tiszta anyagot

igényel, ennél fogva ezeket a rutin vizsgálatokban nem alkalmazzák (Merilouto és Codd, 2005).

4.5. Elektroforetikus technikák

Az elérhető leghatékonyabb elválasztási technikák az elektroforézis elvén alapulnak, mely szerint az oldat töltéssel rendelkező részecskéi elektromos erőter hatására elmozdulnak (Landers, 1994). Ezen az elven működik a kapilláris elektroforézis (CE) berendezés, ahol a két, puffer oldatokat tartalmazó edény között egy 25-100 μm belső átmérőjű, 20-100 cm hosszú kvarckapilláris helyezkedik el. A pufferedényekre nagyfeszültséget (10-30 kV) kapcsolnak, a kis mennyiségű (néhány nl) mintát a kapilláris detektortól távolabb eső végénél (általában a kapilláris anódos végénél) juttatják be. A minta komponenseinek vándorlása a pufferrel töltött kapillárisban akkor kezdődik, amikor a pufferedényekre feszültséget kapcsolunk (Hjerten, 1990). A kapilláris elektroforézis módszere különböző elválasztási technikákat foglal magába, melyek közé tartozik a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC), amely elválasztás során az elválasztandó komponensek különbözőképpen oszlanak meg egy micelláris fázis és a határelektrolit között (Gago-Martínez et al., 2003).

Anionos felületaktív anyagokat (pl. SDS) a kritikus micella koncentráció fölötti mennyiségben adva az elektrolithoz, olyan micellák képződnek, melyek felülete negatív töltésű, belső terük pedig hidrofób jellegű. A detektort előbb a hidrofílebb jellegű anyagok érik el, majd az egyre inkább hidrofób molekulák következnek. A MEKC-t kisméretű molekulák elválasztásához használják (Gáspár, 2000). A cianotoxinok közül a mikrocisztinek és a szaxitoxinok CE-vel történő elválasztására történtek próbálkozások (Onyewuenyi et al., 1997). A cianotoxinok közül a mikrocisztinek azok, amelyeknek a detektálását és azonosítását a leginkább kidolgozták, de változatos mintákban történő megjelenésük és eltérő sajátságokkal bíró variánsai miatt számos analitikai probléma megoldása még várat magára (Li et al., 1990).

A cianotoxinok szerkezeti sokféleségének köszönhetően az analitikai technikák is változatosak, az elválasztástechnikai alapelveknek köszönhetően más módszert kell használni például egy kis-molekulatömegű hidrofíl karakterű molekula elválasztására (pl. anatoxin-a, cilindropermopszin), mint egy 800-1100 Da molekulatömegű hidrofób toxin esetében (Sirén et al. 1999). Az analízist tovább bonyolítja a cianobakteriális toxintermelés azon sajátossága, hogy a toxintermelés nem fajhoz kötött tulajdonság. A vízvirágzást előidéző szervezet(ek) külső morfológiai (mikroszkópi vizsgálat) tanulmányozása nem ad információt arról, hogy a kérdéses szervezet toxintermelő-e, és ha igen milyen jellegű toxint termel (Carmichael, 1992). Ezért egyes szervezetek toxintartalmának tanulmányozása során több analitikai módszer alkalmazása szükséges annak megállapítására, hogy a szervezet melyik toxint esetleg toxinokat termeli.

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 sejttartalmából). Célunk volt továbbá olyan

nagy hatékonyságú módszer fejlesztése, ami lehetővé teszi a toxin(ok) közvetlen analizisét minél kevesebb minta-előkészítéssel.

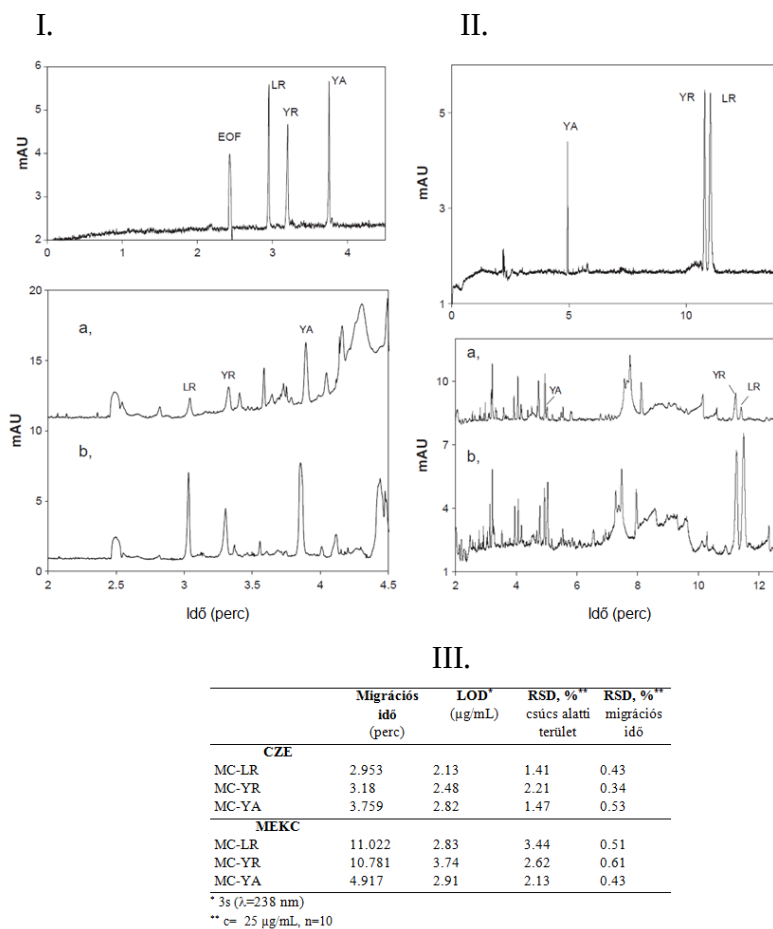
A legnagyobb kihívást jelentette annak a problémának a megoldása, hogy a leggyakoribb cianobakteriális toxinok analizisére olyan módszer nem létezik, amivel egyidőben (szimultán) lehetne a különböző karakterű toxinokat detektálni.

Publikációk sora jelent meg a CYN kimutatásának, analizisének nehézségeiről, hiszen az egértesztben csak hosszabb expozíciós idő után jelentkezik érzékenyen toxikus hatása. A kémiai analizisek során a legáltalánosabban használt fordított fázison történő HPLC-s elválasztás során néhány perces retenciót (visszatartást) tapasztaltunk még 1:99 MeOH/H₂O eluens összetétel esetében is. A rövid retenció, jelentős problémát jelenthet a célkomponens (jelen esetben CYN) mátrix komponenseitől történő elválasztására. Az intracelluláris, valamint a természetes környezetből származó vízvirágzás minták metanolos extraktuma esetében ez többszáz, zavaró komponenst jelenthet. Analitikai fejlesztéseink során egy új módszert dolgoztunk ki a CYN kimutatására, amely a komponensek eltérő elektroforetikus mobilitásán alapszik. A kapilláris elektroforézis segítségével elválasztott komponenseket, a HPLC-s mérések esetében leggyakrabban alkalmazott, diódasoros UV detektorral detektáltuk. A méréshez minimális mintaelőkészítés, szűrés szükséges, az intracelluláris és extracelluláris CYN közvetlen mérésére van lehetőség szerves extrakció nélkül. A nagy fehérjemolekulák zavaró hatását a puffer SDS tartalmával küszöböltük ki. A módszer segítségével kevesebb, mint 5 perc alatt identikus, tiszta CYN csúcsot detektáltunk, ami alkalmas a CYN mennyiségi meghatározására. A módszert a Kineret tóból származó és bizonyítottan CYN termelő *Aphanizomenon ovalisporum* fonalas cianobaktérium cianotoxin tartalmának meghatározására dolgoztunk ki (Vasas et al., 2002).

Igazolták, hogy a mikrocisztin családba tartozó cianotoxinok (heptapeptidek) a protein foszfatázok specifikus inhibitorai (a PP1 és PP2A típusú enzimek) és alapvetően megzavarják a sejtek regulációs folyamatait (Chorus és Bartram, 1999). A MC-ek előfordulására jellemző, hogy az édesvizekben jelentkező toxikus vízvirágzás mérgezőes tüneteit közel 90%-ban e vegyületek idézik elő. A mikrocisztinek családjába tartozó toxinok száma megközelíti a százat, köszönhetően a toxinmolekula variábilis régióinak (Merilouto és Codd, 2005).

Az 1991-es velencei tavi vízvirágzást a *Microcystis aeruginosa* cianobaktérium idézte elő, a faj izolátuma a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszékén BGSD-243-as törzs néven szerepel, a toxicitásáért felelőssé tehető mikrocisztin-LR, -YR jelenlétét Kós és munkatársai (1995) közzölték. Vizsgálataink során a BGSD-243-as törzs kivonatából a két legnagyobb koncentrációban jelenlévő mikrocisztin mellett további mikrocisztinek jelenlétét mutattuk ki és a szervezetből sikerült izolálnunk és leírunk egy új, ritka mikrocisztin variánst (MC-YA). A leggyakoribb mikrocisztinek és az új általunk leírt mikrocisztin variáns 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 analizisére 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. A munkánk során alkalmazott kapilláris elektroforézis két technikája a "kapilláris zónaelektroforézis", valamint a "micelláris elektrokinetikus kromatográfia" a pH, az ionerő és az SDS tartalom optimalizálása

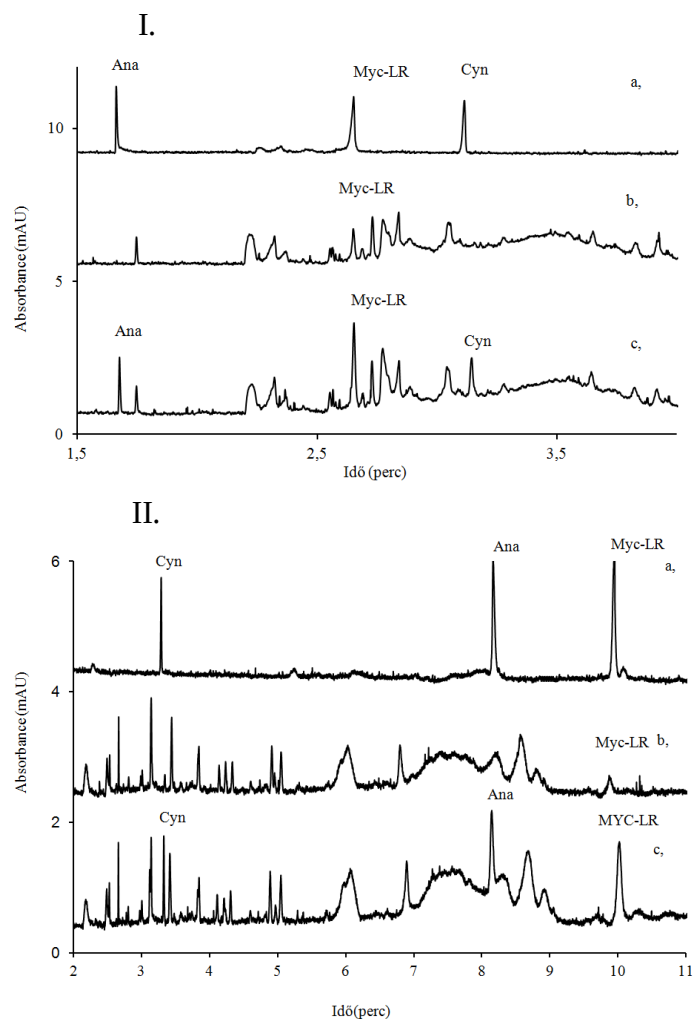
után alkalmasnak mutatkozott a többi mikrocisztin variáns elválasztására (9. ábra; Vasas et al., 2006).



9. ábra. Mikrocisztinek elválasztása kapilláris elektroforézissel. I: CZE módszerrel elválasztott MC –LR, -YR, -YA standardok, a. valós minta elemzése (BGSD-243 *Microcystis aeruginosa* kivonatában), b. valós, standardokkal kevert minta elemzése (BGSD-243 *Microcystis aeruginosa* kivonatában). II: MEKC módszerrel elválasztott MC –LR, -YR, -YA standardok, a. valós minta elemzése (BGSD-243 *Microcystis aeruginosa* kivonatában), b. valós, standardokkal kevert minta elemzése (BGSD-243 *Microcystis aeruginosa* kivonatában). III: A fejlesztett CZE és MEKC módszer analitika jellemzői. (Kondíciók CZE: kapilláris: 64,5 cm/50 µm puffer elektrolit: 25 mM borát, pH=10, alkalmazott feszültség: +25 kV, detektálás: UV 238 nm; MEKC: kapilláris: 64,5 cm/50 µm puffer elektrolit: 25 mM borát és 75 mM SDS, pH=9,3, alkalmazott feszültség: +25 kV, detektálás: UV 238 nm (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. A pH, az ionerő és az SDS tartalom optimalizálása után a munkánk során alkalmazott kapilláris elektroforézis két technikája megfelelő volt a cianotoxinok elválasztására. A fejlesztett módszer során használt puffer-rendszerben megvizsgáltuk a toxinok abszorpciós maximumát és olyan hullámhosszat kerestünk, amely pontokon mindhárom toxin detektálható (230 nm). Az általunk kidolgozott

módszer alkalmas a három leggyakoribb cianotoxin szimultán módon történő elválasztására és detektálására (10. ábra; Vasas et al., 2004).



10. ábra. Cianobakteriális toxinok elválasztása kapilláris elektroforézissel. I: a. CZE 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) II: 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). III: A fejlesztett CZE és MEKC módszer analitika jellemzői. (Kondíciók CZE: kapilláris: 64,5 cm/50 μ m puffer elektrolit: 25 mM borát, pH=10, alkalmazott feszültség: +25 kV, detektálás: UV 230 nm; 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 (9. és 10. ábra), így segítségével gyorsan és nagy hatékonysággal lehet vízvirágzásból származó mintákat, valamint vízvirágzásokból származó szervezetek cianotoxin tartalmát meghatározni (Vasas et al., 2004; 2006).

A cianobakteriális toxinok meghatározásához a kidolgozott módszereinket alkalmaztuk a laboratóriumi körülmények között folytatott toxintermeléssel foglalkozó kísérleteinkben, illetve a vízterekben bekövetkező cianobakteriális tömegprodukciók toxinanalízise során eredményesnek bizonyultak.

5. A cianobakteriális toxintermelés sajátosságai

5.1. Terepi megfigyelések, tapasztalatok

Az azonos fajok által előidézett algavirágzások eltérő toxicitása, toxintartalmának változatossága régóta foglalkoztatja a szakembereket. Az elsősorban egyszerű megfigyeléseken alapuló kezdeti leírások arról számoltak be, hogy az algavirágzások toxintermelését környezeti faktorok befolyásolják, melyek hatására a kevésbé optimális körülmények közé került sejtömeg aktív toxintermelésbe kezd és mérgezővé válik (Carmichael, 1994). Ismerve a toxinok sokféleségét, a toxintermelő fajok változatos fiziológiáját és környezeti igényeit, e kezdeti megfigyeléseket mindenképpen óvatosan kell kezelni, még akkor is, ha egyes fajok toxintermelésére igazak is lehetnek ezek az ismeretek.

Elsősorban a már részletesen tárgyalt tengeri mixotróf algafajok esetében írtak le olyan jellegű mechanizmusokat, melyek során a tápanyaghiányos állapotba került sejtömeg erősen mérgezővé vált miközben azok autotrófról heterotróf anyagcserére váltottak (Landsberg, 2002). Az erősödő toxintermelés következtében elhullott élőlények potenciális tápanyag-forrássá válva biztosíthatják az elszaporodott algák életműködéséhez szükséges táplálékot (Dolah, 2000). Hasonló táplálkozási stratégia és toxintermelés figyelhető meg az édesvizekben is előforduló *Prymnesium parvum* esetében is (Granéli et al., 2012).

Az eukarióta mixotróf anyagcserét folytató toxintermelőktől jelentősen különböznek mind anatómiai, mind fiziológiai értelemben a cianobaktériumok, amelyek elsősorban az édesvizekben felelősek a mérgező vízvirágzásokért. E fajok toxintermelése és azok szabályozása jelentősen eltér az említett eukarióta fajokétól. A terepi körülmények közötti megfigyelésekről leginkább a ciklikus heptapeptid típusú mikrocisztinekről vannak ismereteink (Carmichael, 1994).

A természetes fitoplankton közösségekben a mikrocisztin koncentrációt a sejtes toxintartalom, a toxintermelők biomasszája és az extracelluláris toxintartalom határozza meg (Alexova et al., 2011a,b). A terepi körülmények között mért adatok gyakran ellentétben állnak a laboratóriumi megfigyelésekkel, így a kísérleti eredményekből következtetni a természetes környezetre nem minden esetben reális. Ráadásul a természetes fitoplankton közösségekben a teljes mikrocisztin koncentrációt a fitoplankton fajok összetétele erősen befolyásolja (Dittmann et al., 2001). A terepi vizsgálatok szükségesek, hogy megállapítsuk a kevert fitoplankton közösségekben a környezeti változók és a toxinkoncentrációk kapcsolatait. A MC koncentráció rendkívül dinamikus tud változni térben és időben a természetes fitoplankton közösségekben (Chorus és Bartram, 1999). A virágzásokban egy vagy két faj dominál, a toxicitás a fő toxintermelők biomasszájával kapcsolható össze. Például Kotak és munkatársai (1995) a kanadai Közép Albertában található három hipereutróf tóban hasonlították össze térben és időben a MC-LR előfordulását. A szezonális és az éves MC-LR koncentrációk minden tóban erősen változóak voltak és összefüggésben voltak a *M. aeruginosa* mennyiségi viszonyaival. A koncentrációk emelkedésének és csökkenésének mechanizmusa nem teljesen ismert, a szerzők felvetették, hogy a MC-LR koncentráció a fotoperiódushoz kapcsolódik és a MC-LR lebomlik, vagy éjszaka tűnik el a sejtből (Chorus és Bartram, 1999). Térben is eltérő variációkat találtak a tavaknál. Mindkét esetben a MC-LR

koncentráció erős összefüggést mutatott a *M. aeruginosa* sűrűségével és biomasszájával (Kotak et al., 1995). Egy nagyobb felmérés keretén belül négy éven keresztül 12 albertai tóban vizsgálták a MC-LR koncentrációt. Ezekben a tavakban öt cianobaktérium fajt detektáltak és közülük csak kettő tudott MC-LR-t termelni és a *M. aeruginosa* volt a fő toxintermelő faj. A MC-LR koncentrációja a *M. aeruginosa* biomasszájával állt kapcsolatban (Kotak et al., 2000). Oh és munkatársai (2001) vizsgálataik során megállapították, hogy a Dél-Koreában található víztározóban, a MC koncentráció, a fitoplankton mennyisége és a Chl-a koncentráció között pozitív kapcsolat található. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a virágzásokban főleg egy vagy két faj dominál, és a toxin koncentrációnak a megbecsülését a domináns faj biomasszájára lehet alapozni (Oh et al., 2001).

Azonban amikor toxikus és nem toxikus fajok is előfordulnak a fitoplankton közösségben akkor a fitoplankton biomasszából nehéz előre jelezni a toxin koncentrációt. Carmichael és Gorham (1981) beszámoltak arról, hogy a Hastings tóban a toxin koncentráció napi szinten változott a növekvő fázis alatt (júliustól szeptemberig) és a változás évről évre kimutatható. Ezt a fajösszetétel térbeli és időbeli változásával és a toxikus és nem toxikus egyedek arányával magyarázták. Mások a fitoplankton minták HPLC analízisével kimutatták, hogy a mikrocisztin koncentrációk szezonális és éves szinten hasonlóan változnak (Park et al., 1998). Vézic és munkatársai (1998) megfigyelték, hogy ugyanazon tó, különböző helyeiről vett minták MC koncentrációi széles határok között változtak (0-2300 µg/g száraz tömeg). Ezt a toxikus és nem toxikus fajok térbeli eltéréseivel magyarázták.

A környezeti faktorok fontos szerepet játszanak az édesvízi fajok toxintermelésének szabályozásában. A mérsékelt övi eutróf tavakban élő fitoplankton közösségek toxintermelése összekapcsolható a N és P koncentrációk változásával. Az albertai tavakban a teljes P tartalom szoros kapcsolatban volt a *M. aeruginosa* biomasszájával és a celluláris MC-LR koncentrációval. Ezekben a tavakban a szerves N koncentrációk és a *M. aeruginosa* biomassza és a celluláris MC-LR koncentráció között negatív összefüggés volt megállapítható. Nyilvánvaló volt, hogy a maximális toxin koncentrációk akkor fordultak elő, amikor a szerves N koncentrációk a legkisebbek voltak (Kotak et al., 2000). Nagymértékű csökkenés volt megfigyelhető a MC-LR koncentrációban, amikor a teljes N (TN) és teljes P (TP) meghaladta az 5:1 arányt (Kotak et al., 2000). A TN:TP egyváltozós regressziós modellje megmagyarázta a legtöbb változást a MC-LR koncentrációban a kevert fitoplankton közösségekben. A *M. aeruginosa* biomassza és MC-LR koncentráció negatívan kapcsolódott a TN:TP arányhoz. A TN:TP aránynak hatása a toxin koncentrációra bizonyított volt a *M. aeruginosa* biomasszájára kifejtett hatásán keresztül. Ezeket a megállapításokat megerősítették laboratóriumban elvégzett kísérletekkel is.

Összességében elmondható, hogy az édesvizekben a cianotoxin-termelésre három fő tényező hat: a fitoplankton dinamikája (relatív mennyiség vagy a toxintermelő fajok biomasszája), a toxikus és nem toxikus cianobakteriális fajok változó jelenléte és a környezeti tényezők (Kotak et al., 1995; 2000; Chorus et al., 2001). A továbbiakban részletesen tárgyaljuk a cianobakteriális toxinok termelésének szabályozásával kapcsolatos ismereteket.

5.2 A cianobakteriális toxintermelés laboratóriumi vizsgálata

5.2.1. Mikrocisztin - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata

A hepatotoxinok termelését különböző fizikai és kémia paraméterek befolyásolhatják: a nitrogén, a foszfor, a nyomelemek, a hőmérséklet, a fény és a pH. Azonban a legtöbb szabályzással kapcsolatos vizsgálat kísérleti körülményei nem egységesek, számos ellentmondás fedezhető fel az eredmények értékelésekor.

Több „batch” tenyésztéssel elvégzett kísérlet azt mutatja, hogy a tápoldat magas nitrogén és foszfor koncentrációk összefüggésben vannak a nagyobb mértékű MC termeléssel (Sivonen, 1990; Vezei et al., 2002). Viszont az alacsony fém koncentrációk szintén a toxintermelés növekedését eredményezték (Lukac és Aegerte, 1993). Amíg ezek az eredmények a tápanyagok és a nyomelemek hatását mutatják a MC termelésre, a megfigyelt toxiningadozások valószínűleg köszönhetőek a nitrogén, a foszfor és a vas indirekt módon a sejtnövekedésre kifejtett hatásának is. Long és munkatársai megfigyelték, hogy nitrogén limitált kondíciók alatt a *Microcystis aeruginosa* sejtek gyorsan növekedtek, a sejtek kisebb méretűek és tömegűek voltak és nagyobb mennyiségű intracelluláris MC-t tartalmaztak, mint a lassú növekedésű sejtek. Ezek az eredmények mutatják a pozitív kapcsolatot a tenyésztet specifikus növekedési rátája és a sejtek toxintartalma között.

5.2.2. A mikrocisztin bioszintézis és molekuláris szabályozása

A Tillet és munkatársai (2000) által leírt *mcy* génklaszter elsőnek tette lehetővé a MC termelés szabályozásának vizsgálatát molekuláris szinten. A *M. aeruginosa* fajban a *mcy* gének transzkripciója a *mcyA* és *mcyD* között elhelyezkedő központi, kétirányú promóteren keresztül zajlik. A *mcy* génklaszter központi szabályzó régiója magába foglal olyan szekvencia részeket, amelyek kódolják a Fur (vas felvételt szabályzó) és NtcA (teljesen nitrogén szabályzó) DNS kötő fehérjéket. A három NtcA kötőhelyet azonosították a *mcyA/D* promóter régióban és ezt megerősítették *in vitro* kísérletekkel (Ginn et al., 2010). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vas és a nitrogén fontos szerepet játszik a mikrocisztin bioszintézis kontrollálásában.

Kaebnick és munkatársai kimutatták, hogy a nagy fényintenzitás és vörös fény alatt tenyésztett sejtekben a transzkripció növekedett, míg a kék fény a transzkripció csökkenését eredményezte (Kaebnick et al., 2000; 2002). A szerzők két fényküszöböt figyeltek meg, az egyik a sötétség és a gyenge fényviszonyok között helyezkedett el, a másik a közepes és magas fényviszonyok között volt megtalálható, ahol jelentős transzkripciós növekedés volt megfigyelhető. Érdekes módon változó starthelyeket azonosítottak mindkét operonban, amikor a sejteket magas vagy alacsony fényintenzitás alatt tenyésztették. A magas fényintenzitású körülmények összefüggésben vannak a *Planktothrix agardhii* fajban észlelt transzkripciós szint emelkedéssel, valamint a toxintermelés növekedéssel. Érdekes módon az intracelluláris MC tartalom állandó maradt az egész kísérlet alatt, azonban a MC izoformák aránya megváltozott (mikrocisztin-DeLR és-DeRR), válaszolva az eltérő fényintenzitásokra

(Tonk et al., 2005). Sevilla és munkatársai (2008) valós idejű PCR-t használva vizsgálták a vas hatását a *M. aeruginosa* fajban és azt találták, hogy a vaséhezés a *mcy* transzkripciójában valamint a toxin szintekben növekedést okozott, ezt mutatták ki korábban Kaebernick és munkatársai is (2002).

Alexova és munkatársai egy átfogó vizsgálatot végeztek el (2011), ahol a vaséhezés alatt a toxin bioszintézis növekedését detektálták, de nem tapasztalták a toxingének transzkripciós növekedését. Sevilla és munkatársai (2010) a nitrogén elérhetőség hatásait is vizsgálták a MC bioszintézisére nézve és felfedezték, hogy amíg a nitrogén többlet előmozdítja a sejtnövekedést, nincs közvetlen hatása a MC transzkripciójára vagy a termelésre. Továbbá a *mcyA* és *mcyD* gének transzkripciós start helyei nem változnak eltérő vas vagy nitrát szintnél.

A fajok, amelyek elveszítették toxintermelő képességüket fenotípusos elváltozásokat mutatnak. A nem toxintermelő fajok sejtei kisebbek lesznek, valamint megváltozik pigmentációjuk és az aggregációs képességük (Dittman et al., 1997; Hesse et al., 2001). Ezen különbségek motiválták több összehasonlító vizsgálat elvégzését abból a célból, hogy mélyebb bepillantást nyerjenek a MC termelés szabályozásába.

A vad típusok és a *ΔmcyB* mutáns tenyészetek proteomikai analízise MrpA protein azonosításához vezetett, amely csak a vad típusokban volt jelen (Dittmann et al., 2001). Ez a protein hasonlóságot mutatott a *Rhizobium leguminosarum* RhiA proteinjével, ami szerepet játszik a nodulációban és *rhiABC* operon részeként kódolt. Ennek a munkának az eredményei vezettek ahhoz a következtetéshez, hogy a MC-k talán extracelluláris jelző molekulaként játszanak szerepet a *Microcystis* fajokban. A mikrocisztin génklaszter kódolja az ABC transzportert, így a *mcyH* vélhetően részt vesz a toxinok exportjában (Tillet et al., 2000). Kaebernick és munkatársai (2000) felvetették, hogy a MC alacsony és közepes fényintenzitáson termelődik konstitutíve és akkor exportálódik, amikor a fényintenzitás eléri a magasabb fényintenzitási küszöböt. Ez a feltevés nem került megerősítésre, mivel a mutáns törzs az inaktivált ABC transzporterrel elveszítette a toxintermelő képességét (Pearson et al., 2004).

A toxin lehetséges extracelluláris szerepét további kísérletekkel vizsgálták exogén MC hozzáadásával. Schatz és munkatársai megfigyelték, hogy a toxin hozzáadás az MC termelésen át egy ismeretlen autoindukciós folyamatot vált ki (Schatz et al., 2007). Legalább két további extracelluláris komponenst találtak, az egyik a glikoprotein MrpC és a másik a MVN oligomannán-kötő fehérje volt, amelyek a vad típusokban és mutánsokban eltérő mértékben fejeződtek ki (Kehr et al., 2006; Zilliges et al., 2008).

Két proteomikai vizsgálat a toxikus és nem toxikus fajokban nagyszámú eltérően kifejeződő proteint mutatott ki, ami arra utal, hogy a MC termelésnek komplex és kiterjedt hatása van a *Microcystis* sejtek működésére (Zilliges et al., 2011; Alexova et al., 2011). Zilliges és munkatársai különbségeket mutattak ki a szénanyagcsere fehérjéinek akkumulációjában, különösen a Calvin ciklusban, a fikobiliprotein antennák proteinjeiben és a redoxi anyagcserében részvevő számos fehérje esetében, mint például a NADPH függő reduktázoknál. A vizsgálat azt is feltárta, hogy a proteinek eltérő akkumulációja részben annak köszönhető, hogy a toxin főleg oxidatív stressz körülmények alatt kovalens kötással kötődik ciszteinhez.

Alexova és munkatársai (2011) hat toxikus és nem toxikus törzsnek a fehérjemintázatát hasonlította össze és azt találták, hogy kilenc fehérje eltérő mértékben fejeződött ki a faj toxicitásának függvényében. A fehérjék a szén-nitrogén anyagcseréhez és a redoxi folyamathoz rendelkeznek, hasonlóan Zilliges vizsgálatához. A szerzők bizonyították, hogy a különböző expressziók összekapcsolhatóak a *mcy* operon promóter régiójában található NtcA és Fur szekvenciákkal, valamint a NtcA és a Fur egységek a II. fotorendszerrel és nitrát transzporter fehérjével (NrtA) állnak kapcsolatban. Két tanulmány egyértelműen azt mutatja, hogy a MC-eknek szerepe van a szén-nitrogén anyagcserében és a redox folyamat kontrollálásában és/vagy redox változások észlelésében.

Jahnichen és munkatársai (2007) feltárták a mutánsok limitált képességét, hogy felvegyék a szén alacsony szén koncentrációknál. Hasonlóan Van de Waal és munkatársai kimutatták, hogy a MC termelő vad típusnak erős szelektív előnye van alacsony CO₂ szinteken, de magas CO₂ szinteken nincs, feltárták a vizsgálatok a nem toxikus és toxikus fajokra nézve a reciprok kompetitív dominanciát alacsony és magas CO₂ szinteken. Ezek az eredmények szemléltetik, hogy vagy a toxikus vagy a nem toxikus fajok rendelkeznek általában nagyobb fitnessszel, és inkább különböző ökotípusokat alakítanak, amelyeknek eltérő kondíciók alatt fitness előnyük lehet. A MC termelő és nem termelő fajok szelektív előnyét azzal lehet megmagyarázni, hogy ezek a fajok általában a virágzások alatt együtt fordulnak elő.

Összességében elmondható, hogy korreláció van a MC termelés és a specifikus növekedés között. Genetikai szinten a fényintenzitás és a vas elérhetőség játszik fontos szerepet a MC transzkripciójában. Ezek a tényezők azonban nem vezetnek a toxintermelés on-off szabályozásához, inkább lehetővé teszik a finomhangolásokat. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a különböző fényintenzitás, a vas elérhetősége és a CO₂-szint hatással van a cianobakteriális virágzások közösségeire és hatásukat a genotípusok arányának a megváltoztatásával érik el, mivel ezek különböznek a relatív fitnessükben. Lehetséges, hogy a MC termelés csupán a fiziológiai jellemzők egyike, amely visszatükrözi a különböző ökotípusok elkülönülését a cianobakteriális közösségben. Az kétségtelen tény, hogy a nitrogén és a foszfor által előidézett eutrofizáció elősegíti a toxikus virágzások fejlődését, kialakulását, ez azonban jelenleg nem bizonyíték arra, hogy a növekvő makrotápanyag szintek direkt fejtik ki hatásukat a MC termelésre vagy szelektív hatásuk lenne a toxikus és nem toxikus genotípusokra. Ezek a környezeti faktorok összességében serkentik a virágzásban résztvevő közösség összetételét (Neilan et al, 2013).

5.2.3. Nodularin - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata

A *Nodularia spumigena* virágzások túlsúlyban vannak magas foszfor koncentrációnál, alacsony N:P aránynál és közepes sótartalomnál (Mazur-Marzec et al., 2006). A legtöbb vizsgálat az ilyen körülmények között a nodularin koncentráció emelkedéséről és az optimális növekedésről számol be. Például batch tenyészet vizsgálata feltárta a nitrát hatását a *N. spumigena* GR8b növekedésére és toxintermelésére, a teljes nodularin koncentráció alacsony nitrát tartalomnál érte el a legnagyobb szintet és a nodularin termelés közvetlenül összefüggésben volt a sejtosztódás mértékével (Repka et al., 2001). A különböző foszfát

szintek hatását vizsgálva a nodularin termelésre kimutatták, hogy a *N. spumigena* BYA batch tenyészetek magas foszfát koncentrációknál termelték a legnagyobb koncentrációkban a nodularint (Lehtimäki et al., 1994; 1997). A *N. spumigena* GR8b törzsszel megismételték a kísérletet és hasonló trendet találtak, bár a különbségek nem voltak statisztikailag szignifikánsak (Repka et al., 2001). Azonban a kemosztát tenyészeteknél megfigyelték, hogy magas foszfát koncentrációknál szignifikánsan több nodularin termelődik, mint amikor a növekedés foszfát limitált (Repka et al., 2001). Ezzel ellentétben Jonasson és munkatársai arról számoltak be, hogy nem változik a nodularin tartalom a *N. spumigena* AV1 kemosztát tenyészetekben a foszfátéhezést és ammónia kiegészítést követően (Jonasson et al., 2008).

5.2.4. A nodularin bioszintézise

A nodularin bioszintéziséért felelős génklasztert elsőnek a *N. spumigena* NSOR10 fajból azonosították. A nodularin bioszintézisét a kevert NRPS-PKS enzim komplex valamint tailoring enzimek végzik hasonlóan a MC bioszintéziséhez (Moffitt és Nealin, 2004). A 48 kb nagyságú lókuszt 9 ORF régióból áll (*ndaA-I*), amelyek a kétirányú szabályzó promóter régióból íródnak át. Kettő NRPS modul, a *mcyA* második modulja és *mcyB* első modulja eltűnt és a maradék modulok összeolvadtak a bimoduláris NRPS NdaA modullá, amely helyettesíti a *mcyA* és *mcyB* modulokat. Ezzel változik a NdaA szubsztrát specifikációja, ami a L-Tyr aktivitását eredményezi a L-Ser helyett és ez a Mdhb jelenlétéhez vezet a nodularinokban. A nodularin génklaszter, hasonlóan a mikrocisztin génklaszterhez, kódolja az ABC transzporter proteint, amely a membrán doménből és citoplazmatikus ATP kötő doménből áll. Azonban a nodularin szekréciójára közvetlen bizonyíték még nincs. Egy vélt represszor fehérjét azonosítottak a génklaszter kísérőjeként, amely részt vesz a *nda* gének transzkripció szabályozásában a hőstresszre adott válasza alapján (Moffitt és Nealin, 2004). Azonban ezt még kísérletileg nem erősítették meg. Beszámoltak a *N. spumigena* AV1 tenyészetben a *nda* klaszter transzkripció szabályozásáról ammónia és foszfátéhezés alatt (Jonasson et al., 2008). A *nda* gének valós idejű PCR analízise kimutatta, hogy az összes *nda* génexpressziója kétszeresre nőtt, amikor a sejteket foszfátéhezésnek tették ki, valamint kétszeresére csökkent a gének expressziója az ammónia jelenlétében. A génexpresszióban mutatkozó változások ellenére az intracelluláris és az extracelluláris nodularin koncentráció stabil maradt. Jonasson és munkatársai arra utalnak, hogy a kemosztát tenyészetekben az intracelluláris nodularin egy állandó szinten fennmarad és a többlet nodularin degradációval vagy aktív transzporttal távozik. Lehetőségként még felmerül egy valószínű poszt-transzlációs szabályzó rendszer szerepe, ami az intracelluláris toxin koncentrációt állandó szinten tartja, ennek alátámasztása további molekuláris vizsgálatot igényel (Jonasson et al., 2008).

A tenyészetekre alapozott vizsgálatok azt jelzik, hogy a nodularin termelés összekapcsolódik a növekedéssel és az optimális virágzási kondíciókkal. Kevesebb transzkripció vizsgálat áll rendelkezésre a nodularin esetében, mint a mikrocisztinnél, de feltételezhető, hogy a két toxin szabályozása hasonló. Azonban a nitrogén és foszfor hatása a nodularin és a MC transzkripciójánál eltér, ezért további vizsgálatok szükségesek (Neilan et al., 2013).

5.2.5. Cilindropermopszin - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata

Számos környezeti feltételről ismert, hogy befolyásolja a CYN termelést, például a növekedéshez szükséges nitrogénforrás (NO_3^- , NH_4^+ , N_2), a fényintenzitás, a szulfát és a foszfor elérhetőség. Saker és Neilan azt találták, hogy a *Cylindropermopsis raciborskii* sejtekben a legnagyobb cilindropermopszin tartalom fix-nitrogén forrás hiányában fordultak elő, a legkisebb koncentrációk pedig az NH_4^+ -al ellátott sejtekben jelentek meg. Ennek a fordítottja is megfigyelhető volt, valamint a növekedés kisebb volt a fix-nitrogén forrás hiányában és az NH_4^+ jelenlétében pedig nagyobb volt. A NO_3^- -tal ellátott tenyészetek toxin koncentrációja és növekedése közepes volt. A nitrogén-mentes közegben növekedett tenyészeteknél a fényintenzitás növekedésével $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ szintig a CYN koncentráció növekedése volt kimutatható, míg a sejtek növekedésének mértéke kisebb fényintenzitásnál volt maximális (Dyble et al., 2006).

5.2.6. A cilindropermopszin bioszintézis és molekuláris szabályozása

A CYN bioszintézis teljes génklaszterét (*cyr*) számos cianobaktériumban jellemezték, mint például két *C. raciborskii* izolátumban (Mihali et al., 2008; Stucken et al., 2010), *Aphanizomenon* sp. 10E6 izolátumban (Stucken és Jakobsen, 2010) és az *Oscillatoria* PCC 6506 izolátumban (Mazmouz et al., 2010). Az összes génklaszter erősen konzervált az ortológ gének nukleotid szekvenciáira vonatkozóan (74-95 %), de a gén elrendeződések és a határoló régiók eltérnek a genuszok között. A *cyr* génklaszter a *C. raciborskii* AWT205 izolátumban 42 kb hosszú és 15 ORF régiót kódol (*cyrA-O*). A cilindropermopszin termelő és nem termelő fajok vizsgálatai során kiderült, hogy egyes gének kizárólagosan csak a termelő fajokban találhatóak meg, mint például a szulfotranszferáz *CyrJ* (Mihali et al., 2008), NRPS/PKS hibrid *CyrB* és a PKS *CyrC*. A bioszintézis kezdésekor *CyrA* által kódolt amidinotranszferáz (Muenchhoff et al., 2010) a glicinből és L-argininből guanidincetátot állít elő és ezt a *CyrB* adenilációs doménja aktiválja. Ezt követi majd az 5 poliketid lánchosszabbítás, amely a szénváz kialakítására irányul. A karbonil csoportok később végül az uracil gyűrűs formációját alkotják. Ez a pirimidin bioszintézis egy alternatív útját jelenti, amely tioészteráz domén hiányában biztosított minden cilindropermopszin PKS egységnél, mivel ezek a domének általában a termékek szabadon bocsátásáért felelősek a PKS modulról. A CYN szénváz három gyűrűjének spontán nem-enzimatis formációja a *cyr* génklaszter génjeinek hiányából előre sejthető volt. Végül a bioszintézist a két tailoring reakció fejezi be a szulfatáció és a hidroxiláció, az utóbbi különböző sztereoizomereket eredményez (Mazmouz et al., 2011). A legtöbb cianobaktériumban a toxinok sejtből történő kiszállításáért egy transzporter felelős, a CYN esetében a bioinformatikai analízisek azt mutatják, hogy a toxin szállításáért a *CyrK* felelős. A *CyrO* gén terméke hasonlóságot mutat a WD fehérjékkel, amelyeknek változatos szabályozó és szignáltranszdukciós szerepük van, valamint az AAA család proteinjeivel, amelyek gyakran helyreállító feladatokat hajtanak végre a protein komplexek össze- vagy szétszerelésénél. Bár számos szervezetnél megszekvenálták a CYN bioszintézisében résztvevő génklasztert, ennek ellenére kevés vizsgálatot végeztek el a transzkripció egysége és a promóter szerkezetre nézve. A *C. raciborskii* CS-505 fajban két policisztronos operont, a

cyrDFGI-t és *cyrABE*-t azonosították, amelyek a *cyr* génklaszter transzkripciójában vesznek részt, míg a fennmaradó gének átírása nem volt kimutatható a klaszterben (Stucken et al., 2010). A bioinformatikai analízisek azonosították azon egységek szekvenciáit, amelyek a *cyr* klaszterben a *NtcA* génhez (teljes nitrogén szabályzó) kötődnek. A *C. raciborskii* AWT205 *cyr* génklaszterében promóter régiót nem azonosítottak. Azonban a klaszter mindkét végén *hyp* génekkel határolt, amelyeknek szerepük van a hidrogenáz enzimek érésében. A *hyp* génekről ismert, hogy más cianobaktériumokban a *NtcaA* által szabályozottak. A *hyp* gének általában megtalálhatóak a cianobaktériumokban és a *cyr* klaszterben transzpozázhoz hasonló szekvenciák figyelhetőek meg, azért valószínűleg a *cyr* gének a genom *hyp* klaszter régiójába helyeződtek és így a *hyp* klasztert két részre osztották. Ez a folyamat talán *NtcA* szabályozással ment végbe (Mihali et al., 2008).

Az *A. ovalisporum*-ban 2 transzkripciós start helyet fedeztek fel, ahol az *aoaA* a *cyrA*-nak, az *aoaC* pedig a *cyrC*-nek a megfelelője volt. Ezt a két start helyet különböző növekedési körülmények között (nitrogén elérhetőség és fényintenzitás) találták aktívnak. Ezt vették figyelembe az *aoa* gének transzkripciójának a szabályozásában részvevő két promóter létezésének a kimutatásánál. Az egyik konstitutív promóternek tekinthető, a másik az expresszióinak a felül- vagy alulszabályozását végzi specifikus körülmények között (Shalev-Malul et al., 2008). Azonosítottak egy olyan fehérjét, amely hasonló volt az AbrB transzkripciós regulátorhoz, ez a fehérje kifejezetten kötődik a 150 bp hosszúságú DNS szakaszhoz, amely az *aoaA* és *aoaC* részek között helyezkedik el és talán részt vesz a CYN szintézisének szabályozásában. AbrB-szerű proteinek szekvenciáit megtalálták az *Oscillatoria* PCC 6505 és a *C. raciborskii* CS-505 izolátumok genomjaiban (Mazmouz et al., 2010). Az *aoaC/cyrC* start kodonok nagy szekvencia azonosságot mutatnak a cianobaktériumokban. Ezek a konzervált régiók szabályzó kötőhelyek lehetnek, amelyek feltehetően a *cyr* gének együttes expressziójának a transzkripciós szabályozását teszik lehetővé ebben a két távoli rokonságban álló organizmusban.

A CYN termelő *A. ovalisporum*-nál transzkripciós szinten megvizsgálták, hogy milyen hatása van a nitrogénforrásnak a toxintermelésre (Shalev-Malul et al., 2008). Három napig tartó nitrogénéhezést követően, a bioszintézisben részvevő első gén transzkripciója, az *aoaA*-nak 2,5-szeresre nőtt, míg az *aoaC* transzkripciója 4-szeresre növekedett, az eltérés az *aoa* klaszterben lévő gének eltérő szabályozására utal. A tényleges CYN koncentráció állandó maradt, annak ellenére, hogy az átírás növekedett. Ez feltételezi a bioszintetikus enzimek aktivitásának változását különböző körülmények alatt, ami hatással van a CYN termelésre. Egy átfogó vizsgálatban a *C. raciborskii* CS-505 izolátumra fókuszáltak, ahol 4 transzkripcióért felelős gént (*cyrB*, *cyrI*, *cyrJ*, *cyrK*) 4 különböző nitrogénkezelés során vizsgálták meg (Stucken et al., 2010). Meglepően a transzkripciós szintek jelentősen változtak a kísérlet során, jelezve a konstitutív expressziót ilyen körülmények között. Azonban a *cyr* gének egyenkénti vizsgálata kis ingadozásokat mutatott, ami a klaszterben lévő eltérő szabályozásra utal ismét. Ez egy standard beállítás hiányának köszönhető, így a vizsgálatok során nehéz összehasonlítani a nitrogén elérhetőség hatását a cilindrospemopsin bioszintézisére nézve.

Egyetlen tanulmány foglalkozik a fényintenzitás hatásával a CYN bioszintézis tekintetében. Az *A. ovalisporum*-ot nagy fényintenzitásnak tették ki ($85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton).

Az eredmények azt mutatják, hogy 8 óra alatt az *aoaA* és *aoaC* transzkripció szintje lecsökkent, 24 óra elteltével a szintek helyreálltak és végül 48 óra múlva a szintek megduplázódtak (Neilan et al, 2013).

A CYN biológiai szerepe még nem tisztázott. A CYN szerepét a foszfát felvételben a foszfátéhezés alatt egy tanulmány vetette fel (Bar-Yosef et al., 2010), de ez még további megerősítést igényel. Az első vizsgálatnál a foszfátéhezésnél figyelték meg az *A. ovalisporum* fajban a növekvő CYN termelést transzkripció és toxin szinten. A második vizsgálatnál algafajokkal együtt neveltek *A. ovalisporum* törzset, ahol az algák alkalikus foszfátáz szekrécióját figyelték meg. Bar-Yosef és munkatársai ezekre a megfigyelésekre alapozták hipotézisüket, hogy a megemelkedett alkalikus foszfátáz szintnek köszönhető felszabadított foszfátot az *A. ovalisporum* felveszi és képes hasznosítani. Azonban az ilyen foszfátfelvétel jelentősége kérdésesnek tűnik, mivel a közegben az extracelluláris alkalikus foszfátáz aktivitást nem csak az *A. ovalisporum*-nak kitett fitoplankton okozhatja. A fitoplanktonban az alkalikus foszfátáz indukció igen erős, amikor egy közegben vannak az *A. ovalisporum*-mal, de ugyanez nem mutatható ki tisztított CYN esetében.

Összefoglalva, a környezeti faktorok közül csak a fényintenzitásnak, a nitrogén és foszfor elérhetőségnek vizsgálták a szabályzó hatását a CYN termelésre molekuláris szinten. Köszönhetően a standardizáció hiányának, a kapott eredményeket nehezen lehet összehasonlítani. A *cyr* klaszterben lévő gének eltérő expressziója, valamint a transzkripció szint és a toxin koncentráció közötti kapcsolat hiánya számos ellentmondást mutat a toxin termelése kapcsán (Neilan et al, 2013).

5.2.7. Szaxitoxin és származékai - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata

A *C. raciborskii* C10 izolátum szaxitoxin termelésénél azt találták, hogy a növekedési hőmérséklet alsó határánál (19 °C) a szaxitoxin termelés növekedett, míg a tenyészet növekedése lecsökkent. Különösen az extracelluláris toxin koncentráció növekedett 19 °C-os hőmérsékleten, a sejtek növekedése 25 °C-os hőmérsékleten volt optimális (Castro et al., 2004). Ezzel ellentétben az *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 tenyészeteknél a szaxitoxin termelés 28 °C-on növekedett és a sejt növekedésnek a 22°C hőmérséklet volt kedvező (Dias et al., 2002). Pomati és munkatársai kiemelték, hogy a szaxitoxin termelő fajok gyakran előfordulnak magasabb sókoncentrációjú vizekben és kimutatták, hogy a *C. raciborskii* T3 izolátumban a toxin felhalmozódik a növekvő extracelluláris NaCl szint hatására. Ez a vizsgálat vezetett a szaxitoxin toxicitási mechanizmusának a megértéséhez. A szaxitoxin hatással van a prokarióta és eukarióta sejtek homeosztázisára, amit a nátrium csatornákra gyakorolt hatásával ér el.

A fényintenzitás befolyásolta a szaxitoxin termelést a *C. raciborskii* T3 izolátumban. A legnagyobb szaxitoxin koncentrációt 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitású fénynél jegyezték fel (Camerio et al., 2009). A szaxitoxin bioszintézise úgy tűnik, hogy a sötétben lecsökken a 12:12 órás fény:sötét ciklus alatt, ez azt sugallja, hogy néhány cirkadiánt szabályzó mechanizmus részt vesz a szaxitoxin termelésében (Kellmann és Neilan, 2007; Camerio et al., 2009). A *Raphidiopsis brookii* fajban a nagyobb nitrogén koncentráció jelenlétében a szaxitoxin szintek csökkenését mutatták ki (Yunes et al., 2009).

5.2.8. A szaxitoxin bioszintézis és molekuláris szabályozása

A szaxitoxin génklaszterének a bioinformatikai jellemzése azt mutatta, hogy a szaxitoxin bioszintézisét egy szokatlan multifunkcionális PKS-szerű modul, az SxtA kezdi, amely végrehajtja az acetát metilációját és a Claisen kondenzációt az arginin és a propionát között, hogy 4-amino-3-oxo-guanidinoheptán jöjjön létre. Majd a további transzamidináció, ciklizáció, epoxidáció, aldehyd redukció és végül karbamiláció és hidroxilációs reakciók vezetnek a szaxitoxin alap molekulájának kialakulásához. Az alap molekula szintézisét követően eltérő tailoring enzimek dekarbamilált, N-1-hidroxilált, vagy szulfatált szaxitoxin analógokat hoznak létre (Kellmann et al., 2008). A szaxitoxin termelő fajok bioszintézisében résztvevő tailoring gének eltérő utakon vesznek részt a bioszintézisben vagy hiányoznak a fajokból. Ebből arra lehet következtetni, hogy a gének más lokuszok kiegészítőjeként vannak jelen a termelő fajok genomjában, vagy nem jelentősek a bioszintézisben (Mihali et al., 2009). A bioszintetikus enzimek funkcionális jellemzéséről eddig nem számoltak be, hogy megerősítsék a bioinformatikai előrejelzéseket és a bioszintézisben résztvevő néhány enzim szerepére vonatkozó sejtést (Soto-Liebe et al., 2010). A szaxitoxin bioszintetikus génklaszterének a jelenlétét 5 cianobaktérium genusznál írták le (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2009; 2011). Ezen génklaszterek mérete elég változatos, a *Raphidiopsis brookii* D9 izolátumban 25,7 kb, míg a *Lyngbya wollei* fajban 36 kb hosszúságú a klaszter. A génklaszterek tartalmazzak akár 33 bioszintetikus enzimet kódoló gént, valamint transzportereket és szabályzó proteineket. A génklaszterekben a gének elhelyezkedése az ismert szekvenciájú fajoknál különbözik és a gén meglétét vagy hiányát minden fajnál a specifikus toxin profil határozza meg. A *sxtF* és az *sxtM* géneknek a szaxitoxin exportjában van szerepe a *C. raciborski*-ban (Kellmann et al., 2008). Azonban ezek a gének az *A. circinalis* és az *Aphanizomenon* sp. fajok *sxt* klaszteréből hiányoznak, és itt a drog és metabolit szállítók családjába tartozó fehérjét kódoló *sxtPER* gén van jelen, ami felelős lehet a szaxitoxin exportjáért ezekben a fajokban (Mihali et al., 2009). A szabályzó géneket, a *sxtY*-t, *sxtZ*-t és az *ompR*-t azonosították, amelyek a szaxitoxin génklaszterrel együttesen helyezkedtek el a *C. raciborski* T3-ban. A kódolt proteinek homológok a foszfát stressz-aktivált kétkomponensű szingáltranszdukciós rendszerrel. További vizsgálat szükséges, hogy teszteljék a szabályzó proteinek részvételét a szaxitoxin bioszintézisében a T3 izolátumban. Eddig még nem számoltak be transzkripciós és proteomikai vizsgálatokról a szaxitoxint termelő cianobaktériumoknál, azonban a 2D-PAGE protokollokat a *C. raciborski*-ra és a *Raphidiopsis* sp.-re optimalizálták (Plominsky et al., 2009).

Összegezve, nagyon kevés vizsgálatot végeztek a szaxitoxin szabályozása kapcsán, a tenyészetekre alapozott vizsgálatok jelzik, hogy a növekedési hőmérséklet, a fényintenzitás, a sókoncentráció játszhatnak szerepet a toxintermelésben.

5.2.9. Anatoxinok - Környezeti tényezők laboratóriumi vizsgálata

A vizsgálatok, amelyek az anatoxin termelés szabályozásának feltárására irányultak, az 1960-as években kezdődtek, amikor Peary és Gorham (1966) kimutatta, hogy a fény, a hőmérséklet és a tenyészet fenntartási ideje van hatással az *Anabaena flos-quet* NRC-44-1

izolátum növekedésére és toxicitására. Bár az optimális kondíciók a növekedésre és a toxintermelésre hasonlóak voltak, a vizsgálatok nem jelezték a toxintermelés direkt szerepét a sejt növekedésében.

Számos későbbi „batch” vizsgálat megerősítette a kapcsolatot a fizikai-kémiai paraméterek (hőmérséklet, fényintenzitás, nitrogénforrás) és a növekedési fázis anatoxin szabályozása között (Rapala et al., 1993; Gallon et al., 1994; Gupta et al., 2002). Például Rapala és munkatársai azt találták, hogy a magas hőmérséklet lecsökkentette az anatoxin-a szinteket az *Anabaena* és az *Aphanizomenon* fajokban, függetlenül a növekedésük mértékétől. Továbbá nitrogén-mentes közegben az anatoxin-a szintek emelkedtek, de ebben a vizsgálatban kapott eredmények fajspecifikusak voltak és változtak az alkalmazott növekedési kondícióknak megfelelően. Ezt követően Rapala és Sivonen (1998) olyan vizsgálatot alkalmaztak, ahol folyamatos keverés alatt tartották az *Anabaena* tenyészeteket, és különböző hőmérsékleteken, növekedést korlátozó fényintenzitás alatt vizsgálták az anatoxin termelését. Érdekes módon a legmagasabb toxin szinteket az alacsonyabb hőmérsékleteknél és a növekedésnek alig kedvező fényintenzitásoknál jegyezték fel. Továbbá a gyenge fényviszonyok alatt nagymennyiségű extracelluláris anatoxin-a mennyiséget detektáltak.

Úgy tűnik, hogy a kedvező anatoxin-a vagy a homoanatoxin-a expresszióra a hőmérséklet és a közeg összetétele van hatással (Araoz et al., 2005). Például, amikor az *Oscillatoria* PCC 6505 izolátumot 22 °C-on, CO₂-ban szegény BG11-es közegben nevelték, akkor elsősorban anatoxin-a-t termelt. Ellentétben ezzel, amikor 25 °C-on, CO₂-ban gazdag BG11₁₀-es (kiegészítve 10mM NaHCO₃) közegben nevelték, akkor a domináns izoforma a homoanatoxin-a volt. Kearns és Hunter (2000) kimutatták, hogy a zöldalga *Chlamydomonas reinhardtii*-ből készített kivonatok hozzáadva az *A. flos-aquae* batch tenyészetekhez növekedést okoztak a toxin szintekben.

5.2.10. Az anatoxin bioszintézis és molekuláris szabályozása

Az anatoxin-a és a homoanatoxin-a bioszintézisét NRPS/PKS enzimrendszer végzi, ahol az NRPS *AnaC* adenilációs doménja felelős a prolin aktiválásáért, vagyis itt nem a glutamát a kezdő molekula. Az aktivált prekursor rákötődik az *AnaD* acyl carrier proteinre és módosul. A poliketid lánc összeszerelését a poliketid szintetáz *AnaE* és *AnaF* folytatja. Az ORF1 fehérje az *ana* klaszter közvetlen közelében kódolt, amiről úgy gondolják, hogy katalizálja a ciklizációs lépést, ami kialakítja az antoxinra jellemző biciklikus gyűrűt, ez addig tart, amíg a növekvő lánc az *AnaF* acyl carrier protein doménhez kötődik. Végül a biciklikus thioészter a láncmeghosszabbítást az *AnaG*-re való átvitelre kezdeményezi, amit az *AnaA* thioészteráz által katalizált láncleszakítás követ. Az így létrejött 11-karboxilanatoxin-a-nak és 11 karboxilhomoanatoxin-a-nak keresztül kell mennie egy spontán vagy enzimatikusan katalizált dekarboxilációs lépésen, hogy végül létrejöjjön az anatoxin-a és a homoanatoxin-a (Mejean et al., 2009). Az anatoxin (*ana*) génklasztert az *Oscillatoria* PCC 6506 (Mejean et al., 2009) és az *Anabaena* sp. 37 (Rantala-Ylinen et al., 2011) izolátumokban írták le. Az anatoxin bioszintézisében résztvevő 7 gén *AnaA-G* az *ana* génklaszterében kódoltak. A két izolátum anatoxin génjei között nagyfokú szekvencia azonosságot állapítottak meg, de ezek elrendezése különböző volt. Az *Anabaena* sp.-37 izolátumban az anatoxin gének két

klaszterben helyezkednek el (együttesen 29 kb hosszúságúak), ezek ellentétes irányban íródnak át és a két klasztert egy 6 kb nagyságú intergenikus spacer régió különíti el. A gének 4 vagy 5 operonba rendeződnek, és mindegyik operon jellegzetes upstream szekvencia mintázattal rendelkezik, de hiányzik az RNS polimeráz felismerő szekvencia (Rantala-ylinen et al., 2011).

Összegezve, kevés vizsgálatot végeztek el az anatoxin termelés szabályozására vonatkozóan, és így jelenleg nehéz szilárd következtetéseket leírni az anatoxin expresszióját illetően. Viszont úgy tűnik, hogy ezen alkaloid toxinok termelése nem a sejtnövekedés direkt velejárója (Long et al., 2001). A nitrogénéhezés vagy nitrogén eltávolítás a növekedési közegből az anatoxin-a termelés csökkenését okozta. Ez a jelenség megegyezik a CYN termeléssel (Saker és Neilan, 2001). A fényintenzitás hatással van az anatoxin expressziójára valamint az exportjára.

5.3. A cianobakteriális toxinok funkciója

Napjainkig a legtöbb édesvízi cianotoxinról szóló beszámoló a toxinok termelésével, lebomlásával, hatásmechanizmusával, valamint a termelést kiváltó környezeti feltételek hatásával foglalkoznak. Ugyanakkor viszonylag kevés leírás foglalkozik e toxinok valós szerepének tisztázásával. Vajon miért is termelnek egyes algák toxinokat? A toxintermelés lehetséges evolúciós előnyei két csoportba sorolhatók: „versenyelőny” vagy „fiziológiai segédanyag”. Az első teória szerint, a toxintermelés képessége a fogyasztók elleni védekezés céljából alakult ki az algákban. A második teória szerint ezek a metabolitok növelik a sejtek fiziológiai fitneszt, a homeosztázisban és a fotoszintetikus hatékonyságban nyújtott előnyük, és a felgyorsult növekedés, szaporodás révén (Kinneer, 2010).

A cianobaktériumok fotoszintetizáló élőlények, megtalálhatók széles körben a vízi és szárazföldi környezetben, mint antarktiszi tavakban, hőforrásokban, száraz sivatagokban, trópusi savanyú talajokon (Hitzfeld et al., 2000; Kinneer, 2010). Ezen fajok közül a toxintermelők nagyobb érdeklődésre és aggodalomra adnak okot, különösen, ha ezek olyan trópusi, szubtrópusi és mérsékelt övi vizekben jelennek meg, melyeket rekreációs célból vagy ivóvíz hasznosítás miatt használunk. A cianotoxinok mérgezőek különböző trofikus szintek tagjaira nézve, köztük baktériumokra, protozoákra, zooplanktonra, halakra, madarakra és emlősökre (Christoffersen, 1996; Krienitz et al., 2003; Moreira et al., 2013). Mint az a fentiekben olvasható, a toxinok kémiai szerkezete igen változatos, sok tényező kiválthatja termelésüket. A toxicitás módja széles körben változik és a toxicitás mértéke a különböző fajok között is változik. Azonban több szerző is elismerte, hogy az ökofiziológiai és tágabb értelemben vett szerepe a toxintermelésnek továbbra is tisztázatlan, egyértelmű választ nem adhatunk a kérdésre.

5.3.1. Versenyelőny

A toxinok általánosságban véve másodlagos anyagcsere termékeként elfogadottak (Kurmayer és Christiansen, 2009). Definíció szerint ezek olyan vegyületek, melyeket nem használnak fel az elsődleges anyagcsere során, (hormonok, antibiotikumok, allelokemikáliák).

A másodlagos metabolitok termelése fiziológiai kontroll által szabályozott, mely a környezeti faktorokra ad választ. Növényekben pl. az alkaloidok anyagcsere „hulladékoknak” is tekinthetők, amelyek az egyes szövetekben halmozódnak fel a megfelelő kiválasztó rendszer hiányában. Ez a nézet általában nem elfogadott olyan anyagok esetében, melyek későbbiekben jótékony szerepet töltenek be, mint például a predáció szabályozása (Vining, 1990; 1992).

A másodlagos anyagcseretermékek termeléséhez kapcsolódó szabályozó mechanizmusok megléte azt sugallja, hogy a vegyületek evolúciója a sejtnak nyújtott előnyön alapszik (Vining, 1990; 1992), szemben azzal, hogy ezek véletlen vagy maradék vegyületek lennének. Néhány szerző szerint ezek a vegyületek erőteljesebb kompetíció idején alakultak ki, mikor ezek bizonyos versenyelőnyöket nyújtottak (Lillehoj, 1982), melyeknek vagy megmaradt a jelentősége a modern vízi környezetben vagy nem. Például azok a vegyületek, amelyek a gyors környezetváltozás következtében alakultak ki, még ma is előnyt biztosítanak. Az is lehetséges, hogy több funkciót is biztosítanak, mint az más mikrobiális fajoknál is ismert (pl. antibiotikum termelés), így egyidejűleg tudnak hozzájárulni az elsődleges és másodlagos metabolizmushoz (B-Béres et al., 2012). Ennek fényében a cianotoxinok szekunder metabolitként való megnevezése némiképp zavaros, mert úgy tűnik, hogy potenciális szerepük van, vagy volt az elsődleges anyagcserében is.

5.3.1.1. Versenytárs, ragadozó jelenléte

A versenytárs vagy ragadozó jelenléte egyértelműen befolyásolja a toxintermelést, de hogy ez milyen mértékű, abban nincs összhang a toxinok között, még azonos termelő esetén sem (Leflaive és Ten-Hage, 2007). Például az *Anabaena flos-aquae* anatoxin-a termelése növekszik *Chlamydomonas reinhardtii* jelenlétében, míg a MC termelés teljesen gátolt (Kearns és Hunter, 2000). *Microcystis* fajok MC termelésében növekvő különbségeket mutattak ki fogyasztókkal való direkt és indirekt kitettség esetén (Jang et al., 2003; 2004; 2007).

5.3.1.2. Fogyasztók elleni védelem

Sokan úgy gondolják, hogy a cianotoxinok a termelő elfogyasztásának elkerülésére alakultak ki, így a toxintermelés versenyelőnyt biztosít a nem toxikus fajokkal szemben. Számos tanulmány kimutatta, hogy a cianotoxinok toxikusak a zooplanktonra nézve, sőt néhány zooplankton aktívan kerüli őket (Demott et al., 1991; Gilbert, 1996; Nogueira et al., 2004). Például Demott és munkatársai (1991) megfigyelték, hogy alacsony MC koncentráció csökkentette a *Daphnia pulicaria* táplálkozási rátáját, míg toxin-mentes környezetben a ráta gyorsan visszaállt. A szerzők szerint a toxin kémiai védekezés céljából alakult ki (Demott et al., 1991). Az *Anabaena flos-aquae*-ről kimutatták, hogy csökkenti a *Brachionus calyciflorus* és *Synchaeta pectinata* élettartamát, termékenységet és a populáció növekedésének rátáját (Gilbert., 1996). Egyes *Microcystis* fajok MC termeléséről kimutatták, hogy növekszik, válaszul közvetlen fogyasztási nyomásra vagy indirekt kémiai jelzésekre (Jang et al., 2003, 2004; 2007). A CYN-ről bebizonyosodott, hogy toxikus számos vízi szervezetre nézve,

többek közt *Artemia salina* (Metcalf et al., 2002), *Daphnia magna*, és *Daphnia galeata* (Lindsay et al., 2006) élőlényekre. Ezen példák mindegyike támogatja azt az elképzelést, hogy a toxinok védekezési mechanizmusként alakultak ki. Azonban Van Gremberghe és munkatársai (2009) szerint ez törzsspecifikus, és általában a *Daphnia* sp. jelátvivő molekulák gyenge hatással vannak a toxin produkcióra. Wilken et al. (2010) arra a következtetésre jutott, hogy a protozoáknak való direkt és indirekt kitettség nem okoz MC növekedést. Ez némi nehézséget jelent annak megállapítása során, hogy a toxintermelés kialakulásának egyetlen vagy meghatározó oka a termelő elfogyasztásának gátlása lenne. A legújabb molekuláris biológiai eredmények azt mutatják, hogy a toxintermelésért felelős gének megelőzik a metazoa vonalat (Rantala et al., 2004; Rantala, 2007; Murray et al., 2011), ezért zavaró az a feltételezés, hogy a legelési nyomás váltotta ki a toxintermelést. A MC szintetáz molekuláris analízise során kimutatták, hogy ez a gén jelen volt a cianobaktériumok őséiben 1600-2000 millió évvel ezelőtt is (Rantala et al., 2004). A NOD esetében az *nda* génről is kimutatták, hogy egy régi őstől származik (Rantala, 2007). A STX genetikai alapjainak meghatározása során kimutatták, hogy *stx* génklaszter jelen volt a Nostocales korai elkülönülése idején, legalább 2100 millió évvel ezelőtt (Murray et al., 2011). A legrégebbi fonalas akinéta képző cianobaktérium leletek 1600-2000 millió évvel ezelőttre tehetők (Sergeev et al., 2002). Tekintettel arra, hogy a legtöbb CYN termelő cianobaktérium képez akinétát, hasonlóan a MC és STX esetében, valószínű, hogy a CYN termelésért felelős gének jelen voltak azok őseiben, amelyek megelőzik a metazoa elválását, ami kb. 1576 millió évvel ezelőtt történt.

Bár a molekuláris bizonyítékok azt mutatják, hogy a toxin gének evolúciója időben megelőzi a metazoaakat, ez nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a toxinok védekezési mechanizmus miatt alakultak ki (protozoák is képesek lehettek megfelelő nyomást gyakorolni, Wilken et al., 2010). Sokszor a protozoa biomassa meghaladja a metazoa biomasszáét, sőt gyakran ők a legfontosabb fitoplankton fogyasztók (Buskey, 2008). Nem meglepő, hogy számos tanulmányban kimutatták a toxinok protozoákra gyakorolt káros hatását: pl. a CYN toxikus a *Naegleria lovaniensis* amőbára nézve (Rasmussen et al., 2008), valamint a *Spirostomum ambiguum* és *Tetrahymena thermophyla* is érzékeny a MC-re (Maršálek és Bláha, 2004). Ezzel szemben számos protozoa ismert, melyek aktívan táplálkoznak és nőnek toxikus cianobaktériumokon (Fabbro et al., 2001; Buskey, 2008). Fabbro és munkatársai (2001) kimutatták, hogy a *Paramecium caudatum* képes sikeresen fogyasztani CYN termelő *Cylindrospermopsis raciborskii*-t, ez lehet az oka annak, hogy ez a csillós rendszeresen előfordul a természetes vízvirágzás során az algával. Egy újabb tanulmány kimutatta, hogy a *Microcystis aeruginosa* nem volt képes MC-t termelni közvetlen és közvetett protozoa kitettség hatására (Wilken et al., 2010). Ez arra utal, hogy míg a toxintermelés valószínűleg egyes fajoknál/morfotípusoknál a védekezéshez kapcsolódik, ez nem minden fajra igaz, ezért alternatív magyarázatokra van szükség.

Az ellenérveket erősíti az is, ha megnézzük a toxintermelés költségét: a teljes metabolikus mérleget figyelembe véve a védekezés szempontjából a toxintermelés egy rossz választás lenne. Jellemzően költséghatékonyabb módszer a nyálkatermelés vagy a nagyobb kolóniák kialakítása, mint a *Microcystis* sp. esetében, vagy a kevésbé támadható morfológiák felvétele (a már említett *Cylindrospermopsis* esetében).

További nehézséget jelen olyan fajok jelenléte, melyek toxinokat termelnek, de ezeket visszatartják a sejtjeikben: ez részben igaz a legtöbb MC termelő fajra, de nem a CYN termelőkre. Gyakorlatilag a védekezési mechanizmus érv még gyengébb azoknál a fajoknál amelyek intracelluláris toxinokat termelnek, mivel itt a hatás csak akkor érvényesül, ha egyszer már elfogyasztották a sejtet. Lehetséges ellenérv lehet az, hogy a toxin „ízletesség csökkentőként” szolgál, ezzel növelve a kolónia rátermettségét. Kérdéseket vet fel a védekezési mechanizmussal kapcsolatosan, tekintve a célpontok széles skáláját: a gerinctelenek (vízi csigák) sokkal kevésbé tűnnek érzékenynek CYN-re, mint a gerincesek (ebihalak, halak), annak ellenére, hogy a csigák hasonló (ha nem nagyobb) fenyegetést jelentenek a toxintermelő fajra nézve (Kinnear et al., 2007).

5.3.1.3. Allelopátia

Definíció szerint az allelopátia egy szervezet növekedésének gátlása egy másik szervezet által kibocsátott kémiai anyagok segítségével, ami előnyt biztosít az erőforrásokért zajló versenyben. A toxintermelő algák, cianobaktériumok folyamatosan versenyeznek más cianobaktériumokkal, algákkal, makrofítákkal a fényért, a tápanyagokért és a területért (B-Béres et al., 2012). Számos tanulmány bizonyítja a toxinok allelopatikus hatását (Bácsi et al., 2013). Singh et al. (2001) kimutatta, hogy a *Microcystis aeruginosa*-ból kivont és tisztított MC-LR negatívan hat számos alga és cianobaktérium növekedésére. Kearns és Hunter (2001) szintén kimutatta, hogy MC és anatoxin-a egyaránt gátolja a *Chlamydomonas reinhardtii* mozgékonyágát. A *Synechococcus elongatus* növekedése szintén gátolt MC-RR jelenlétében, valószínűleg annak fotoszintézis gátló hatása következtében (Hu et al., 2004). A MC-LR-ről kimutatták, hogy gátló hatással van a vízinövényekre nézve, mint a *Ceratophyllum demersum*-nál, ahol környezeti szempontból releváns koncentráció (5 µg/l) gátolja a növekedést, befolyásolja a morfológiát és a fotoszintézist (Pflugmacher et al., 1999; Pflugmacher, 2004). A *Spirodela oligorrhiza* esetében szintén jelentették a MC-LR növekedésgátló és morfológiát befolyásoló hatását, de itt a koncentráció sokkal magasabb volt, mint ami természetes körülmények között előfordul (Romanowska-Duda és Tarczyńska, 2002). Anatoxin-a esetében is kimutattak növényekre gyakorolt negatív hatásokat, de itt is a környezeti szempontból releváns koncentráció fölött (Mitrovic et al., 2004). A sejtes és sejt-mentes *C. raciborskii* kivonatok allelopatikus hatással voltak zöldalgákra (*Coelastrum sphaericum* és *Monoraphidium contortum*), cianobaktériumokra (*Microcystis wesenbergii*) és kovamoszatokra (*Navicula* sp.) (Figueredo et al., 2007). *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, és *Solanum lycopersicum* növekedését szintén befolyásolta két *C. raciborskii* törzs kivonata, bár a csírázást nem gátolta szignifikánsan (Silva és Vasconcelos, 2010). A toxinok más szervezetek tápanyag dinamikájára gyakorolt hatása tekinthető egyfajta indirekt allelopátiának (Legrand et al., 2003; Bácsi et al., 2013).

A fentiekkel szemben ökológiai szempontból releváns MC és CYN koncentrációk nem mutattak allelopatikus hatást számos fitoplankton faj esetében (Pinheiro et al., 2013). Ez a tanulmány kimutatta, hogy a nyers kivonatok sokkal erősebb hatással voltak a növekedésre, mint a tisztított toxinok, stimuláló hatásról számoltak be 0,025-2,5 mg/l MC-LR és CYN tartalmú kivonatok esetében. *Hydrilla verticillata* esetében szignifikáns növekedés stimuláló

hatásról és a források újraelosztásáról számoltak be, amikor *C. raciborskii* teljes sejtkivonatokkal kezelték őket, melyek 400 µg/l CYN-t is tartalmaztak (Kinneer et al., 2008).

A fentieket figyelembe véve az allelopatia, mint a toxinok ökológiai szerepe, továbbra is vita tárgyát képezi (Bácsi et al., 2013). Egyes szerzők szerint nem allelopatikus hatásúak, de szinergikusan hatnak más komponensekkel együtt. Ezt arra a megfigyelésre alapozzák, hogy általában csak nagyon magas tiszta toxinkoncentráció vált ki gátló hatást, és emiatt a toxin tartalmú sejtkivonatok aktívabbak, mint a tisztított toxinok (Legrand et al., 2003; Babica et al., 2006; Leflaive és Ten-Hage., 2007). Például Babica és munkatársai (2006) szerint csak kevés tanulmány számol be arról, hogy környezeti szempontból releváns MC koncentráció allelopatikus hatással van fototróf szervezetekre, ezért a MC allelopatikus hatása nem tűnik valószínűnek. Berry és munkatársai (2008) azt is megjegyezték, hogy a környezeti szempontból releváns MC koncentráció 10 µg/l alatti, míg a tanulmányokban, ahol gátló hatást figyeltek meg 100 µg/l fölötti koncentrációkat is használtak. Továbbá hiányoznak vízvirágzás előtti sejtdenzitáshoz kapcsolódó allelopatikus hatásokról szóló eredmények (Jonsson et al., 2009), és a kevés létező tanulmányban alacsony sejt koncentráció esetében nem tudtak kimutatni semmilyen hatást; és gyakran hiányoznak elemzések, melyek egyesítik a laboratóriumi és terepi megfigyelések eredményeit az allelopatikus hatások tekintetében (Leão et al., 2009).

5.3.2 Toxinok, mint fiziológiai segédanyagok

Mivel a toxinok hatással vannak számos vízi és szárazföldi élőlényre, csábító arra következtetni, hogy védekezési célból és a forrás kompetíció csökkentése miatt vannak jelen. Azonban az is lehetséges, hogy elsődleges funkcióik nem a mérgező tulajdonságukhoz kapcsolódnak (Oullette és Wilhelm., 2003). Tekintettel arra, hogy a cianobaktériumok a toxintermelést hosszú evolúciós időszakon át fenntartották (annak magas anyagcsere költsége ellenére is), nagyon valószínű, hogy ezek fontos biológiai funkciókkal bírnak. A legutóbbi vizsgálatok szoros kapcsolatot találtak ezen vegyületek és egyes élettani funkciók között, melyek a sejtek elsődleges anyagcseréjének a részeként tekinthetők (Neilan et al., 2012). Számos egyéb fiziológiai szerepet feltételeznek, pl. jelátvitel, tápanyagfelvétel, ion-háztartás, homeosztázis fenntartás, oxidatív stressz elleni védelem (Utkilen és Gjølme 1995; Pomati et al., 2004; Raven., 2010; Gan et al., 2012; Neilan et al., 2012).

5.3.2.1. Tápanyag felvétel segítése

A tápanyagok elérhetősége fő limitáló tényező lehet a fitoplankton proliferációja szempontjából. Ennek ellenére viszonylag kevés a tápanyagok toxinprodukcióna gyakorolt hatásáról szóló tanulmány és azzal is kevés közlemény foglalkozik, hogy a toxinok milyen szerepet játszhatnak a tápanyagokhoz való hozzáférés javításában (Bácsi et al., 2006). Kivétel ez alól a toxinok más szervezetek alkalikus foszfatázok (AP-áz) szekréciójában betöltött szerepéről szóló információk. Egyes P limitált algafajok, az inorganikus P felvételét AP-áz-ok szekrécióján keresztül végzik (Raven., 2010). Egy nemrégiben készült tanulmány szerint a CYN jelenléte AP-áz szekréciót okoz más fitoplankton alkotóknál, így növelve az elérhető

inorganikus foszfát mennyiségét a CYN termelő számára (Bar-Yosef et al., 2013). Az eredményeket terepi megfigyelések is alátámasztják, melyek szoros összefüggést mutatnak a CYN termelő *A. ovalisporum* nagy mennyisége és a magas AP-áz aktivitás között (Bar-Yosef et al., 2013). Ez a stratégia (más szervezetek AP-áz termelését serkenti, ahelyett, hogy maga gyártaná az enzimet) előnyös lehet, mivel a toxintermelés nitrogén egységben kifejezett költsége fele az AP-áz költségének, és kevesebb energiát igényel, mint a riboszómális foszfatáz szintézis (Raven., 2010; Bar-Yosef et al., 2013).

Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy a toxintartalom megnő, ha tápanyag limitnek vannak kitéve (fontos hangsúlyozni azért, jónéhány tanulmány az ellenkezőjéről számol be). Kurmayer (Kurmayer., 2011) megállapította, hogy *Nostoc* sp. magasabb MC koncentrációt produkál súlyos növekedési korlátok között, amit a foszfát ($P-PO_4^{3-}$) limitáció okoz. Oh és munkatársai (2000) kimutatták, hogy *Microcystis aeruginosa*-ban növekedett a MC szint P limitáció alatt. A dinoflagelláta *Alexandrium tamarense* 3-4-szeresére növelte a STX termelést P limitált környezetben (Granéli és Flynn, 2006). A dinoflagelláta *Gymnodinium catenatum* és *Alexandrium excavatum*, valamint a kovamoszat *Pseudonitzschia multiseries* esetében is kimutatták, hogy a toxintermelés megnő P stressz hatására (Granéli és Flynn, 2006; Glibert és Burkholder, 2011). Wang és munkatársai (2006) feltételezik, hogy az APase kapcsolatban van a MC termeléssel, mivel toxikus *M. aeruginosa* fokozta az AP-áz aktivitást P limitáció alatt, míg a nem toxikusak nem idézték elő a jelenséget. Lehetséges, hogy ezek a toxinok is hasonló szerepet töltenek be, mint a CYN, azaz segítik a kedvező tápanyag dinamikát, de ezideáig ezt nem vizsgálták: Raven (2010) további vizsgálatokat javasol ezen a területen.

5.3.2.2. Hatás a vas-forgalomra

Számos tanulmány utal arra, hogy MC „vas elszívóként” funkcionál (Utkilen és Gjølme 1995; Lyck et al., 1996; Alexova et al., 2011). A cianobaktériumoknál a vas egy esszenciális elem a chl-a szintézis, a respiráció, a fotoszintézis és a N-fixáció szempontjából. Azonban semleges körüli pH értéken a vas általánosan limitáló tényező. Ez hatással van a víztározókra, melyekben a víz pH semleges körüli vagy gyengén bázikus és toxikus algavirágzások veszélyeztetik. Kimutatták, hogy a MC termelő törzsek hatékonyabb Fe felvevő rendszerrel rendelkeznek, mint a toxint nem termelők (Demott et al., 1991; Utkilen és Gjølme, 1995). Felmerült, hogy a MC egyfajta vas-kelátorként funkcionál a sejtben és ez felelős a szabad vas inaktivációjáért. Azt is felvetették, hogy a MC termelést a sejt szabad Fe mennyisége szabályozza (Utkilen és Gjølme, 1995). Ezt a közelmúltban bizonyították is, Fe-hiányos médium a MC termelésért felelős *mcyD* gén transzkripciójának emelkedését okozta és a MC szintet megemelte (Sevilla et al., 2008). Azonban Alexova és munkatársai (2011) azt találták, hogy néhány gén transzkripciója, mit a *mcyA* és *mcyH*, nem emelkedett a vas mennyiségének csökkenésével, míg a MC koncentráció igen. Alexova és munkatársai úgy gondolják, hogy a toxintermelés előnyt nyújt a vas-stressz korai szakaszában, és esetleg védi a sejtet a reaktív oxigénformák okozta sérülésektől (Alexova et al., 2011).

5.3.2.3 Oxidatív stressz és/vagy C-N metabolizmus

Felvetődött, hogy a MC szerepet játszik az oxidatív stressz túlélésében (Zilliges et al., 2011). Számos tanulmány a *mcy* gének transzkripciójának növekedését mutatta ki olyan körülmények között, melyek elősegítik az oxidatív stressz kialakulását, mint magas fény és vashiányos állapotok (Kaebernick et al., 2000; Borner és Dittman., 2005; Sevilla et al., 2008). Azonban a transzkripció növekedése nem kapcsolódott megnövekedett toxintermeléshez: inkább csökkenő MC koncentrációt jegyeztek le (Kaebernick et al., 2000; Borner és Dittman., 2005; Sevilla et al., 2008; Zilliges et al., 2011). A MC veszteség a toxin fehérjékhez való kötődésével magyarázható (Zilliges et al., 2011). Zilliges et al. (2011) nemrégiben kimutatták, hogy a MC aktívan kötődik olyan fehérjékhez, melyek érzékenyek a redox változásokra, és ez a kötődés erősen növekszik magas fény és oxidatív stressz körülmények között. Zilliges et al. (2011) kimutatták, hogy MC-hiányos mutánsok fogékonyabbak a magas fény és oxidatív stressz körülményekre. Ez arra utal, hogy oxidatív stressz során a MC fontos szerepet játszik a toxintermelő törzsek akklimatizációjában. Zilliges és munkatársai (2011) szintén kapcsolatot mutattak ki a MC és a C metabolizmus között, különös tekintettel a Calvin-ciklusra. Alexova et al. (2007) különbségekről számolt be 6 toxikus és nem-toxikus *Microcystis aeruginosa* fehérjekészletében, és 9 fehérjét talált, amelyek különbözőképpen expresszálódnak a toxikus és nem toxikus törzsek között, mely fehérjék a C-N metabolizmus és a redox állapot fenntartáshoz kapcsolódnak.

Szintén kimutatták, hogy a MC akkumulálódik, ha *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 alacsony koncentrációjú szerves C forrásnak van kitéve. A MC - mutáns esetében alacsony alkalmazkodóképességet mutattak ki ilyen körülmények között a MC termelőkhöz képest (Jahnichen et al., 2007). A MC termelő törzsek MC hiányos törzsek feletti dominanciáját Van de Waal és munkatársai (2011) is kimutatták a közelmúltban. Jahnichen és munkatársai (2007) szerint szerepet játszhat a fotoszintetikus apparátus hatékonyságának növelésében, azáltal hogy alkalmazkodni tud a szerves szénforrás változásához (Jahnichen et al., 2007).

El-Shehawy és munkatársai (2012) szerint a NOD, hasonlóan a MC-hez stresszhelyzetekben képes kötődni a fehérjékhez, és szerepe lehet a fehérjék védelmében, mivel Jonasson és munkatársai (2008) kimutatták, hogy a NOD termelésért felelős gén klaszter expressziójának növekedése nem okozta a termék szintjének emelkedését. Neilan és munkatársai (2012) szerint az intracelluláris CYN szabályozás fehérje szinten is jelen van, mivel nincs korreláció a *cyr* klaszter transzkripciója és a toxinkoncentráció között.

Összefoglalva, az eddigi adatok szerint egyes fajoknál a toxinoknak szerepük van a túlélőképesség fokozásában az oxidatív stresszválaszok és/vagy C-N metabolizmus megváltozása során, de ennek konkrét jellege nem ismert.

5.3.2.4. A homeosztázis fenntartása

A STX-t a cianobaktériumokban a Na^+ homeosztázis fenntartásával hozták összefüggésbe. Pomati és munkatársai (2003) kimutatták, hogy azok a cianobaktériumok (*C. raciborskii* és *A. circinalis*) melyek képesek STX-t termelni, képesek voltak megelőzni a nátrium pumpa gátló veratridin (VTD) és a vanadátok (VAN) által okozott sejtlízist, míg

toxint nem termelők esetében teljes sejtlízist figyeltek meg. Ugyanezekhez a toxint nem termelő törzsekhez a VTD és VAN kezelések előtt történő STX hozzáadás megakadályozta a sejtlízist. Az STX-ről kimutatták azt is, hogy enyhíti a VTD metabolizmusra gyakorolt kedvezőtlen hatását. Egy másik tanulmányban emelkedett Na^+ stressz változást okozott a STX termelésben, STX akkumulációt figyeltek meg magas intracelluláris Na^+ esetében (Pomati et al., 2004). Lidokain hozzáadása (Na^+ pumpa gátló) szintén a STX akkumulációjához vezetett, míg amilorid jelenlétében (Na^+ blokkoló) STX akkumulációt nem figyeltek meg (Pomati et al., 2003; Pomati et al., 2003; Pomati et al., 2004). Ez szintén alátámasztja, hogy a STX funkcionális szerepet játszhat a cianobaktériumokban a Na^+ csatornák blokkolásában, hogy csökkentse a Na^+ stresszt és fenntartsa Na^+ homeosztázist. Ismerve a STX eukarióta Na^+ csatorna blokkoló hatását, nem ésszerűtlen azt feltételezni, hogy a STX ökológiai szerepe is hasonló lehet. Ha a STX szerepe az, hogy limitálja a Na^+ felvételt magas pH vagy só stressz esetén, akkor ez versenyelőnyt biztosít a STX termelő fajoknak a nem termelőkkel szemben, ami segít megmagyarázni a STX jelenlétét a legkülönbözőbb vízi környezetben a tengerektől az édesvizekig.

Bár jelenleg nincs bizonyíték arra, hogy az anatoxin-a-nak szerepe van a Na^+ homeosztázisban, ez továbbra is lehetséges. Az anatoxin-a mérgezést okoz a gerincesekben azáltal, hogy kötődik a Na^+ csatornák nikotin receptoraihoz és azok nyitódását okozza, amin keresztül a Na^+ beáramlik és az ideg és izomsejtek túlstimulálását okozza, ami bénuláshoz vezet (Bownik, 2010). Az anatoxin-a ezért ellentétes szerepet játszhat a Na^+ homeosztázis esetében mint a STX. Alacsony Na^+ szint esetén az anatoxin-a szerepet játszhat a Na^+ felvételében a Na^+ csatornák nyitása révén. Mindkét toxin termelésének képességét feljegyezték számos nemzetség esetében (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*) és elképzelhető, hogy ezeket a toxinokat azért termelik, hogy segítsék fenntartani a Na^+ homeosztázist különböző körülmények között.

5.3.2.5. Jelátvivő molekulák

A cianobaktériumok által termelt toxinok funkcionálhatnak jelátvivő molekulákként. Schatz és munkatársai (2007) kimutatták, hogy MC kezelés hatására *Microcystis* sejtekben növekedett a nettó MC termelés. A szerzők szerint a *Microcystis* populáció egy töredékének lízisét a többi sejt érzékeli e peptid típusú toxinok megjelenése révén, amely lehetővé teszi a többi sejt számára, hogy válaszoljanak erre és toxikus vegyületek termelésével növeljék ökológiai fitneszüket (Schatz et al., 2007).

A kolóniák kialakulásában is szerepe van a MC-nek (Kehr et al., 2006; Zilliges et al., 2008; Gan et al., 2012). Gan és munkatársai (2012) kimutatták, hogy MC-ek szignifikánsan növelték a kolóniák méretét számos *Microcystis* faj esetében. Mikrobiális degradáción keresztül történő extracelluláris MC csökkenés a kolóniák méretének csökkenését okozta: ez azt mutatja, hogy a MC szükséges a kolóniák méretének fenntartásában. Kurmayer és munkatársai (2003) szintén azt találták, hogy egy berlini tóban a nagyobb *Microcystis* kolóniák magasabb arányban tartalmaztak toxintermelőket, mint a kis kolóniák. A MC az extracelluláris poliszacharidok (EPS) termelésének növekedését és 4 poliszacharid szintézis-

kapcsolt gén (*capD*, *csaB*, *tagH*, *epsL*) up-regulációját okozta. Az EPS-ek összefüggésbe hozhatók a sejt aggregátumokkal, megtalálhatók főként a nyálkákban vagy a tokban és befolyásolják a sejtfelület ragadósságát, ami lehetővé teszi a kolóniaképzést számos algafajnál. A sejtek poliszacharid rétegéről szintén kimutatták, hogy megvastagszik MC hatására (Gan et al., 2012). Az EPS termelés összefüggésben áll a stresszkörülményekkel, mint a predáció és a kedvezőtlen környezeti feltételek. A MC-nek az a képessége, hogy növeli az EPS-t és fokozza a kolóniák kialakulását, a toxintermelő számára előnyt nyújthat a fogyasztókkal és a stresszkörülményekkel szemben (Gan et al., 2012).

5.3.3. A toxinok szerepének megértése

A mai napig a legtöbb kutatás arra irányult, hogy megértsük azokat a fizikai – kémiai feltételeket, amelyek kiváltják a toxintermelést. Azonban úgy tűnik, hogy egy sokkal átfogóbb és holisztikus rendszer megközelítésre van szükség, hogy megértsük azt, hogy a környezeti feltételek, a forráskompetíció és a sejtfiziológia együttesen hogyan hatnak kölcsönösen egymásra és hogyan ösztönzik a toxicitást és stimulálják a toxintermelést. Két fő irányzat tűnik valószínűnek, az egyik a közvetlen versenyelőny biztosítása a fogyasztás elleni védelem illetve allelopátia révén; a másik egy belső fiziológiás szabályozó szerep, amely szintén előnyt biztosít, de indirekt módon más sejtfolyamatok közvetítésével (Bácsi et al., 2013).

Figyelembe véve a toxinok lehetséges ökológiai szerepét, fontos kiemelni, hogy a cianobaktériumok és toxinjaik hosszú ideje jelen vannak a Föld bioszférájában. A Föld környezete jelentősen más volt abban az időben, mikor a cianobaktériumok kialakultak. A tény, hogy a toxintermelés fennmaradt ilyen hosszú időn át – a metabolikus költségek ellenére – azt sugallja, hogy a toxinok hosszútávon kompetitív előnyt biztosítanak. Ha ez nem így lenne, akkor a toxintermelésért felelős gének valószínűleg elvesztek volna az idő során az új környezeti nyomás hiányának hatására. Ennek kapcsán érdemes azért megjegyezni, hogy számos izolátumot ismerünk, amelyben a toxintermelésért felelős génklaszter hiányosan vagy működésképtelen formában van jelen (Farkas et al., 2014).

Azt is meg kell említeni, hogy az eredeti funkció valószínűleg mutálódott vagy elveszett az evolúciós időszak alatt, esetleg új funkciókkal helyettesítődtek. Számos kérdés maradt megválaszolatlan a toxintermeléssel kapcsolatosan, például a *Cylindrospermopsis raciborskii* képes számos CYN analóg termelésére, továbbá STX és anatoxinok termelésére is; és a MC termelők esetében is kb. 80 variáns ismert (Vasas et al., 2010).

Leegyszerűsítve a dolgot, ez tekinthető többszörös nyomás eredményének, de ennek sajátosságáról nem tudunk eleget. Izgalmas kérdés miért léteznek toxikus és nem toxikus törzsek, ráadásul látszólag hasonló sikerességgel. Lehetséges, hogy a nem toxikus törzsek előnyre tesznek szert/kihasználják a toxintermelést, anélkül, hogy hozzájárulnának a szintézis költségeihez. Fontos kérdés, hogy valóban milyen számban vannak jelen a nem toxikus törzsek, melyek lehetséges, hogy megfelelő antibiotikus hatással bírnak, csak a jelenlegi ismereteink szegényesek a kérdéssel és számos speciális hatású metabolit vár még felfedezésre.

Ahhoz, hogy tisztább képet kapjunk arról, hogy a toxikusság fennmarad-e a jövőben, szükség van a biotikus és abiotikus hatások közötti szinergizmus toxintermelésre gyakorolt

hatásnak vizsgálatára. Ideális esetben ez laboratóriumi vizsgálatokkal járna, melyeket terepi megfigyelésekkel és molekuláris adatokkal, mint pl. a génklaszter átíródásának mérésével igazolnának azonos körülmények között.

Az algatoxinoknak valószínűleg sokféle szerepük van: ezek változnak a különböző toxinok és a toxintermelő fajok esetében. Bármely toxin bírhat egy vagy több funkcióval, de ezek biztos megállapítása vitatott az egyes vegyületek és termelő fajok esetében.

A globális klímaváltozás hatására a toxintermelő cianobaktériumok egyre szélesebb köre tör előre és fog előretörni a szubtrópusi és mérsékelt éghajlaton, a fajok egyre nagyobb része lesz kitéve mérgezésnek és toxin-akkumulációnak. Az eutrofizáció erősödése és a tározók kialakítása szintén olyan faktorok, amik elősegíthetik a toxintermelők gyakoriságának növekedését. A toxinok ökológiai szerepének és a termelést kiváltó faktoroknak a megismeréséhez, valamint annak megértéséhez, hogy milyen komplex körülmények/feltételek befolyásolják a toxikus kapacitást valamint a toxintermelés szintjét, további elméleti és gyakorlati kutatások szükségesek (Kinneer, 2010).

5.4. Nitrogén, foszfor- és kénéhezés hatása az *Aphanizomenon ovalisporum* cilindrospermopszin termelésre

Az *Aphanizomenon ovalisporum* az oxigéntermelő, fotoszintetizáló baktériumok (Cyanobacteria) divízióján belül a Nostocales rendbe, a Nostocaceae családba tartozik. Az *Aphanizomenon* nemzetségre jellemző, hogy a fonalak egyenesek, vagy közel egyenesek, többnyire magányosak, ritkán nyalábokat alkothatnak. A fonal végén a sejtek elvékonyodnak (sokáig ez volt az egyik legfontosabb bélyeg az *Aphanizomenon* és az *Anabaena* genuszok megkülönböztetésében). Az *A. ovalisporum* a légköri nitrogén megkötésére képes fonalas faj, azaz kötött nitrogén hiányában a kifejlett fonalakon heterociszták is megtalálhatók (Hadas et al., 1999). A fonalat alkotó vegetatív sejtek hosszúkásak, a sejthatárok jól kivehetőek (kismértékű befűződés látható a fonálon). A heterociszták gömbölyűek, vagy kissé elliptikusak, mindig egyesével, a vegetatív sejtek között található a fonálon, soha nem képződnek a fonal végén, és nem fordulnak elő csoportosan. Az érett heterociszták a vegetatív sejtektől jól megkülönböztethetők. A Nostocales rend többi nemzetségére jellemző módon az *A. ovalisporum* esetében is megtalálhatók a speciális szaporító- és kitartó képletek, az akinéták. Az akinéták gömb vagy ovális alakúak, szintén a vegetatív sejtek között figyelhetők meg a fonálon. Irodalmi adatok szerint legtöbbször egyesével fordulnak elő, ritkán azonban egymás mellett kettő, vagy több akinéta is kialakulhat (Berman, 1997).

Az *A. ovalisporum* elsősorban a trópusi, szubtrópusi területeken tömeges, de a mérsékelt övben, így hazánkban is előfordul (Vasas et al., 2010). A faj a vízvirágzást okozó cianobaktériumok között tartható számon, legismertebb az 1994-ben, az izraeli Kinneret-tóban lezajlott tömeges elszaporodása (Berman, 1997; Pollingher et al., 1998; Hadas et al., 1999). Shaw és munkatársai leírták a faj virágzását Ausztráliában (Shaw et al., 1999), a közelmúltban pedig két görögországi tóban való megjelenéséről számoltak be (Gkelis et al., 2005).

Az *A. ovalisporum* toxikus cianobaktérium. A Kinneret-tóból izolált törzs által termelt toxint Banker és munkatársai (1997) jellemezték, a toxin a citotoxikus alkaloidok közé tartozó

cilindropermopszinnek bizonyult. Későbbi vizsgálatok azt mutatják, hogy az izolált toxikus törzsek mindegyike cilindropermopszint termel. (Shaw et al., 1999; Gleiks et al., 2005). A toxin szintézisében résztvevő enzimek, és az enzimeket kódoló gének azonosításra kerültek (Shalev-Alon et al., 2002; Kellmann et al., 2006). A Kinneret-tóból származó törzsből egy cilindropermopszin-származékot, a 7-epicilindropermopszint is izoláltak (Banker et al., 2000). A toxin szintéziséért felelős enzimeket kódoló gének feltérképezése mellett, illetve annak segítségével Kellmann és munkatársai a cilindropermopszint termelő cianobaktériumok filogenetikai kapcsolatait is megpróbálták feltárni.

A korábban, a 16S rDNS szekvenciák felhasználásával készült törzsfák szerint a különböző *Cylindropermopsis raciborskii* törzsek alkotnak egy csoportot, a másik csoportot – a morfológiai különbségek ellenére – az *Umezakia natans*, az *Aphanizomenon ovalisporum* fajok ismert törzsei, illetve az *Anabaenopsis* és a *Cyanospira* genuszok alkotják. Más *Aphanizomenon* fajok és az *Anabaena* genusz tagjai 93%-os vagy kisebb homológiát mutattak a 16S rDNS szekvenciában, így jól elkülöníthetők a fenti csoportoktól (Neilan et al., 2003). A cilindropermopszin szintézisében résztvevő enzimeket (poliketid-szintáz, amidinotranszferáz és protein-szintetáz) kódoló gének (*aoaA*, *aoaB* és *aoaC*) mindegyike megtalálható minden, genetikailag már vizsgált cilindropermopszint termelő cianobaktériumban. A szekvencia adatok alapján a *Cylindropermopsis raciborskii* törzsek egy csoportot alkotnak, míg a másik csoportba az *Umezakia natans*, és az *Aphanizomenon ovalisporum* izolátumai tartoznak, alátámasztva a 16S rDNS alapján kapott eredményeket. Az *Aphanizomenon ovalisporum* Izraelben izolált törzse (ILC-146) nagyobb homológiát mutat az *Umezakia natans*-szal, mint az Ausztráliában (APH028A) izolált törzs (Kellmann et al., 2006). Az *A. ovalisporum* cilindropermopszin termelése és a környezeti faktorok közötti összefüggések vizsgálatára vonatkozóan elmondható, hogy e téren hiányosak az irodalomban fellelhető ismeretek.

5.4.1. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedésének nyomon követése

Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedésének nyomon követésére alkalmas módszer a klorofill-a-, a fehérje- és a szárazanyag-tartalom vizsgálata, illetve a sejtszám meghatározása. A vizsgálatok során a különböző tápeleméhezés (szulfát, foszfát, nitrát) valamint az éhezésből az adott tápelem visszaadása után regenerálódó tenyészetek növekedését követtük nyomon (Bácsi et al., 2006; 2007).

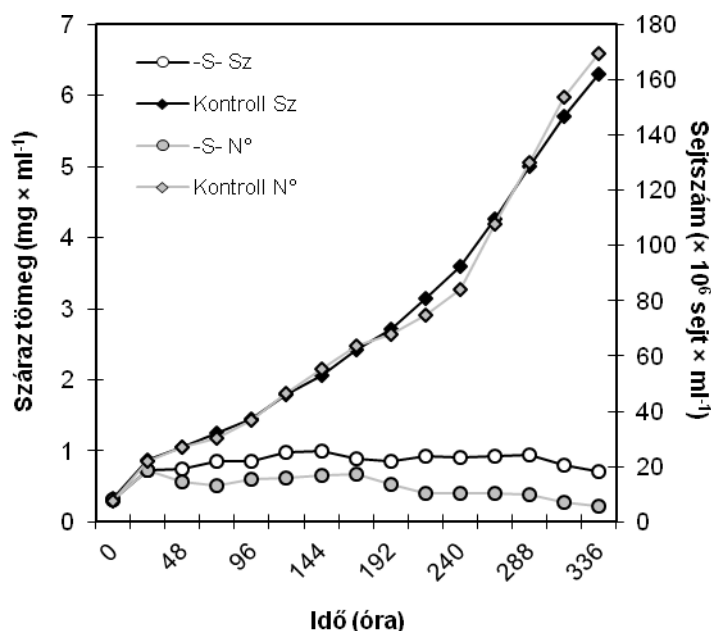
5.4.1.1. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedése a kénéhezés körülményei között

Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedésének eredményei a kénéhezés körülményei között a 11. ábrán láthatók. A szulfátéheztetett tenyészet növekedése rögtön megállt, függetlenül attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-S-), vagy a 48. órában kezdődött (+S-, 11. a, c ábra). A klorofill-tartalom drasztikus csökkenése kén hiányában általánosan megfigyelt jelenség a cianobaktériumok körében. A tilakoidok dezorganizálódásának oka, hogy a szervezet a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc

kéntartalmú elemeiből próbálja fedezni a fehérjeszintézis kén szükségletét (Ariño et al., 1995). A száraz tömeg nem jelentős, de egyértelmű növekedést mutatott a kénéheztetett tenyészetben (11. ábra, fehér körök), szemben a klorofill-a tartalommal illetve a sejtszámmal. Ennek oka az az egyes cianobaktériumoknál már megfigyelt jelenség, hogy kénézés során a sejtterfogat nagy részét glikogén és polihidroxivajsav granuláumok (Schmidt et al., 1982; Wanner et al., 1986), illetve polifoszfát testek (Lawry és Jensen, 1979) töltik ki. A kénézés cianoficin akkumulációt is indukál több fonalas faj esetében (Allen et al., 1980; Lawry és Simon, 1980). A sejtszám és a száraz tömeg összefüggései, valamint mikroszkópos megfigyeléseink alapján azt mondhatjuk, hogy ezek a jelenségek az általunk vizsgált törzs esetében is megfigyelhetők. A sejtszám és a száraz tömeg összefüggését a kontroll, illetve a kénéheztetett tenyészetekben a 11. ábra mutatja.

A 48 órán át éheztetett tenyészetben a szulfát 48. órában való visszaadását követően a 96.-120. órától (azaz 48-50 órás lag periódus után) jelentős növekedés indult meg. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a 48 óránál hosszabb ideig kénéheztetett tenyészetben a szulfát visszaadása már nem eredményezi a tenyészet regenerálódását (nem ábrázolt adatok). Ebből arra következtethetünk, hogy a cianobaktériumoknál általánosan megfigyelhető módon az általunk vizsgált *Aphanizomenon ovalisporum* törzs sem rendelkezik olyan kéntartalékokkal, amelyek a sejtek osztódását – a tenyészet növekedését – hosszabb időn keresztül (néhány napon túl) lehetővé tennék.

A 48. óra elteltével szulfátmentes médiumba átvitt tenyészet növekedése leállt, ahogyan azt a tenyésztés kezdetétől kénéheztetett tenyészet esetében megfigyelhettük. A klorofill-a koncentráció értékeit $\mu\text{g kl-a ml}^{-1}$ -ben, a száraz tömeget $\text{mg száraz tömeg ml}^{-1}$ -ben, a sejtszámot 10^6 sejt ml^{-1} egységben adtuk meg (Bácsi et al., 2006; 2007).

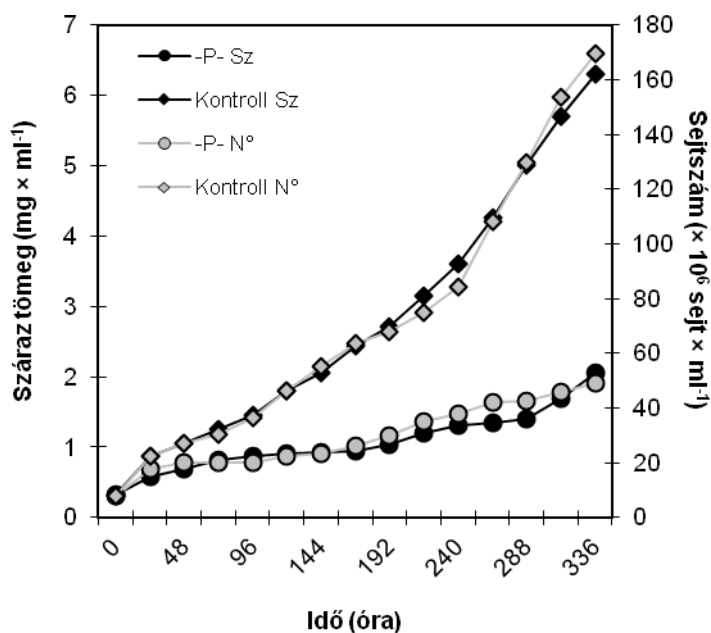


11. ábra. A száraz tömeg (Sz) és a sejtszám (N°) összevetése a kontroll (Kontroll, -♦-, -♦-) és a szulfátéheztetett (-S-, -○-, -○-) tenyészetekben.

5.4.1.2. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedése a foszforéhezés körülményei között

A foszfátéhezés során kapott növekedési eredményeket a 12. ábra mutatja. A foszfátéheztetett tenyészet (-P-) növekedése lelassult, azonban a tenyészet több mint hatszorosa növekedést ért el a kiindulási állapothoz képest, ami – figyelembe véve a P_i teljes hiányát a médiumban – arra enged következtetni, hogy a törzs jelentős foszforraktárakkal rendelkezik, amelyek lehetővé teszik a sejtek osztódását, a tenyészet jelentősebb növekedését. Foszforéhezés során a sejtszám és a száraz tömeg változása nem mutat olyan különbséget, mint az a kénéhezés során megfigyelhető volt (12. ábra). A foszforéhezés körülményei között a sejtekből eltűnő polifoszfát testek miatt nem változik jelentősen a száraz tömeg, megváltozik viszont a sejtek ultrastruktúrája, amit a mikroszkópos képek is alátámasztanak. Ez a fonalas cianobaktériumok körében is ismert jelenség (Jensen és Sicko, 1974) tehát az általunk vizsgált törzs esetében is megfigyelhető.

A foszfátot a 168. órában visszacapott (-P+) tenyészetben a klorofill-a tartalom, a száraz tömeg és a sejtszám tekintetében is szinte „azonnal” (már a 8. naptól – 192 óra) jelentős növekedés indult meg, amely elsősorban a sejtszámban, de a klorofill-a tartalomban és a száraz tömegben is megmutatkozott. A növekedési vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a törzs rövid időn belül rendkívül nagy mennyiségű foszfátot képes felvenni, és azt az anyagcserében hasznosítani. Kísérleteink szerint a 8, sőt 9 napos foszforéheztetett tenyészetek is képesek a foszfát visszaadását követően regenerálódni (nem ábrázolt adatok). A +P-tenyészet növekedése a 168. órában foszfátmentes médiumba való áttöltést követően a foszforéheztetett (-P-) tenyészetben tapasztalható módon változott meg mind a klorofill-a tartalom, mind a sejtszám, mind pedig a száraz tömeg alapján (Bácsi et al., 2006; 2007).

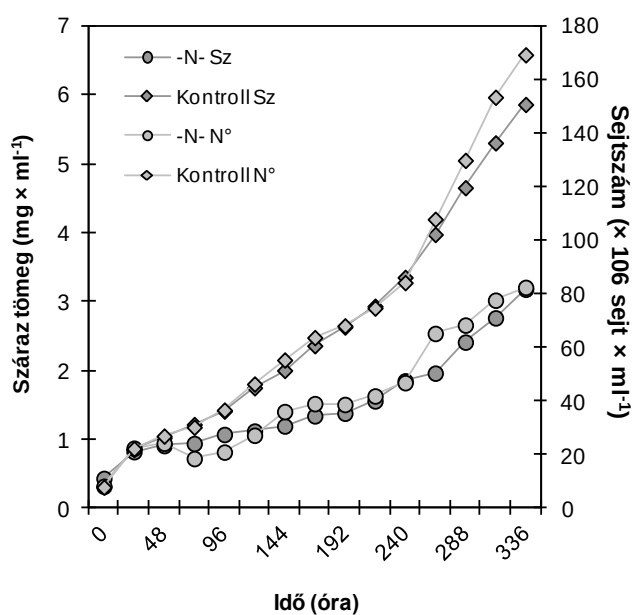


12. ábra. A száraz tömeg (Sz) és a sejtszám (N°) összevetése a kontroll (Kontroll, -♦-, -◇-) és a foszfátéheztetett (-P-, -●-, -○-) tenyészetekben.

5.4.1.3. Az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetek növekedése a nitrogénéhezés körülményei között

A nitrogénéhezés során kapott növekedési eredményeket a 13. ábra mutatja be. A nitrogénéhezés speciális esetet képvisel, mivel az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium képes a légköri nitrogén megkötésére. Ennek ellenére a teljesen nitrátmentes médiumba átvitt tenyészet 96-120 órán belül elpusztult (nem ábrázolt adatok). Ahhoz, hogy a heterociszták kialakuljanak, meginduljon a légköri nitrogén megkötése, biztosítani kellett, hogy a médium oldott nitrogéntartalma „fokozatosan”, és ne „egyszerre” fogyjon el. Ezért a nitrogénéhezéshez a teljes tápoldat nitrogéntartalmához képest 2% nitrogéntartalmú Allen médiumot alkalmaztunk, melyben a nitrogén NH_4NO_3 formájában volt jelen. Ilyen körülmények között a -N- tenyészet az első 96 órában lassan, majd a heterociszták kialakulását és működésbe lépését követően egyre fokozottabban, de a kontroll tenyészetnél mindig alacsonyabb rátával növekedett mindhárom növekedési paraméter alapján. Az éhezés hasonló módon játszódik le a 168. órában nitrátmentes médiumba átvitt (+N-) tenyészet esetében is. Azt mondhatjuk tehát, hogy a törzs 4-5 napra elegendő nitrogén pool-lal rendelkezik, amely nem elegendő a heterociszták differenciálódásához. Ehhez a táptalajban minimális mennyiségű oldott nitrogénre van szükség, amelynek elfogyása során jönnek létre, és lépnek működésbe a heterociszták, és teszik lehetővé a tenyészet további növekedését. A száraz tömeg és a sejtszám összefüggését vizsgálva megállapítható, hogy a sejtek tömege és száma közel azonos mértékben változik a tenyésztés során.

A 168. órában a nitrátot visszakapott (-N+) tenyészetben a növekedés csak a tenyésztés utolsó három napjában indult meg jelentősen. Azt mondhatjuk tehát, hogy nem figyelhető meg a foszfát visszaadásához hasonlóan gyors nitrátfelvétel és ennek következtében gyors regenerálódás (Vasas et al., 2014).



13. ábra. A száraz tömeg (Sz) és a sejtszám (N°) összevetése a kontroll (Kontroll, -♦-, -♦-) és a nitrátéheztetett (-N-, -●-, -●-) tenyészetekben.

5.4.2. A toxintartalom vizsgálata

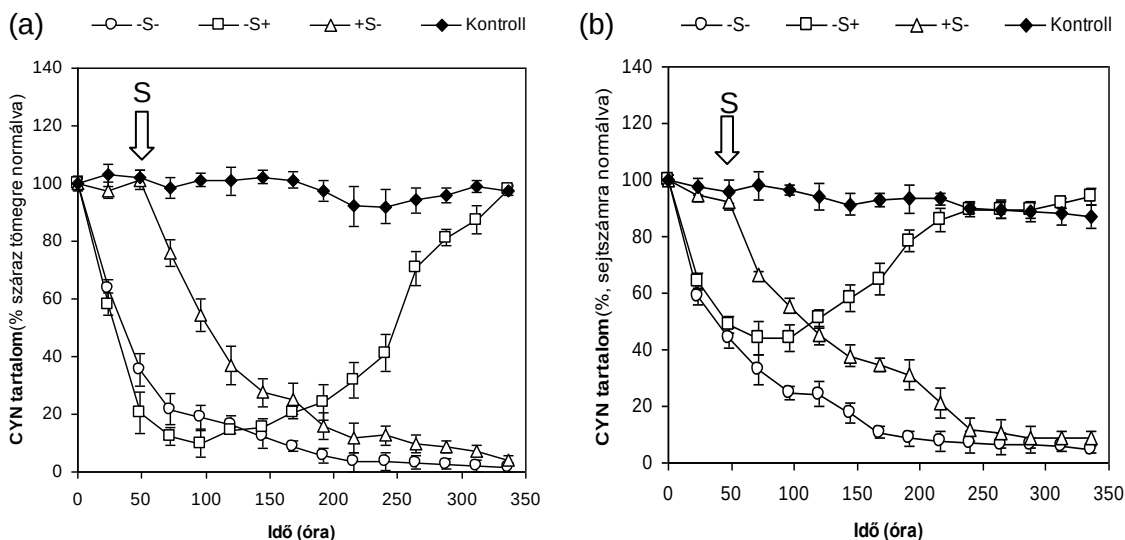
A tenyészetek tényleges toxintartalmát a kapilláris elektroforézis (CE) műszeres analitikai módszer alkalmazásával határoztuk meg (Vasas et al., 2002). A sejtek toxintartalmát μg toxin/mg szárazanyag egységre illetve μg /toxin sejt egységre normálva, %-ban adtuk meg. 100%-nak a kiinduláskor a kontrollban mért értéket (μg toxin mg szárazanyag⁻¹ illetve sejt μg toxin⁻¹ mennyiséget) tekintettük.

5.4.2.1. A toxintartalom változása a kénéheztetett *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben

A kontroll tenyészetben a toxintartalom a tenyésztés teljes ideje alatt közel állandó értéket mutatott, a toxintartalom sem száraz tömegre, sem sejtszámra vonatkoztatva nem változott jelentősen az *A. ovalisporum* sejtekben (14. a ábra, fekete rombuszok).

A kénékezés körülményei között a tenyésztés előrehaladtával a tenyészet cilindropermopszin tartalma folyamatosan csökkent függetlenül attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-S-; 14. a-b ábra, fehér körök), vagy 48 óra elteltével kezdődött (+S-; 28. a-b ábra, fehér háromszögek). A toxintartalom csökkenésének mértéke különbözik attól függően, hogy a toxintartalmat száraz tömegre vagy sejtszámra vonatkoztatva adjuk meg (14. a-b ábra). Száraz tömegre vonatkoztatva a kiindulási cilindropermopszin tartalom körülbelül a 20 %-ára esik vissza 48 óra alatt, míg sejtszám alapján számítva a toxintartalmat, a 48 óra elteltével mérhető mennyiség a kiindulási érték több, mint 40 %-a. Erre a jelenségre magyarázatul szolgálnak a növekedés vizsgálata során tapasztaltak. A kénékezés során nagyon hamar megáll a sejtszám változása, ezzel szemben a száraz tömeg hosszabb időn keresztül emelkedik, azaz, egy sejt száraz tömege nagyobb lesz az éhezés előrehaladtával a felhalmozódó granulumoknak köszönhetően. Így érthetővé válik, hogy miért tűnik száraz tömegre vonatkoztatva ugyanaz a cilindropermopszin mennyiség „kevesebbnek”. Mindez azt sugallja, hogy az adott kísérlet céljától függően körültekintően kell megválasztani azt a paramétert, amelyre a toxintartalmat vonatkoztatni kívánjuk.

A 48 órán át kénéheztetett, majd a szulfátot visszkapott tenyészetben (-S+; 14. a-b ábra, fehér négyzetek) a cilindropermopszin tartalom egy 35-40 órás lag periódus után emelkedni kezdett, a tenyésztés utolsó harmadában elérte a kontrollban mérhető értéket. Amennyiben tehát a szulfátot az éhezés olyan időpontjában adjuk vissza, amikor a tenyészet növekedése még regenerálódni képes, akkor a toxintermelés is visszaáll az eredeti szintre (Bácsi et al., 2006; 2007).

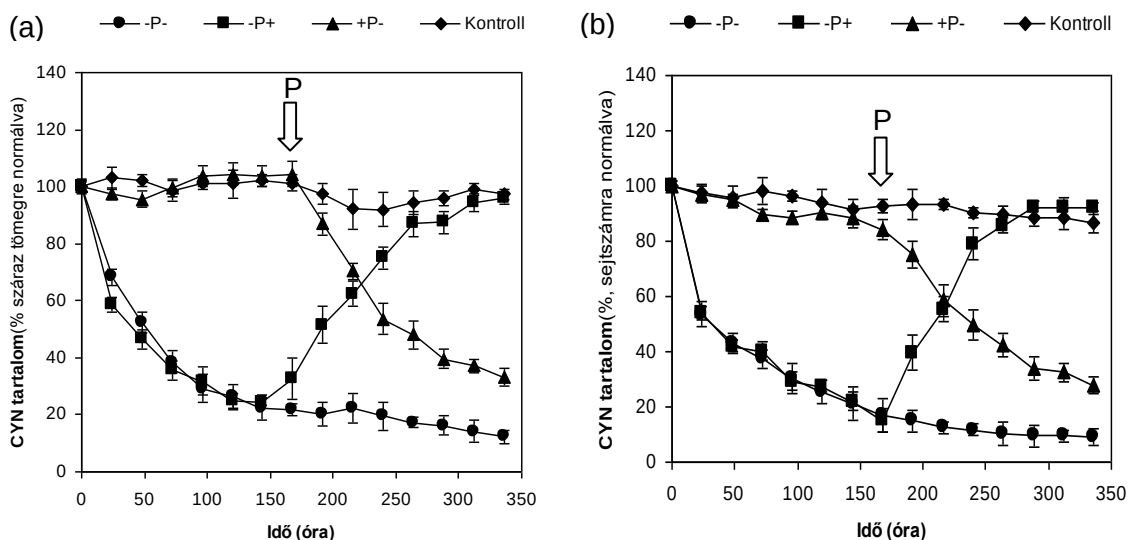


14. ábra. (a) A cilindropermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatva az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben a szulfátéhezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindropermopszin mennyisége $5,21 \mu\text{g mg}^{-1}$ száraz tömeg (a), illetve $2,17 \text{ pg per sejt}$ (b). Ezeket a mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindropermopszin tartalmat. A nyíl a szulfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet szulfátmentes médiumba való áttöltésének időpontját jelöli.

5.4.2.2. A toxintartalom változása a foszforéheztetett *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben

A foszforéhezés körülményei között a tenyésztés előrehaladtával a tenyészet cilindropermopszin tartalma folyamatosan csökkent, függetlenül attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-P-), vagy 168 óra elteltével (+P-) kezdődött (15. a-b ábra, fekete körök, illetve fekete háromszögek), ahogyan azt a kénéhezés esetében is megfigyelhettük. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy a foszforéhezés során nem tapasztalható lényeges különbség a toxintartalom csökkenésében a száraz tömegre vonatkoztatott, illetve a sejtszámra vonatkoztatott adatok között (mindkét esetben a kiindulási érték 40 %-ára csökken a cilindropermopszin tartalom 48 óra alatt; 15. a-b ábra, fekete körök). Ennek magyarázata szintén a növekedésvizsgálatok eredményeiben keresendő. A foszforéhezés során nem tapasztaltunk számottevő különbséget a sejtszám, illetve a száraz tömeg változása között (12. ábra), vagyis a sejtek tömege közel azonos mértékben változott, mint a számuk, ezért nincs jelentős különbség a száraz tömegre vonatkoztatott, illetve a sejtszámra vonatkoztatott adatok között (Bácsi et al., 2006; 2007).

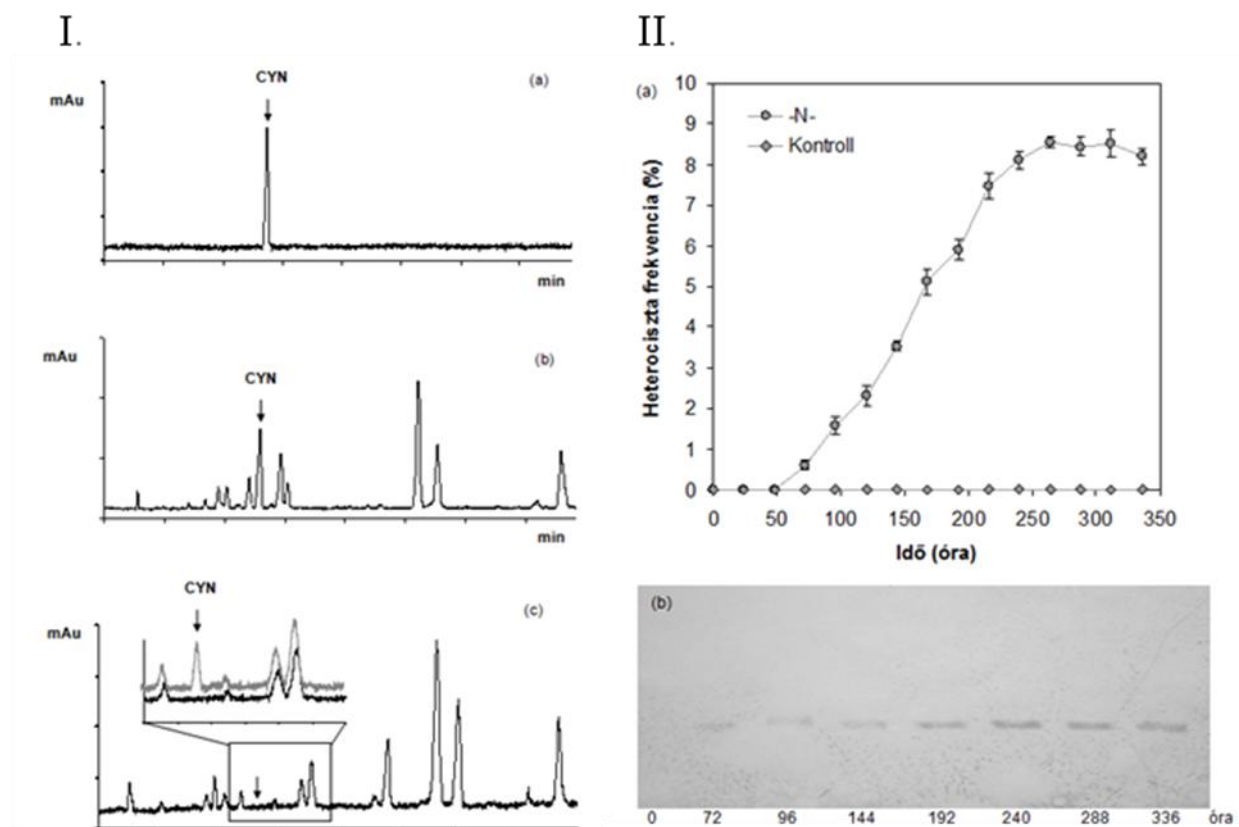
A 168 órán át tartó éhezés után a foszfátot visszkapott tenyészetben (-P+) a cilindropermopszin tartalom rögtön, 24 óránál rövidebb lag periódus után növekedni kezdett (15. a-b ábra, fekete négyzetek). Ez is azt bizonyítja, hogy az *A. ovalisporum* sejtek rövid idő alatt nagy mennyiségű foszfát felvételére, és annak az anyagcserében való gyors hasznosítására képesek.



15. ábra. (a) A cilindropermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejtszámról vonatkoztatva az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben a foszfátéhezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindropermopszin mennyisége $5,12 \mu\text{g mg}^{-1}$ száraz tömeg (a), illetve $2,12 \text{ pg}$ per sejt (b). Ezeket a mennyiségeket 100%-nak tekintettük, a továbbiakban ez alapján számítottuk a cilindropermopszin tartalmat. A nyíl a foszfát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet foszfátmentes médiumba való átoltásának időpontját jelöli.

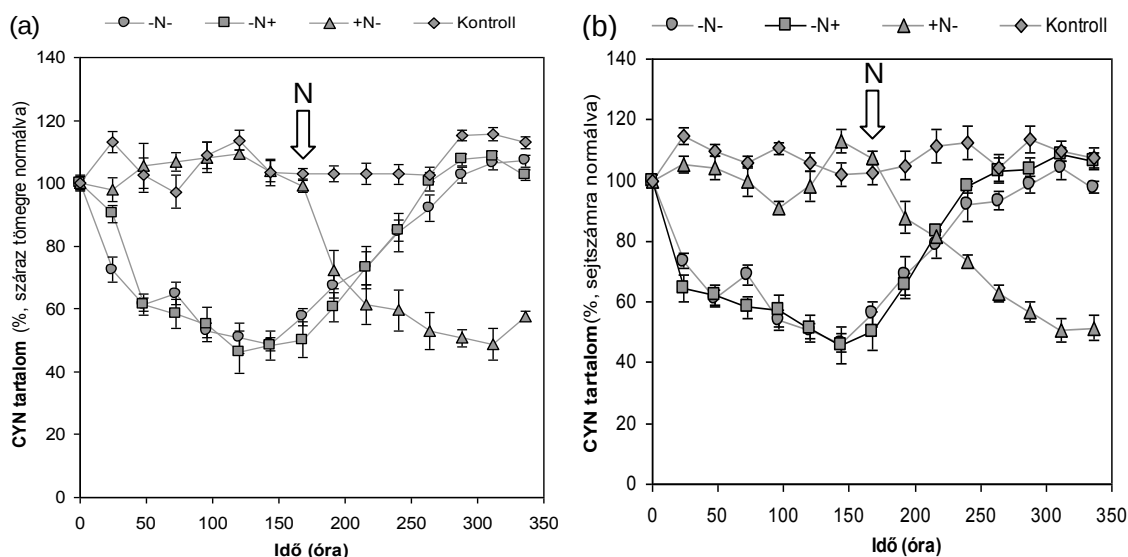
5.4.2.3. A toxintartalom változása a nitrogénéhezettett *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben

A nitrogénéhezés körülményei között a tenyésztés előrehaladtával a tenyészet cilindropermopszin tartalma sajátos dinamika szerint változik, függetlenül attól, hogy az éhezés a tenyésztés elején (-N-), vagy 168 óra elteltével (+N-) kezdődött. A tenyésztés első 6 napján (144 óra) a toxintartalom csökken, 48 óra alatt a kiindulási érték 61 %-ára, a 6. napra 46,5 %-ra. A 7. naptól kezdődően azonban emelkedni kezd a toxintartalom, a tenyésztés utolsó harmadában a kontrollban mérhető értéknél 5-8%-kal alacsonyabb szinten stabilizálódott. Ezen eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a nitrogénéhezés következtében csökken a sejtek cilindropermopszin tartalma. Az érett heterociszták kialakulása (16. ábra), az aktív nitrogénkötés megindulása után azonban a toxintartalom újra növekedésnek indul, a tenyésztés végére a kontrollnál alacsonyabb szinten stabilizálódik. A heterociszták toxintartalmának vizsgálata során kimutattuk, hogy azok cilindropermopszint nem tartalmaznak (16. I c ábra; Vasas et al., 2013).



16. ábra. I. A heterociszták cilindrospermopszin tartalmának vizsgálata kapilláris elektroforézis (CE) módszerrel. (a) A tiszta cilindrospermopszin (CYN) elektroferogramja. (b) A vegetatív sejtek elektroferogramja, a nyíl a cilindrospermopszin csúcsot jelöli. (c) Az izolált heterociszták elektroferogramja. A bekeretezett részben a nyíl a cilindrospermopszin csúcs helyét jelöli. A kinagyított részben feketével jelöltük a tisztított heterociszták kivonatának elektroferogramját, szürkével a tiszta cilindrospermopszinnal kiegészített heterociszta-kivonat elektroferogramját. II. A heterociszta frekvencia változása (a), illetve a nitrátéhezés mennyiségének változása az idő függvényében (b) a nitrátéhezés során (Vasas et al., 2013).

A nitrátéhezés során tehát a vegetatív sejtek toxintartalma csökken, majd a megfelelő nitrogénellátás kialakulása után a kontroll sejtekre jellemző értékre áll vissza. A heterociszták cilindrospermopszint nem tartalmaznak, így a stabil, működő heterocisztákat tartalmazó nitrátéheztetett tenyészetben az összes toxintartalom a kontrollban mérhető érték alatt marad (17. ábra; Vasas et al., 2013).



17. ábra. (a) A cilindrospermopszin-tartalom változása száraz tömegre és sejtszámra vonatkoztatva az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben a nitrátéhezés során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindrospermopszin 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 cilindrospermopszin tartalmat. A nyíl a nitrát visszaadásának, illetve az addig teljes médiumban nevelt tenyészet 2% oldott nitrogént tartalmazó médiumba való átoltásának időpontját jelöli.

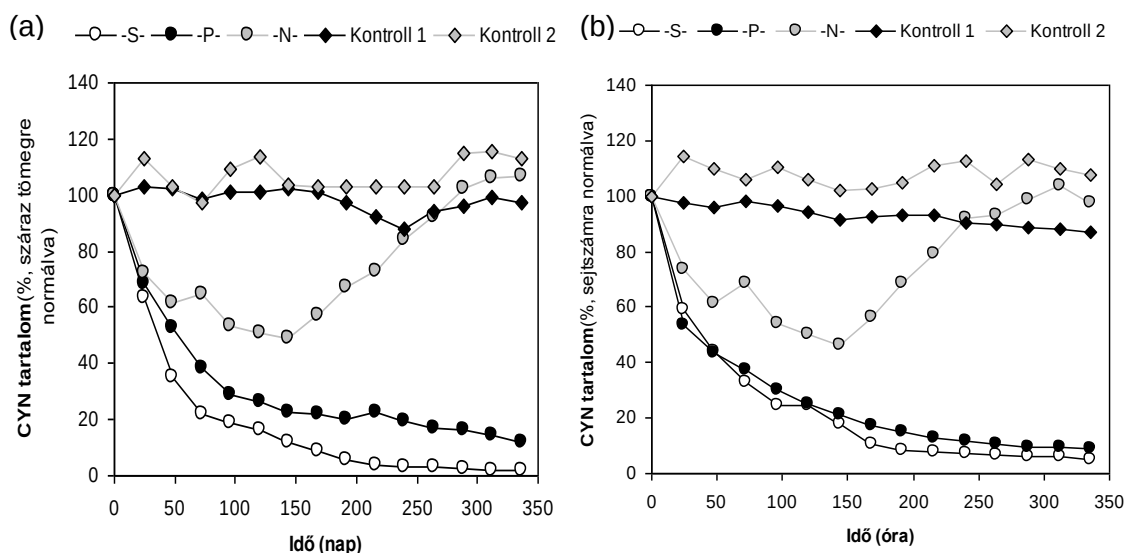
5.4.2.4. A toxintartalom változásának összehasonlítása a különböző éhezési körülmények között

Az előbbieket alapján látható, a szulfát, a foszfát és a nitrát hiánya is a cilindrospermopszin 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; 18. a ábra, fehér körök). A foszfát hiányában mérsékelt csökkenést tapasztalhattunk (a kiindulási érték 47-48%-kal csökkent 2 nap alatt; 18. a ábra, fekete körök), míg nitrát hiányában volt a legkisebb mértékű a toxintartalom csökkenése (a kiindulási érték 39-40%-kal csökkent 2 nap alatt, 18. a ábra, szürke körök). Nitrogénéhezés során a 6. naptól a cilindrospermopszin mennyisége újra megnövekedett, ami a törzs nitrogénkötő képességével magyarázható (Bácsi et al., 2006; 2007).

Amennyiben a toxintartalmat sejtszámra vonatkoztatva számítjuk, nincs számottevő különbség a kénéhezés és a foszforéhezés között; a cilindrospermopszin mennyisége mindkét esetben a kiindulási érték 42-44%-ára csökken két napon belül (18. b ábra, fehér, illetve fekete körök). A nitrátmentes táptalajban nevelt tenyészet esetében itt is speciális dinamikával találkozunk (18. b ábra, szürke körök), a fentebb említett nitrogénkötő képességnek köszönhetően.

A cianobakteriális toxintermelés vizsgálata során kevés környezeti faktorról sikerült bizonyítani, hogy a toxintermelést jelentősen befolyásolja, különösen igaz ez a cilindrospermopszint termelő cianobaktériumokra. Az esetek nagy többségében a toxintartalom szoros összefüggést mutatott a növekedési rátával. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium cilindrospermopszin tartalma szulfát, foszfát és nitrát hiányában is lecsökken. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési

rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtek cilindropermopszin tartalmában bekövetkező konkrét csökkenés. A száraz tömeg, illetve a sejtszám alapján mutatkozó különbség a toxintartalom csökkenésében a kénéhezés esetén az éhező sejtek metabolizmusának átalakulása adhat magyarázatot. Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcserefolyamatok szabályozásán túl szoros összefüggésben van a törzs cilindropermopszin termelésével is (Vasas et al., 2013).



18. ábra. (a) A cilindropermopszin-tartalom változása száraz tömegre és (b) sejtszáma vonatkoztatva az *Aphanizomenon ovalisporum* tenyészetekben a különböző éhezések során. Beoltáskor (nulla időpontban) a cilindropermopszin mennyisége a szulfáthezés során $5,21 \mu\text{g mg}^{-1}$ száraz tömeg (a, -○-), illetve $2,17 \text{ pg}$ per sejt (b, -○-); a foszfáthezés során $5,12 \mu\text{g mg}^{-1}$ száraz tömeg (a, -●-), illetve $2,12 \text{ pg}$ per sejt (b, -●-); a nitráthezés során $4,84 \mu\text{g mg}^{-1}$ 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 szulfát- és foszfáthezéses kísérleteinket a nitráthezéses kísérletektől eltérő időben végeztük, ezért különböző a kísérletek kontrollja. Ezért jelöltük a nitráthezéshez tartozó kontroll tenyészet adatait szürke rombuszokkal – a szulfát- illetve foszfáthezéshez tartozó kontroll adatoktól eltérően. Az összehasonlító ábrán a nitráthezéshez tartozó kontroll tenyészet adatai Kontroll 2 néven szerepelnek (Vasas et al., 2013).

Az eutrofizáció és következményei a 20. század közepe óta széles körben elterjedt, jelentős károkat okozott a vízi környezetben, komoly nehézségeket váltott ki a vízhasználatban. Az eutrofizáció alkalmával sok esetben megfigyelhető „kísérő” jelenség a vízvirágzás, a planktonszervezetek (eukarióta algák és cianobaktériumok) tömeges elszaporodása. A vízvirágzások kialakulásában a felvehető foszfor mennyisége az egyik legfontosabb tényező, emellett a kötött – a fitoplankton szempontjából elsősorban a szervesen kötésben lévő – nitrogén mennyisége mutatkozik meghatározónak. A közelmúltban széles körben elfogadottá vált, hogy az eutrofizáció következményeként a vizekben megjelenő cianobakteriális toxinok humán-egészségügyi problémát okozhatnak. 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 cilindropermopszin 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 kénéhezés vizsgálatát indokolja, hogy az ILC-164 *Aphanizomenon ovalisporum* törzs által termelt cilindropermopszin kéntartalmú cianotoxin. A foszforlimitált körülmények hatásának megfigyelése értékes információkkal szolgál, mert mint azt már említettük is, a foszfor központi szerepet játszik a vízvirágzások kialakulásában, így mindenképpen tanulságos lehet a cianobaktériális foszforforgalom és a toxintermelés kapcsolatának vizsgálata. A nitrogén-, pontosabban a nitrátéhezés speciális esetet képvisel, hiszen az általunk vizsgált törzs a légköri nitrogén megkötésére képes. Ebben az esetben arra kerestük a választ, hogy a heterociszták kialakulásáig fellépő nitrogénéhezés hogyan befolyásolja a vegetatív sejtek cilindropermopszin termelését, illetve, a specializált morfológiai és fiziológiai sajátságokkal jellemezhető heterociszták részt vesznek-e a toxintermelésben (Vasas et al., 2013).

Eredményeink alapján a következőket mondhatjuk el: A kontroll, azaz 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. Az *Aphanizomenon ovalisporum* sejtek – a cianobaktériumokra általánosan jellemző módon – képesek nagy mennyiségű foszfor felhalmozására (főként polifoszfát formájában). Ilyen raktározási formák sem a kén, sem a nitrogén esetében nem figyelhetők meg. A nitrátéhezés során, a heterociszták kialakulása után a tenyészet teljesen nitrátmentes tápoldatban fenntartható, növekedése a kontrollnál alacsonyabb rátával stabilizálódik (Bácsi et al., 2006; 2007; Vasas et al., 2013).

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. 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).

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. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtekben csökken a cilindropermopszin mennyisége. A száraz tömeg, illetve a sejtszám alapján mutatkozó különbség a toxintartalom csökkenésében a kénéhezés esetén az éhező sejtek metabolizmusának átalakulása adhat magyarázatot. Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A. ovalisporum* fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcserefolyamatok, valamint a sejtosztódás szabályozásán túl mélyebb összefüggésben van a törzs cilindropermopszin termelésével is (Bácsi et al., 2006; 2007; Vasas et al., 2013).

6. Mérgező cianobakteriális vízvirágzások-esettanulmányok

6.1. Mikrocisztinek, mikrocisztin-termelők előfordulásai

A *M. aeruginosa* kolóniákat alkotó cianobaktérium faj. A Gram-negatív sejtfal külső rétege elnyálkásodva egy közös kocsonyaburokban tartja össze a sejteket. A kolónia mérete szélsőségesen változó lehet a külső körülményeknek köszönhetően (Chorus és Bartram, 1999). A közel méteres nagyságú kolóniáktól kezdve egészen apró megjelenésű, néhány sejtből álló kolónia is jellemző lehet a fajra, de magányos sejteket is megfigyeltek mind terepi, mind laboratóriumi körülmények között. Számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amely kompetíciós előnyt biztosít számára, mint például a sejtekben felhalmozott tartaléktápanyag granulomok, a lebegést elősegítő gázvakuólumok, a kromatikus adaptációs képesség és a sejtmembránban levő Na^+/H^+ antiporter működésének köszönhető pH pufferoló képesség (Dwiveldi et al. 1994; Kiss, 1998). A *M. aeruginosa* által okozott vízvirágzások a tavak eutrofizálódásával, a nitrogén és foszfor vegyületek koncentrációjának emelkedésével függnek össze (Branco és Sienna, 1994). Szomorú adat, hogy például az USA-ban, Wisconsin államban a nyári cianobakteriális vízvirágzások több, mint 40%-a toxikusnak bizonyult (Repavich et al., 1990) és a skandináviai (Sivonen et al., 1990), európai adatok (Skulberg et al., 1984; Pearson, 1990) is hasonló arányokat mutatnak. A cianobaktériumok tömeges elszaporodása és MC termelése a világ számos pontján okozta az emberek megbetegedését, halálát, valamint a születési rendellenességek gyakoriságának növekedését (Collins et al., 1981, Carmichael et al., 1985).

Több cianobaktérium fajnál számolhatunk be a toxintermelés jellemző variabilitásáról, azaz egy egy genusz képviselője több toxint is termelhet. A *Microcystis*-ek esetében a toxintermelés viszonylag stabilnak mondható, hiszen a leggyakoribb, legjellemzőbb toxincsalád a peptid típusú mikrocisztinek. Ráadásul a *Microcystis*-ek esetében beszélhetünk a leggyakoribb toxintermelésről is. Ahogyan már említettük, a múlt század kezdetén hazánkban is az első vízvirágzással kapcsolatos jelentések ehhez a genuszhoz köthetők és e faj toxintermelése kapcsán rendelkezünk a legtöbb hazai ismerettel.

Törökné és Mayer (1988) 1983 és 1985 között hazánk különböző felszíni vizeiből gyűjtött 35 "lío-filizált cianobaktérium biomasszából" egér-tesztel 29 mintát találtak többé-kevésbé toxikusnak. A leggyakoribb domináns cianobaktérium fajnak a *M. aeruginosa* bizonyult. Erősen toxikus *M. aeruginosa* törzset izoláltak a Balatonból, a Komrávölgyi tározóból, és a két legtoxikusabbat a Bánki-tóból és a Diósjenői-tóból. Ezeknél az ALD érték 80-100 mg/kg egér testtömeg volt. 1988-ban a Kis-Balatonon történt tömeges vízimadár elhullás kapcsán, a vízből izolált *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaenopsis*-fajok toxintermelők voltak (Pomogyi, 1991).

A legnagyobb vihart kavart eset 1991-ben a velencei-tavi toxikus vízvirágzás volt. Az okok közül az 1989-től jelentkező csapadékhiányt lehet kiemelni, ami oda vezetett, hogy a planktonikusan oligotróf víz eutrofizálódni kezdett, a *Cladophora* sp. zöldalgák mellett egy mikrocisztin termelő *M. aeruginosa* törzs szaporodott el (Kós et al. 1995; Reskóné et al. 2001). A fürdőzők bőrkiütésekkel, valamint szédüléssel, fejfájással, lázzal kerültek orvoshoz. Napjainkban a tó javuló vízminősége ellenére a *M. aeruginosa* nem tűnt el, a planktonból és

az üledékből is kimutatható (Reskóné, 1998). Törökné és munkatársai (2000, 2001) adatai szerint a Velencei-tavon 1997-2000 között is toxikus *M. aeruginosa* törzs(ek) tömegprodukciója jellemző. Az izolátumokban a MC-RR és MC-YR is előfordul, de a legtoxikusabb izomer, a MC-LR a domináns.

A legmagasabb lokális mikrocisztin koncentrációk is ehhez a genuszhoz köthetőek. Szárazanyagra vonatkoztatva 15-20 mg/g koncentráció és a térfogatra vonatkoztatva 25-30 mg/l-es koncentrációt is mértek. Ezek a magasnak mondható adatok a *Microcystis* fajok által előidézett virágzások morfológiájára vezethetők vissza. Az elszaporodó *Microcystis* sejttömeg nagyon gyakran úszik a víz felszínére és ott összefüggő réteget alkothat. Ez néhány esetben olyan mértékűvé is válhat, hogy a partmenti területeken, részben az uralkodó légáramlatoknak is köszönhetően, akár méteres vastagságot is elérhet (Chorus és Bartram, 1999).

A magyarországi vizekben 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.

Több magyarországi víztér *Microcystis* fajai által okozott algavirágzását vizsgáltuk meg. Legfőbb kérdés az volt, mennyire jellemző és milyen mértékű a toxintermelésük. Az 5. táblázat foglalja össze eredményeinket, ahol a virágzás lokalizációját, toxicitását, a megjelenő toxinok variánsait és mennyiségeit tüntettük föl (Farkas et al., 2014).

5. táblázat. Mikrocisztinek előfordulása hazai vizekben (Farkas et al., 2014).

Minták származási helyei	Faj	MC		
		conc. (mg/g)	IC 50 µg	MC formák
Velencei-tó	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3,342	1134	LR, YR, WR
Bárdos	<i>Microcystis aeruginosa</i>	15,701	245	Dha7-RR, RR, WR
Nagycsécs	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,801	1522	LL, LR, RR
Kis-Balaton(3T)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3,911	1044	[Asp3]Mcyst-LR, LR, Dha7-RR, RR, YR
Ónod	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,050	>3000	Dha7-FR
Békés	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3,724	654	WR
Balaton	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2,843	934	LR, RR
Gyula	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2,111	1100	LR, Dha7-RR, RR, YR, WR
Doboz	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,902	1454	LF, LR
Kis-Balaton(2T)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	4,238	839	LR, Dha7-RR, RR, YR
Várpalota	<i>Planktothrix agardhii</i>	3,227	916	[Asp3]Mcyst-LR, Asp3, Dha7-RR, Dha7-RR
Gyula	<i>Planktothrix agardhii</i>	0,020	>3000	[Asp3]Mcyst-LR
Hajdúhadház	<i>Planktothrix agardhii</i>	0,012	>3000	[Asp3]Mcyst-LR
Kis-Balaton, (4T)	<i>Planktothrix agardhii</i>	0,010	>3000	-

Vizsgálataink alapján a *Microcystis* fajok által okozott virágzások toxikusabbnak bizonyultak, összevetve más cianobaktérium nemzetségekével. Az IC₅₀ érték 245 µg/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 mikrocisztinek termelését, megjelenését intenzíven tanulmányozták az elmúlt években, hiszen az egyik legerősebb és leggyakrabban előforduló cianobakteriális toxin az édesvizekben. Számos régióban folyamatosan megfigyelik a toxin megjelenését és hatásait és próbálják felmérni a valós veszélyeit. Vizsgálataink során a megvizsgált 10 algavirágzás, melyet az említett faj okozott, különböző vizekből került ki. A táblázatban látható vizek egy részében szabad strandként üzemelő szakaszok vannak, jónéhány intenzíven halásított víz és több közöttük mesterséges kavicsbánya tó vagy kubik-gödör. A különböző vízi élőlénycsoportokon kívül számos esetben az emberre való közvetlen vagy közvetett hatás is felmerülhet. Turisztikai értelemben két kifejezetten fontos vízterben is megfigyeltünk *M. aeruginosa* virágzást. A Velencei-tó esetében tulajdonképpen szokványos jelenségről beszélhetünk, hiszen évről évre a tó egyes területein elszaporodik a faj, és ahogyan említettük, az 1990-es évek elején komoly problémát is okozott. A Balaton esetében viszonylag ritka, de nem példanélküli a jelenség, amelyet a tihanyi kis öbölben figyeltünk és mintáztunk meg 2010-ben. A Balatonon elsősorban a nitrogénkötő fonalas fajok jelenléte és manapság egyre ritkábban elforduló tömeges elszaporodása jellemző, de a *M. aeruginosa* tömeges megjelenéseit Entz, Sebestyén is leírta a huszadik század közepén (Farkas et al., 2014).

A MC tartalom 0,010 és 15,701 mg/szárazanyag MC-LR equivalens értékek között mozgott. A mért legmagasabb hazai érték összhangban van egyes nemzetközi tanulmányok értékeivel: 10 mg/g Bautzen Reservoir (Németország) 14.7 mg/g (Wisconsin) és 12.8 mg/g Lake Baringo, Kenya (Ballot et al., 2003).

A MALDI-TOF analízis segítségével azonosított variánsok nagy száma sem 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).

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

A *Microcystis* fajok, mint már részleteztük, az egyik leggyakoribb algavirágzást okozó fajok egyike. Az eutróf és hipertróf vizekben 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

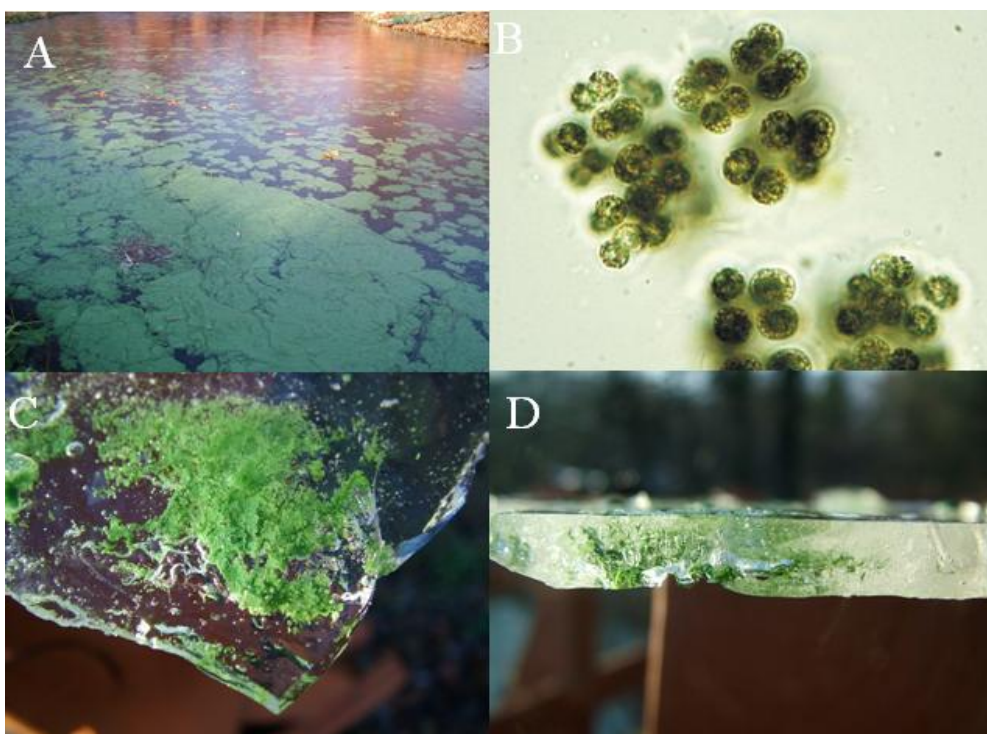
nagymértékben függ az aktuális fény mennyiségétől is. A fotoszintetikus energia glikogénben tárolódik, ami növeli a sejtek sűrűségét és a kolónia süllyedését segíti elő. Amikor a biológiai oxidáció révén kellőképpen lecsökken a glikogén mennyisége, a kolónia sűrűsége révén könnyebben képes a felfelé irányuló mozgásra (Kromkamp és Mur, 1984; Thomas és Walsby, 1985). Amikor a víztömeget erős áramlások, hullámzások nem zavarják, a sejtek, kolóniák a vízfelszínén tömegesen fordulhatnak elő. *Microcystis* fajok toxintermelése sokkal stabilabb és sokkal jellemzőbbnek írható le más cianobaktérium genuszokkal szemben. A toxinok veszélyesek más prokariótákra vagy eukarióta algákra, hajtásos növényekre, zooplankton fajokra valamint vadon élő és háziállatokra és az emberre is (Falconer 1999; Carmichael et al., 2001; Huisman et al., 2005).

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 mérsékelt régiókban a *Microcystis* fajok erőteljes szaporodása tavasszal kezdődik, amikor a felszíni víz hőmérséklete eléri a 15 °C-t (Reynolds et al., 1981; C'aceres és Reynolds, 1984; Trimbee és Prepas, 1987). A *Microcystis* tömege exponenciálisan növekszik a nyár elejétől kezdve, és eléri a stacioner fázist a nyár végén. Nyár végén a *Microcystis* fajok gyakran teljesen uralják a fitoplanktont és felszíni kolóniái gyakran megjelennek, különösen a szélcsendes időszakokban.

A *Microcystis* kolóniák kiüledése általában július közepétől kezdődik (Fallon és Brock, 1980; Reynolds és Wiseman, 1982; Trimbee és Harris, 1984). A különböző tanulmányok azt mutatják, hogy a nettó süllyedés nyári időszakban általában alacsony (Reynolds et al., 1981). A szedimentáció gyakran az őszi időszakban növekszik, ettől kezdve az aljzaton megfigyelhető kolóniák száma egyre nagyobb, míg a vízoszlopban számuk csökken (Reynolds et al., 1981; 1982; Oliver et al., 1985; Visser et al., 1995). 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. 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).



19. 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).

A 2005 decemberében készült felvételen jól láthatóak a jégbe fagyott *Microcystis* kolóniák (19. ábra). A fénymikroszkóppal történő azonosítás során a fajt *Microcystis viridis*-nek határoztuk. A feltört jégből és a jég alól mintát vettünk. 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 (20. ábra; 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 információnk. Ahogy az eredmények azt mutatják, közel 60%-a az életképes kolóniáknak a tó jégtakarójából volt izolálható (Vasas et al., 2010).

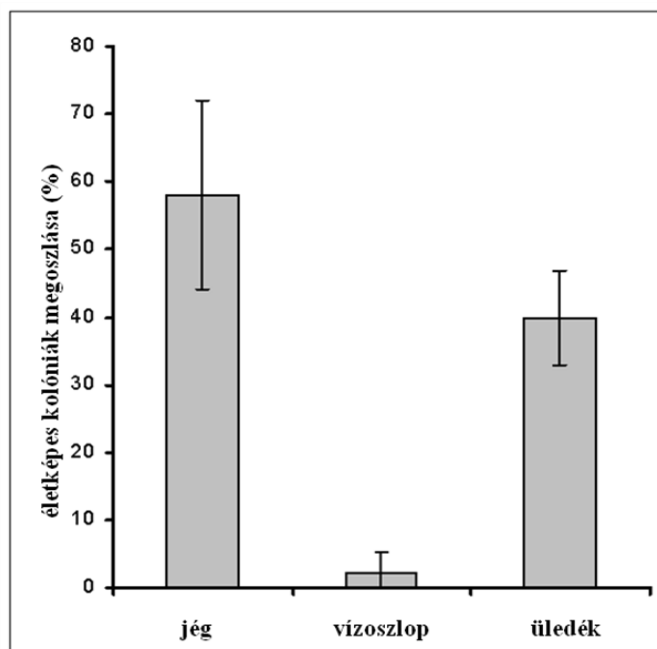
A toxikológiai vizsgálatok eredményei szerint a jégből gyűjtött sejttömeg mérgezőnek bizonyult. Az általunk kidolgozott eljárás szerint a mérgező frakciót megtisztítottuk és MALDI - TOF analízis segítségével azonosítottuk a toxint. Az eredmények szerint a faj egy viszonylag gyakori variánst tartalmazott, amit MC- RR (M + H = 1039,2)-ként azonosítottunk (Vasas et al., 2010).

A legtöbb tanulmány számol azzal a lehetőséggel, hogy *Microcystis* virágzások még élő sejtjei az őszi időszakban nem pusztulnak el, hanem jelentős számban a számukra kedvezőbb feltételeket nyújtó üledékben áttelelnék. A stratégia igen fontos lehet a szervezet számára, hiszen míg más, fonalas cianobaktérium fajok túlélő képességgel rendelkeznek (akinéta,

hormogónium), amelyek segítségével a kedvezőtlenebb körülményeket átvészelik, addig a *Microcystis* fajok esetében ilyenről nem beszélhetünk. Éppen ezért a túlélő egyedek, kolóniák esetlegesen azok tömege fontos szerepet játszik a populáció túlélésében, valamint abban, hogy a következő év korai időszakában algavirágzást legyen képes előidézni. A jelenség sokáig megtévesztő volt, hiszen a tavaszi felmelegedés kezdetekor is gyakran figyeltek meg tömeges *Microcystis* virágzásokat, melyek esetében értelmezhetetlenül gyorsan szaporodó populációkat kellett feltételezni. Értelemszerűen ezek az esetek az üledékben áttelelt sejtek felúszó tömegei voltak, melyek napok esetleg néhány órán belül idéztek elő a felszínen jelentős biomasszát (Vasas et al., 2010).

Tanulmányunkban jégbe fagyott életképes toxintermelő *Microcystis viridis* sejtek tömegeit azonosítottunk. Köztudott, hogy sok szervezet fejleszt egyedi mechanizmusokat, amelyek minimalizálják a fagyás okozta sérüléseket a fagypont alatti körülmények között (Kawahara, 2002). Heterotróf baktériumokban vizsgáltak olyan ozmotikusan aktív anyagokat valamint egyes fehérjéket, melyek megakadályozták az intracelluláris jégkristály kialakulását és annak roncsoló hatását (Kawahara, 2002). A *Microcystis* telepeket mindig nyálkaréteg védi. Ez a nyálka főleg poliszacharidokból áll (Martin et al., 1989), amely szintén nyújthat fagyás elleni védelmet. Kifejezetten feltűnő ezen nyálkaréteg markáns megjelenése a *M. viridis* fajok esetében (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).



20. ábra. Az életképes kolóniaszámok megoszlása a téli vízvirágzás mintáiból. (az életképes kolóniákat 7 inkubáció után határoztuk meg Allen tápoldatot tartalmazó 1,5% agaron, 28 °C-os hőmérsékleten 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ fényintenzitáson. A legtöbb életképes kolónia (58%) a jégből, 40% az üledékből, és 2% a vízoszlopból származó mintából nőtt ki (Vasas et al., 2010).

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

Ahogy az előzőekben arról már volt szó, a mikrocisztinek messze a legismertebbek a felszíni vizekből kimutatható cianotoxinok között. A mikrocisztinek vízoldható ciklikus heptapeptidek, melyek állatok esetében különböző megbetegedéseket, illetve az állatok pusztulását okozhatják elsősorban a máj károsításával (hepatotoxinok; Carmichael, 1992; Codd és Beattie, 1991; Keevil, 1991; Sivonen et al., 1990). A toxincsaládot a *Microcystis aeruginosa* cianobaktériumról nevezték el, melyről elsőként bizonyosodott be, hogy termeli a toxint (Eriksson et al., 1988; Sivonen et al., 1992; Carmichael, 1989).

A mikrocisztinek mind állati, mind növényi sejtekben gátolják a protein foszfatázokat (PP1 és PP2A - MacKintosh et al., 1990; Yoshizawa et al., 1990; Kurki-Helasma és Meriluoto, 1998). Rao és munkatársai leírták, hogy mind a *Microcystis aeruginosa* sejtmentes kivonata, mind a tiszta mikrocisztin-LR jelentős DNS fragmentációt okozott egér sejtekben, valamint a protein foszfatázokon kívül más enzimek (mint pl. LDH vagy ALP) aktivitása is szignifikánsan változott a kezelést követően (Rao és Bhattacharaya, 1996). A legfrissebb kutatási eredmények azt sugallják, hogy az oxidatív stressz jelentős szerepet játszhat a mikrocisztin mérgezés patogenezisében az állatokban és az emberben (Guzman és Solter, 1999; Ding et al., 2000; 2001; Žegura et al., 2003).

A cianotoxinok növényekre gyakorolt hatásának vizsgálati eredményei azt mutatják, hogy a legtöbb növényfaj - mind kétszikű, mind egyszikű - érzékeny a mikrocisztinkekre. A teszt növényként mustárt alkalmazó vizsgálatok kimutatták, hogy a toxikus cianobakteriális anyagcseretermékek hatást gyakorolnak a magasabb rendű növények nukleáz aktivitására, fehérje-összetételére, morfológiájára (M-Hamvas et al., 2001, 2003). A nád sejtszuszpenziós tenyészetekben és szövettenyészetekben végzett vizsgálatok ugyancsak a cianotoxinok növényekre gyakorolt gátló hatására világítanak rá (Borbély et al., 1997; Máthé et al., 2001; 2007). Weiss és munkatársai (2000) a mikrocisztin-RR különböző koncentrációinak (3 és 5 mg/l) hatását vizsgálták a békalencse (*Lemna minor*) növekedésére. A kezelést követően 3 nappal csökkent levélképződést figyeltek meg. 5 mg/l koncentrációnál törpe termetű, deformált levelek jelentek meg, melyek közül néhány hamarosan elsárgult. A mikrocisztinnel kezelt növényekben a klorofill-a, -b és a karotinoidok teljes mennyisége több mint 50 %-kal csökkent (Cronberg és Annadotter, 2006).

Bebizonyosodott, hogy a mikrocisztinek a haszonnövények szöveteiben is felhalmozódhatnak, amennyiben az öntözővízben mikrocisztineket termelő cianobaktériumok szaporodnak el. A cianotoxinok növekedésgátló hatását, illetve jelenlétét a növényi szövetekben mikrocisztineket tartalmazó vízzel való öntözést követően igazolták saláta (*Lactuca sativa*, Codd et al., 1999), bab (*Phaseolus vulgaris*, McElhiney et al., 2001) repce (*Brassica napus*) és rizs (*Oryza sativa*) (Chen et al., 2004), valamint brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) és mustár (*Sinapis alba*) esetében (Järvenpää et al., 2007). A toxinnak kitett növények szöveteiben felhalmozódott mikrocisztinek jelenléte rámutat az ehető növények számára is felvehető toxinok kiemelkedő jelentőségére az emberi egészség megőrzése szempontjából.

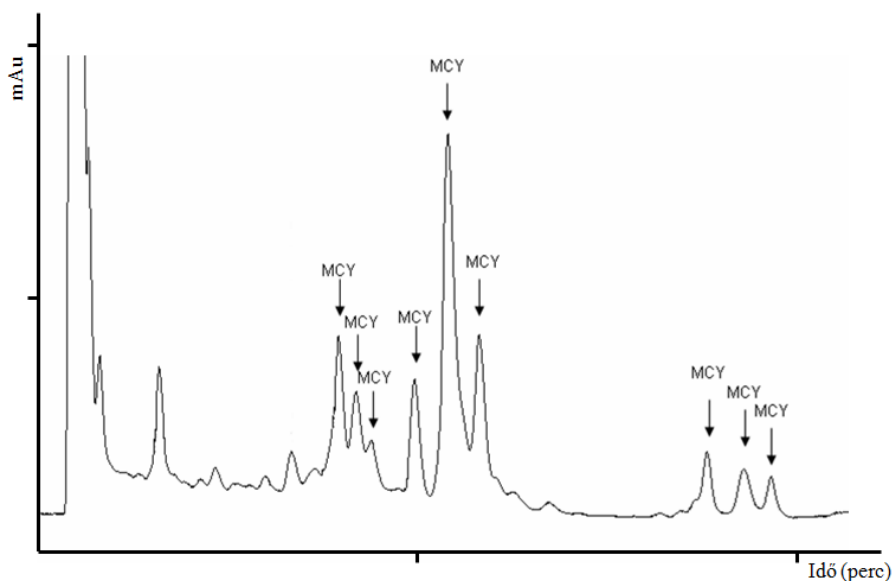
Kisebb mesterséges tavak esetében a planktonikus, fotoszintetizáló szervezetek gyakran tömegesen elszaporodhatnak, amit a beültetett növények földjéből kiszivárgó nagy

mennyiségű tápanyag, a közvetlen napfény és a gyors felmelegedés elősegíthet (Bácsi et al., 2013). A jelenség a tavak jó részénél minden tavasszal bekövetkezhet, hiszen a víz felmelegedésével felgyorsul a vízben lévő anyagok bomlása, ami kedvez a cianobaktériumok tömeges elszaporodásának (Chorus és Bartram, 1999; Bácsi et al., 2013).

2006 nyarán egy szegedi kerti tó tulajdonosa zöld elszíneződést, a víz felszínén összefüggő zöld tömeg megjelenését tapasztalta. Az algáktól úgy akart megszabadulni, hogy a víz felszínén felgyülemlett masszát a kertben lévő füre locsolta. A tó vizével rendszeresen öntözve, körülbelül két-három hét eltelte után a fű sárgulása illetve pusztulása volt megfigyelhető. A kert füvesített területének másik részét csapvízzel locsolták hasonló intenzitással, ezen a területen a fű pusztulását nem tapasztalták. Munkánk célja a vízvirágzást okozó cianobaktérium faj(ok) toxicitásának tanulmányozása, a szervezetek laboratóriumi körülmények között történő tenyésztése, a toxin(ok) növényi növekedésre gyakorolt hatásának tanulmányozása, valamint a termelt toxinok pontos azonosítása volt (Bácsi et al., 2011).

A fénymikroszkóppal történő határozás után megállapítottuk, hogy a kerti tóban történt vízvirágzást *Microcystis* fajok tömeges elszaporodása okozta. A vízmintában a *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Microcystis ichthyoblabe*, *Microcystis wesenbergii* fajokat azonosítottuk. A tömegprodukción olyan szervezetek idézték elő, amelyek potenciális toxicitása indokolta a sejttömeg toxicitásának vizsgálatát, részletes toxinanalízist. A fajok közül a *Microcystis aeruginosa*-t tudtuk izolálni, nevelésbe vonni, a törzs fenntartását a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszék algaszobájában végeztük (Bácsi et al., 2011).

A kapilláris elektroforetikus mérések során öt mikrocisztint azonosítottunk a mintában. A vízvirágzásból származó sejttömeg feldolgozása során HPLC segítségével 9 különböző mikrocisztint sikerült elkülönítenünk (21. ábra). A szerkezetanalízishez elegendő mennyiségben nem tudtuk az összes kimutatott variánst izolálni. A 6. táblázatban láthatók a MALDI-TOF mérések során azonosított szerkezetű mikrocisztin variánsok. A mért molekulatömegek megegyeznek az irodalmi adatokkal (Bácsi et al., 2009; 2011).



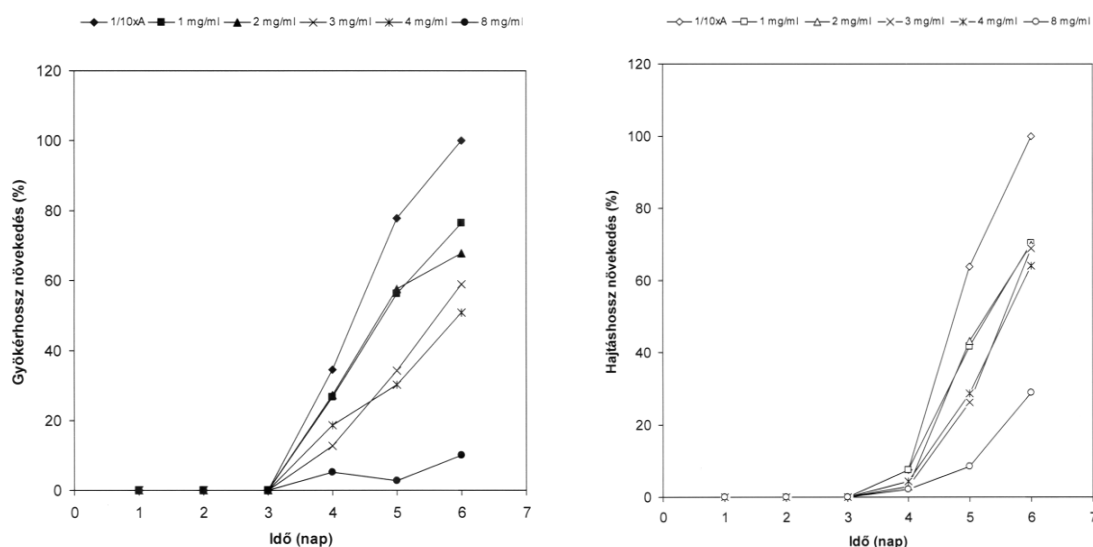
21. ábra. A szegedi kerti tóból származó cianobaktérium minta HPLC kromatogramja. A mikrocisztin csúcsokat nyilakkal jelöltük (Bácsi et al., 2011).

6. táblázat. A MALDI-TOF mérések során azonosított szerkezetű mikrocisztin variánsok és moláris tömegük (Bácsi et al., 2009; 2011).

A szerkezetanalízis során azonosított mikrocisztin variáns	Molekulatömeg g/mol
MYC-LA	910,06
MYC-LR	995,17
MYC-RR	1038,2
MYC-YR	1045,2

A vízvirágzás minta toxicitását megvizsgáltuk a laboratóriumunkban alkalmazott mustár csíranövény-tesztel. A teszt általános modellrendszer a xenobiotikumok növényekre gyakorolt toxikus hatásának kimutatására. Valamennyi alkalmazott koncentráció esetében megfigyelhető volt, hogy a növények gyökér- és/vagy hajtáshosszai rövidebbek voltak a kontroll növények esetében mért gyökér- illetve hajtáshosszaknál. A kezelt csíranövények gyökerének illetve hajtásainak növekedése gátlást szenvedett. A gyökerek gátlása erőteljesebb volt, már 0,01 mg/ml liofilizátumot tartalmazó kivonat több mint 10%-kal csökkentette a gyökerek növekedését. 1 mg/ ml koncentrációnál a gyökérhosszak 60%-kal, a hajtáshosszak 30%-kal rövidebbek a kontrollban mérhető értékekhez képest.

Az angol perje (*Lolium perenne*) laboratóriumi nevelésének optimalizálása során a legjobb eredményeket akkor értük el, amikor a Petri-csészékbe 3 réteg szűrőpapírt helyeztünk, és 5 ml folyadékkal itattuk át. A használt oldatok tekintetében az 1/10 ×Allen tápoldat bizonyult a legkedvezőbbnek, ezért a továbbiakban steril vízzel tízszeresre hígított Allen médiumot használtunk. Összevetve a kontroll növényekkel, bizonyos mértékű növekedésgátlást valamennyi koncentrációnál tapasztaltunk, már 1 mg/ml-nél is. Erőteljesebb gátló hatást 4 mg/ml koncentrációtól figyeltünk meg, ez a csökkent növekedés az 5. és 6. napon még kifejezettebb (22. a. és b. ábra). Összehasonlítva a gyökerekre illetve a hajtásokra kifejtett gátló hatást az angol perje csíranövények esetében is megfigyelhető, hogy a gyökerek esetében a gátló hatás erőteljesebb, mint a hajtások esetében (22. a. és b. ábra).



22. ábra. A különböző koncentrációjú cianobaktérium kivonatokkal kezelt Angol perje csiranövények gyökérhosszainak (a) és hajtáshosszainak (b) növekedése az idő függvényében. 100% a kontroll (1/10 × Allen tápoldattal öntözött) növények esetében a 6. napon mérhető hajtás- illetve gyökérhossz (Bácsi et al., 2009; 2011).

Nagyszámú eredményt találunk az irodalomban arra vonatkozóan, hogy cianotoxin-tartalmú tápoldattal való kezelés, vagy cianotoxin tartalmú vízzel való öntözés káros hatással van a növényi növekedésre, befolyásolja a növényi enzimek aktivitását (7. táblázat). Áttekintő munkánkban (Máthé et al., 2013) összefoglaltuk több kutatócsoport ilyen jellegű megfigyeléseit, vizsgálatait mind a vízinövények, mind a haszonnövények kapcsán (Codd et al., 1998; McElhiney et al., 2001; Chen et al., 2004; Järvenpää et al., 2006). Ugyanakkor valós körülmények között megfigyelt toxin okozta növényi károsodás kifejezetten ritka az irodalomban. 2006 nyarán hazánkban első esetben jelentettük cianobaktérium tartalmú víz szárazföldi (kerti) növényekre (pázsitra) gyakorolt károsító hatását (Bácsi et al., 2009; 2011).

7. táblázat. A mikrocisztin (MC) és a cilindropermopszin (CYN) által indukált stresszválaszok hajtásos növényekben (Máthé et al., 2013).

Alkalmazott cianotoxinok	A cianotoxin(ok) által indukált változások	teszt-növények (taxonok)	hivatkozás
	I. Növekedésbeni változások:		
MC-LR, -RR, -LF, -FR, -LW, -YR tisztított, MC-LR, -RR, -FR, -YR, extraktumban <i>M. aeruginosa</i> vízvirágzás minta	Csírázásgátlás, gátolt növekedés/megnyúlás a hajtás-, gyökér-, levél fejlődésében, növekedésgátlás a rametek számának, nedves-/száraz-tömegének gyarapodásában.	<i>Brassica napus</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>L. gibba</i> , <i>L. japonica</i> , <i>Lens esculenta</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Malus pumila</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Myriophyllum variifolium</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phragmites australis</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Spirodela oligorrhiza</i> , <i>Triticum durum</i> , <i>Vallisneria natans</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vicia faba rhizobial törzsekkel</i> <i>inokulálva</i> , <i>Wolffia arrhiza</i> , <i>Zea mays</i>	Yamasaki, 1993; Kós et al., 1995; Kurki-Helasma and Meriluoto 1998; Casanova et al., 1999, Weiss et al., 2000; McElhiney et al., 2001; Pflugmacher, 2002; Romanowska-Duda and Tarczynska, 2002; Wiegand et al., 2002; Gehringer et al., 2003; M-Hamvas et al., 2003, 2010; Chen et al., 2004, 2010; Mitrovic et al., 2005; Yin et al., 2005a; Pflugmacher et al., 2006; Jang et al. 2007; Máthé et al., 2007; Saqrane et al., 2007; 2008; 2009a; Yi et al., 2009; Szigeti et al., 2010; Bácsi et al., 2011; El Khalloufi et al., 2011; Kováts et al., 2011; Lahrouni et al., 2012, 2013
MC-RR	A sejtek csökkent életképessége (viabilitása).	dohány BY-2 sejtek	Yin et al., 2005b
CYN tisztított és extraktumban	Gátolt csírázás, gátolt növekedés/megnyúlás az egész növényben, hajtásban, főgyökérben, a levelek nedves tömegének gyarapodásában.	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i> , <i>Brassica juncea</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lemna minor</i> , kalluszból nevelt mini <i>Phragmites australis</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Wolffia arrhiza</i>	Vasas et al., 2002; Beyer et al., 2009; Jámbrik et al., 2010; M-Hamvas et al., 2010; Silva and Vasconcelos, 2010; Kittler et al., 2012
CYN extraktumban	Az alkalmazott toxinkoncentrációtól, az expozíció idejétől és a növényi szervtől függően serkentés és gátlás a növekedésben.	<i>Hydrilla verticillata</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Spirodela oligorrhiza</i>	Kinnear et al., 2007, 2008; Beyer et al., 2009; Silva and Vasconcelos, 2010; Prieto et al., 2011
CYN	Gátolt pollencsírázás, pollentömlő növekedés.	<i>Nicotiana tabacum</i>	Metcalf et al., 2004
	II. Morfológiai , fejlődésbeni eltérések		
MC-LR, -RR tisztított és extraktum	Gátolt gyökérmegnyúlás, abnormális fő- és oldalgyökér képződés, hiányzó gyökérszőrök, mellékgyökerek, a gyökerek radiális expanziója/ megvastagodása, gyökér-	<i>Lens esculenta</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Phragmites australis</i> ,	Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; McElhiney et al., 2001;

	összenövésék.	<i>Pisum sativum</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Triticum durum</i> , <i>Vallisneria natans</i> , <i>Zea mays</i>	M-Hamvas et al., 2003, 2010; Yin et al., 2005a; Máthé et al., 2007, 2009, 2013a,b; Saqrane et al., 2008; Chen et al., 2012
MC-LR, -RR, -YR tisztított és extraktumban	A sziklevek gátolt fotomorfogenezise: kis méretű, klorotikus sziklevek, hiányzó fedőszőrök a levélnyélen, malformáció és klorózis a levelekben, rametekben, gátolt hajtásmegnyúlás, a hajtások vízszintesen elfeksznek/a felegyenesedés hiánya, a virágzás indukálódása.	<i>Brassica napus</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Spinacia oleracea</i> variánsok	Weiss et al., 2000; M-Hamvas et al., 2003, 2010; Chen et al., 2004; Pflugmacher et al., 2007
MC-LR	A szomatikus embrióképződés gátlása, gátolt hajtás és gyökérfejlődés.	<i>Phragmites australis</i> , <i>Solanum tuberosum</i> szövettenyészetek	McElhiney et al., 2001; Máthé et al., 2007
CYN	Emelkedett gyökérszám, gátolt megnyúlása, radiális expanziója a gyökereknek.	<i>Hydrilla verticillata</i> , kalluszból nevelt <i>Phragmites australis</i> növénykék, <i>Sinapis alba</i>	Kinnear et al., 2008; Beyer et al. 2009; Máthé et al., 2013b
CYN	A sziklevek gátolt fotomorfogenezise: kisebb, klorotikus, de a magas antocianin tartalom miatt vörös levelek.	<i>Sinapis alba</i>	M-Hamvas et al., 2010;
CYN extraktumban	Hosszútávú (9 napos) kezelés következtében: lecsökkent víztartalmú, klorotikus, megbarnult, összezsugorodott levelek.	<i>Oryza sativa</i>	Prieto et al. 2011
III. Szöveti és citológiai változások			
MC-LR	Ligninberakódás a sejtfalakba (kéreg-parenchima, endodermisz és periciklus sejtek), megnövekedett autofluoreszcencia.	<i>Phragmites australis</i> növénykék, <i>Sinapis alba</i> csíranövények	Máthé et al., 2007, 2009; 2013a
MC-LR	A kéregparenchima-sejtek dedifferenciálódása, megnagyobbodása, kallusz-szerű szövet létrejötte (mustárban a főgyökér-hipokotil átmenetnél, nádnál a rizómákban és a gyökerekben).	<i>Phragmites australis</i> növénykék, <i>Sinapis alba</i> csíranövények	Máthé et al., 2007, 2009; Máthé et al. 2013a*; Máthé et al. 2013b*
MC-LR	Korai aerenchyma képződés.	<i>Phragmites australis</i> növénykék	Máthé et al., 2007
MC-LR	Gátolt szállítószövet; xilém differenciálódás (xilém területe, elemszáma is csökkent).	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Sinapis alba</i> csíranövények	Saqrane et al., 2008; Máthé et al. 2013a,b
MC-LR, -RR, -YR tisztított és extraktumban	Nekrotikus foltok, sejthalál a sziklevekben, hajtásban és gyökérben.	<i>Brassica napus</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> csíranövények, <i>Solanum tuberosum</i> szövettenyészet, <i>Sinapis alba</i> csíranövények	Abe et al., 1996; Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; McElhiney et al., 2001; M-Hamvas et al., 2003, 2010*; Chen et al., 2004; Mitrovic et al., 2005; Máthé et al., 2007, 2009, 2013a,b
MC-LR és - RR MC-LR	Osztódó sejtekben változások a sejtosztódásban és a kromatinszerkezetben: -a metafázis idejének megnövekedése, késlekedő testvérkromatid elválás. -“dualistic response”: alacsony MC koncentráció serkenti a mitotikus aktivitást, magas koncentráció gátolja, késleltetett	<i>Tradescantia virginiana</i> porzósál szórsejtek <i>Phragmites australis</i> , <i>Sinapis alba</i> gyökércsúcsok <i>Allium cepa</i> gyökércsúcs <i>Phragmites australis</i> ,	Wolniak és Larsen, 1992, Máthé et al., 2009, 2013a, Beyer et al., 2012, Laughinghouse et al., 2012 Máthé et al., 2009,

	metafázis/anafázis átmenet, hiba a testvérkromatidok elválásában, mikronukleusz képződés. -transziens emelkedés a korai és kései mitotikus aktivitásban, magas toxinkoncentráció (10 µg ml ⁻¹) felpörgeti a sejtciklust. -a mitózis megreked a profázis/prometafázisban.	<i>Vicia faba</i> gyökércsúcsok <i>Ceratophyllum demersum</i> hajtáscsúcs merisztéma	Beyer et al., 2012, Szigeti et al., 2010
MC-LR, -RR MC-tartalmú extraktum	Nem osztódó sejtekben: -kromatin kondenzáció. -sejtmag fragmentáció/szétesés. -DNS fragmentálódása ("smear").	<i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 sejtek, <i>Vallisneria spiralis</i> mezofillum sejtek, <i>Phragmites australis</i> gyökércsúcs, <i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 sejtek, <i>Sinapis alba</i> gyökér, <i>Oryza sativa</i>	Huang et al., 2008, 2009, Jámbrik et al., 2011, Jiang et al., 2011 Huang et al., 2008, Máthé et al., 2013b, Chen et al., 2011
CYN	Ligninberakódás a sejtfaalakba: nagy CYN koncentrációknál detektált az endodermisz és periciklus sejtjeiben.	<i>Sinapis alba</i> csíranövények	Máthé et al., 2013
CYN	Kallusz-szerű szövet, nekrosis előfordulása a gyökér elsődleges kérgében, meg-nagyobbodott/duzzadt sejtek a bélszövetben.	<i>Phragmites australis</i> növénykék, <i>Sinapis alba</i> csíranövények	Beyer et al., 2009; Máthé et al., 2013
CYN	A xilém gátolt differenciálódása.	<i>Sinapis alba</i> csíranövények	Máthé et al. 2013
CYN	Osztódó sejtekben változások a sejtosztódásban és a kromatinszerkezetben: -a korai mitózisban: emelkedett profázis/prometafázis, csökkent metafázis index értékek. -zavarok a testvérkromatidok szétválásában.	<i>Phragmites australis</i> <i>Phragmites australis</i> és <i>Sinapis alba</i> gyökércsúcsok	Beyer et al., 2009, Máthé et al. 2013
IV. Fiziológiai változások			
MC-LR tisztított és MC-RR, -LR, -YR, - (H4)YR, - WR, és -FR extraktumban	Gátolt/megváltozott fotoszintézis, csökkent klorofill és karotinoid tartalom, kl-a/kl.-b arány eltolódása, a klorofill-fluoreszcencia paraméterek megváltozásai.	<i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Elodea canadensis</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>L. gibba</i> , <i>Lens esculenta</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Myriophyllum spicatum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Phragmites australis</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Potamogeton</i> sps., <i>Sinapis alba</i> , <i>Solanum tuberosum</i> szövettenyészet, <i>Spinacia oleracea</i> variánsok, <i>Spirodela oligorrhiza</i> , <i>Triticum durum</i> , <i>Vicia faba</i> <i>Rhizobium</i> baktériumokkal beoltva, <i>Zea mays</i> ,	Abe et al., 1996; Weiss et al., 2000; McElhiney et al., 2001; Pflugmacher, 2002; Romanowska-Duda and Tarczynska, 2002; Pflugmacher et al., 2007; Saqrane et al. 2007; 2009a,b; Yi et al. 2009; Zhang et al., 2009; M-Hamvas et al., 2010; Szigeti et al., 2010; Bácsi et al., 2011; Lahrouni et al., 2013
MC-LR	Nagyon kis koncentrációban indukció, növekvő koncentrációban gátlás mérhető a sziklevelek antocianin tartalmában.	<i>Sinapis alba</i> csíranövények	M-Hamvas et al., 2003, 2010
MC-LR, <i>M. aeruginosa</i> toxikus	Gátolt tápanyag, nitrogén és foszfor felvétel, valamint nitrogén asszimiláció. Megnövekedett nedves tömegre vonatkoztatott	<i>Lens esculenta</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> ,	McElhiney et al., 2001; Zhang et al., 2006;

vízvirág-zás minta	ásványi anyag tartalom („mineral nutrients content”) a gyökerekben.	<i>Potamogeton sp.</i> , <i>Triticum durum</i> , <i>Rhizobium</i> -mal inokulált <i>Vicia faba</i> , <i>Zea mays</i>	Saqrane et al. 2009; Lahrouni et al., 2012, 2013
MYC-LR	Csökkent víz és fehérjetartalom.	<i>Ceratophyllum demersum</i>	Szigeti et al., 2010
CYN extraktumban	Csökkent klorofill tartalom, megváltozott kl-a /kl-b arány.	<i>Hydrilla verticillata</i> <i>Sinapis alba</i>	Kinnear et al., 2008; M-Hamvas et al., 2010
CYN tisztított és extraktumban	A nedvestömegre vonatkoztatott fehérjetartalom enyhe emelkedése, különösen a <i>W. arrhiza</i> növényekben. A nád gyökerekben a tubulin tartalom emelkedése.	<i>Lemna minor</i> , <i>Phragmites australis</i> növénykék, <i>Wolffia arrhiza</i>	Beyer et al., 2009; Jámbrik et al., 2010
V. Enzimszintű változások			
MC-LR tisztított, MYC-RR, -LW, -LR extraktumban	Protein-foszfátáz (PP1 és PP2A) gátlás: - <i>in vitro</i> gátlása a PP1 és PP2A aktív formáinak a hígított mag extraktumokban (mind a PP1 és PP2A estében IC ₅₀ : ≈ 0.1 nM). - <i>in vivo</i> PP1 és PP2A gátlás.	<i>Brassica napus</i> magkivonat <i>Medicago sativa</i> , <i>Phragmites australis</i> , <i>Sinapis alba</i> ,	MacKintosh et al., 1990 Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998; Peuthert et al., 2008; Máthé et al., 2009; 2013
MC-LR	Protein foszfátáz gátlás (PP1 és PP2) okozta blokk a szacharóz-indukált gén- expresszióban (α -amiláz-, sporamin mRNS-ek csökkenése), a AGP-áz és GUS aktivitásokban).	<i>Ipomoea batatas</i> , transzgenikus <i>Nicotiana tabacum</i>	Takeda et al., 1994
MC-LR	PP2A gátlás következtében: a szacharóz-foszfátáz szintetáz (SPS) foszfátázának gátlása, amely az SPS fény-indukált aktiválódásának elmaradását, és így a szacharóz bioszintézis és a CO ₂ fixáció folyamatának gátlását okozza.	<i>Spinacia oleracea</i>	Siegl et al., 1990
MC-LR	A jázminsav (JA) szignál-transzdukciós út zavara; a jázmonsavra adott válaszok elmaradása (JA hatására a savas-foszfátázok specifikus aktivitásának emelkedése és a fehérjetartalom általános csökkenése volt jellemző, ezzel ellentétes változásokat mértek MC-LR jelenlétében).	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kenton et al., 1999
MC-LR tisztított és extraktumban	A hidroláz enzimek aktivitásának változásai: -változás a konstitutív savas foszfátázok és az RN-ázok aktivitásában. -az ssDN-ázok aktivitásának emelkedése. -PCD folyamatával összefüggő (egyfonalú) ssDN-áz és (natív) dsDN-áz aktivitás emelkedés.	<i>Spirodela oligorrhiza</i> <i>Sinapis alba</i> <i>Phragmites australis</i>	Romanowska-Duda and Tarczynska, 2002 M-Hamvas et al., 2003 Jámbrik et al., 2011
MC-LR, -LF és -LR extraktum-ban	Lipid peroxidáció, -az α - és β - tokoferol (lipidperoxidáció gátlók) koncentrációjának emelkedése.	<i>Arabidopsis thaliana</i> sejtszuspenziók, <i>Medicago sativa</i> , <i>Triticum aestivum</i>	Yin et al., 2005c; Peuthert et al., 2007; Peuthert and Pflugmacher, 2010
MC-LR, -RR, -LF, -LW, -WR mind tisztított, mind extraktumban	Oxidatív stresszfolyamatokra utaló (enzim) változások MC kezelt növényekben: - <i>in vitro</i> : MC-LR + növényből nyert glutation-S-transzferáz (GST) → glutation (GSH)-MC-LR konjugátum létrejötte, - <i>in vivo</i> kialakult GSH-MC-LR konjugátumok kimutatása, -H ₂ O ₂ és egyéb ROS kialakulásának kimutatása, fenolos vegyületek képződése, fenil-alanin-ammónia-liáz (PAL), polifenol-oxidáz (PPO) emelkedett aktivitások. -csökkenés/változás a glutation pool-ban;	<i>Arabidopsis thaliana</i> sejtszuspenzió, <i>Brassica napus</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Elodea canadensis</i> , <i>Lemna gibba</i> , <i>L. minor</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Myriophyllum spicatum</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> ,	Pflugmacher et al., 1998, 1999, 2001, 2006, 2007; Pietsch et al., 2001; Gehring et al., 2003; Pflugmacher 2004; Chen et al., 2004, 2012; Mitrovic et al., 2005; Yin et al., 2005b,c; Peuthert et al., 2007; Saqrane et al., 2007; Ding et al., 2009;

	csökkent GSH arány. -indukció/változás: a mikroszomális és citoszolikus GST (mGST és sGST) mennyiségében, glutation-peroxidázok (GPx), glutation-reduktáz (GR), szuperoxid-dizmutáz (SOD), aszkorbinsav-peroxidáz (APX), és egyéb peroxidázok (POD), katalázok (CAT) aktivitásában.	<i>Phragmites australis</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Spinacia oleracea</i> variánsok, dohány BY-2 sejtszuszpenzió, <i>Triticum aestivum</i> , <i>Rhizobium</i> mal inokulált <i>Vicia faba</i> , <i>Vigna unguiculata</i> faj variánsai	M-Hamvas et al., 2010; El Khalloufi et al., 2011; Pichardo et Pflugmacher, 2011; Lahrouni et al., 2013
MC-LR extraktumban	Gátolt nitrogén-monoxid (NO) képződés, csökkent auxin (IAA) koncentráció a gyökérben.	<i>Oryza sativa</i> , <i>Brassica napus</i>	Chen et al., 2012, 2013
CYN	A fehérjeszintézis zavarai: CYN gátolt fehérjeszintézis állati és növényi sejtextraktumokban; részleges fehérjeszintézis gátlás növekvő pollentömlőben.	búzacsíra kivonat, <i>Nicotiana tabacum</i>	Metcalf et al., 2004; Froschio et al., 2008
CYN	Szignifikáns csökkenés a PP1 és PP2A aktivitásokban CYN-kezelt növények kivonataiban (de: a CYN nem idézett elő szignifikáns aktivitáscsökkenést <i>in vitro</i> a PP1 aktivitásban)	<i>Sinapis alba</i>	Máthé et al., 2013a
CYN tisztított és extraktumban	Proteáz aktivitás géleken, szignifikáns változások a proteáz enzimintázatokban és aktivitásokban; nyers CYN tartalmú sejtextraktumok hatására emelkedett proteáz összaktivitás a növényekben (pH 5 és pH 8), míg a tisztított CYN a proteáz aktivitást csak kis koncentrációkban (0.01-1 µg ml ⁻¹) emelte.	<i>Lemna minor</i> , <i>Wolffia arrhiza</i>	Jámbrik et al., 2010
CYN extraktumban	Oxidatív stresszenzimek indukálódása: -emelkedett GST, GPx aktivitások -emelkedett POD aktivitás (csak 0.05 µg mL ⁻¹ - nál) – tranziens hatás	<i>Oryza sativa</i> , <i>Sinapis alba</i>	Prieto et al., 2011; M-Hamvas et al., 2010

Munkánk során egy szegedi kerti dísztóból 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 fűmagkeverékkel 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. A tiszta toxinnal végzett vizsgálatok mellett a sejttmentes cianobaktérium kivonat alkalmazása általánosan elterjedt, hiszen a természetben a növény a lizált sejtek teljes beltartalmával kerül kapcsolatba. Esetünkben is azért választottuk az extraktummal való kezelést, mert ezzel jobban tudtuk modellezni a terepi megfigyeléseket. Meg kell jegyeznünk, hogy mind a mustár, mind az angol perje esetében a gyökerek gátlása erőteljesebb, ami érthető, hiszen a gyökerek indulnak először fejlődésnek, és a későbbiekben is közvetlen kapcsolatban állnak a toxintartalmú oldattal (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 (6. táblázat). 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).

6.4. *Planktothrix* fajok toxintermelése

A *Planktothrix* taxonba tartozó cianobaktériumok olyan fonalas szerveződésű, morfológiailag és genetikailag jól körülhatárolt szervezetek, amelyek az északi félteke mérsékelt övi vizeiben terjedtek el (Fastner et al., 1999). Ma a *Planktothrix*ek egy egyedi és jól megkülönböztethető filogenetikai ágat képviselnek az Oscillatoriales renden és a Phormidiaceae családon belül. A hozzájuk morfológiailag legközelebb álló csoport a *Planktothricoides* (Suda et al., 2002) genusz. A *Planktothrix* és *Planktothricoides* genuszok tehát egy különálló klaszter elemei, amelyek fenotípusos és citológiai karakterek alapján nagyon jól elkülöníthetők más Oscillatoriales rendbe tartozó genuszoktól (*Tychonema*, *Limnothrix*) (Anagnostidis, 1988; Castenholz et al., 2001; Komárek, 2003; Suda et al., 2002). Annak ellenére, hogy mindkét genusz molekulárisan is definiált, a *Planktothrix* genuszon belüli osztályozás meglehetősen nehéz. Az alapján, hogy az algavirágzás milyen színűre festi a vizet, beszélhetünk vörös, illetve zöld típusokról. Gázvezikulumokkal a *Planktothrix* és *Planktothricoides* fajok is rendelkeznek (Suda et al., 2002). Ezek mérete nem meghatározó jellemvonás, ám genotípusos megjelenésük különböző a két genuszban, illetve a vörös és zöld típusok között. *Planktothrix* sejtekben a gázvezikulumok a sejt egészében megtalálhatók, szemben a *Planktothricoides* fajokkal, ahol a gázvezikulumok perifériális helyzetűek. A vörös színű, stenotherm *Planktothrix rubescens* a gázvezikulumok segítségével képes szabályozni helyzetét a vízrétegek között, az adott fényintenzitásnak megfelelően. A mélyebb tavakban, amelyek ezeknek a planktonikus szervezeteknek a tipikus lelőhelyei, sajátos koncentráció és hőrétegződés figyelhető meg. A vízfelszíntől a tófenéig haladva három élőhelytípust különíthetünk el. A legfelső vízréteg a fedőréteg (epilimnion), amelyre a gyors környezeti ingadozások jellemzők. A víz legmélyebb rétegei (hipolimnion) hidegek, hőmérsékletük általában az alapkőzet hőmérsékletétől függ. A két réteg között helyezkedik el az a vékony átmeneti réteg (metalimnion), amelyet a *Planktothrix* fajok is preferálnak (Christiansen et al., 2003). A legtöbb mikroorganizmussal szemben, amelyek leginkább a meleg vizeket kedvelik, a *Planktothrix* fajok általában hideg vízü tavakból kerülnek elő. Megfigyelések alapján a természetes környezetükben alacsony hőmérséklet mellett növekednek legjobban, azonban laboratóriumi kísérletek kimutatták, hogy például a *Planktothrix rubescens* számára a 30 °C is kiváló a növekedéshez. Az élőhely pH és oxigénkoncentráció változásai hatással vannak a *Planktothrix* szervezetekre. A túl magas O₂ koncentráció gátolja a fotoszintetikus szénfixációt, ennek eredményeként fotorespirációt indukál, a hidrogénkoncentrációt illetően pedig a pH 5 feletti értékek a megfelelőek. Több kutatás szerint a fényintenzitás és a tápanyagok koncentrációja szerepet játszanak a *Planktothrix* vízvirágzások szabályozásában (Klemer et al., 1976). A *Planktothrix agardhii* esetében a fényintenzitás a fotoszintetikus szén metabolizmuson keresztül fejti ki hatását (Konopka et al., 1980). Alacsony fényintenzitás mellett, a fotoszintézis mértéke attól függ, hogy mennyi a fénnel érintkezésbe lépő sejtek száma, és független az adott hőmérséklettől. Azonban a hőmérsékletnek a fotoszintézis sötét

szakaszában kifejtett hatása meghatározza a maximális fotoszintetikus rátát. Amint a hőmérséklet nő, a megfelelő fényintenzitás és a maximális fotoszintetikus ráta egyaránt szükséges a maximális fotoszintetikus hatékonyság eléréséhez.

A *Planktothrix* fajok toxintermelésével kapcsolatban egyre több tudományos közlemény jelenik meg. A *Planktothrix*ek által termelt legfontosabb vegyületcsoport a mikrocisztin, amely a hepatotoxikus peptidek csoportjába tartozik és specifikusan gátolja a protein foszfatázokat (PP1A és PP2A). A mikrocisztin termelés a cianobaktériumokon belül az egysejtű (*Microcystis* spp.) és a fonalas szerveződésű (*Planktothrix* spp.; *Anabaena* spp.) fajokra egyaránt jellemző. Míg a *Microcystis*ekre a mikrocisztineknek több analógja (MC-LR, MC-YR, MC-RR) is jellemző (Chorus és Bartram, 1999), addig a *Planktothrix* genuszban inkább csak egy MC-RR-variáns dominál (Fastner, 1999). A mikrocisztin szintézist egy nem-riboszómális peptid-szintetáz (NRPS) valamint egy poliketid szintázból (PKS) álló enzimkomplex, a mikrocisztin szintetáz (MCS) végzi (Meissner et al., 1996; Dittman et al., 1997; Nishizawa et al., 1999, 2000; Tillett et al., 2000). Az NRPS-ek részt vesznek olyan lineáris és ciklikus peptid drogok szintézisében is, mint a penicillin, vankomicin, és ciklosporin (Konz et al., 1999; Marahiel et al., 1997). Olyan elemeket tartalmaznak, amelyek aktiválási, tiolizációs, modifikációs és kondenzációs feladatokat látnak el bizonyos szubsztrát aminosavak jelenlétében. A legkisebb NRPS-modul kondenzációs (C), adenilációs (A) és peptid szállító protein (PCP) doméneket tartalmaz. A nem-riboszómális peptidszintetázokhoz hasonlóan a PKS-modulok is többfunkciós elemek, amelyek ketoszintáz, aciltranszferáz és acil szállító protein doméneket tartalmaznak. Feladatuk az acil-koenzim-A monomerek összegyűjtése redukciós és dehidratációs folyamatok során (Cane et al., 1999). Az úgynevezett *mcy* génklaszter felelős azoknak az enzimeknek az expressziójáért, amelyek együttműködve részt vesznek a mikrocisztinek termelésében. Háromféle *mcy* génklaszter ismert, amelyek genusztól függően 9 vagy 10 génből állnak és nagyobbak, mint 55 kilobázispár. A *Planktothrix agardhii* esetében egy 55 kbp hosszúságú DNS-szakasról beszélhetünk, amely 9 gént tartalmaz. A kilenc génből nyolc (*mcyA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-G*, *-H* és *-J*) a *Microcystis aeruginosa* *mcy* szakaszával mutat hasonlóságot, és a toxintermeléshez szükséges enzimeket kódolja. A kilencedik gén a *mcyT*, amely a *Microcystis* genomban nem található meg. Az *mcy* klaszter 5' végéhez egy szenzor kinázért felelős gén kapcsolódik, amely feltehetően az egész génklaszter szabályozó eleme. A *Planktothrix* törzsekből származó mikrocisztinek bioszintéziséért felelős *mcy* gének szekvenciája teljes mértékben ismert (Christiansen et al., 2003). A génklaszter olyan elemeket tartalmaz, mint a peptid szintetázért felelős gének (*mcyABC*), a poliketid szintetázért felelős gének (PKSs; *mcyD*), az enzimkomplexért felelős gének (*mcyEG*), tioészteráz gének (*mcyT*), ABC transzporter gének (*mcyH*) és a peptid-modifikáló enzim kifejeződéséért felelős gének (*mcyJ*). A klaszter a gének elhelyezkedésében és az általuk expresszált termékekben is különbözik az egysejtű *Microcystis* fajok *mcy* szekvenciájától (Farkas et al., 2011).

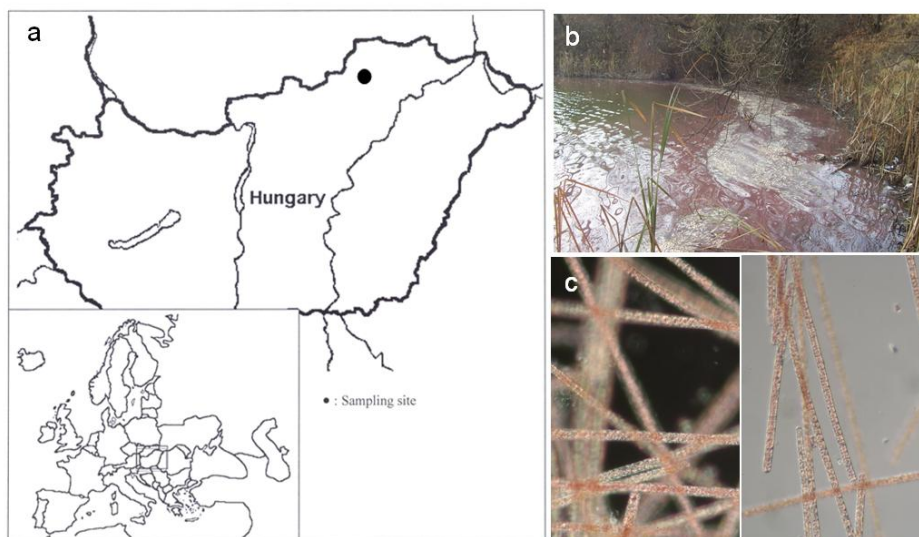
A fő domének funkciói (Welker et al., 2006): *Adenilációs domén*: Különböző karboxilsavak, aminosavak, iminosavak és hidroxisavak karboxilcsoportjának az aktiválását végzi. Minden A-domén másféle aminosavat ismer fel, és ATP segítségével, illetve egy savanhidridkötés kialakításával aktiválja azt. Körülbelül 200 adenilációs domént fedeztek fel cianobakteriális szekvenciákban. *Tiolizációs domén*: Intermediér termékek szállításában vesz

részt, miközben szoros kapcsolatot tart fenn az adenilációs és kondenzációs doménekkel. Ezeken túl kapcsolatban állhat epimerizációs, metiltranszferáz, oxidációs, redukciós, tioészteráz doménekkel azáltal, hogy segíti az intermedierek körforgását. *Kondenzációs domén (C-domén)*: Vizsgálatok szerint a domén rendelkezik egy aminoacil és egy peptidil oldallal (A-oldal és P-oldal), amelyek az intermedierek fogadásában vesznek részt. Egy másik kutatás szerint a körülbelül 160 cianobakteriális C-domén szekvenciája alapján nagyon hasonlít a *Bacillus* fajokban található doménekhez, amely azt a következtetést vonja maga után, hogy a doméneket funkciójuk alapján célszerű csoportosítani és nem taxonok szerint. *Heterociklizációs domén*: A domén katalizálja a peptidkötések térbeli elrendeződését, illetve a cisztein, szerin, treonin oldalláncok heterociklusokba (pl. oxazolin, tiazolin) rendezését. Ehhez a folyamathoz a doménnek N-acil-aminoacil-ra illetve megfelelő peptidil termékre van szüksége. *Tioészteráz domén*: A bioszintézis terminációs lépéseit katalizálja, peptid- és észterkötések létrehozásával illetve hidrolizációs bontásokkal. A terminációs reakció a szállító protein és a fogadó tioésztert tartalmazó peptid között lévő kötésen zajlik. Többnyire az összes PKS-rendszerrel rendelkező cianobaktérium tartalmazza ezt a domént. *Epimerizációs domén*: Az epimerizációs domének nagyon hasonlóak a kondenzációs doménekhez és ezért nehezen elkülöníthetők azoktól. Feladatuk az aminoacil és peptidilcsoportok epimerizálása a tioészter fázisban. Az L-konfigurációjú aminosavakból D-aminosavakat készít. A reverzibilis reakciót általában egy kondenzációs reakció követi. *N-metilációs domén*: A metilcsoport átvitelét végzi a tiol-csoporttal rendelkező aminosavakra. Az N-metil-transzferáz domének az adenilációs domének központi elemei (A8, A9) közé vannak integrálódva. A kb. 450 aminosavból álló domén hasonló szekvenciákat mutat az S-adenozil-L-metionin (SAM)-dependens metiltranszferázokkal (Velkov és Lawen, 2003). *Oxidációs domének*: Ezek a 200 aminosavból álló, NAD-kötő proteinekhez hasonló domének szintén az adenilációs doménekbe vannak ágyazva, az oxazolin és tiazolin gyűrűkből például oxazol és tiazol gyűrűket hoznak létre. *Redukciós domének*: Számos nem-riboszómális eredetű peptid tartalmaz redukált karboxilcsoportot vagy alkoholcsoportot a C-terminálison. Ezek mind egy kétlépéses redukciós folyamat során jönnek létre egy NADPH/NADH függő doménen keresztül.

További enzimek: *Foszfopantetein-protein transzferázok*: Cianobaktériumok bioszintetikus klaszterei gyakran tartalmazzák a PPT-k génjeit. A 26 kDa molekulásúlyú protein számos carrier proteint modifikál, köztük például az acil-szállító proteint és az aril-szállító proteint. *O-metil transzferázok*: Hidroxilcsoportok és metilén-csoportok metilációját végzik. *Dehidrogenázok*: Cink-függő cianobakteriális enzimekről van szó, amelyek a nostopeptolid és nostociklopeptid klaszterekben találhatók metil-prolin formában. *Halogenázok*: Kevés információ van róluk. A NAD-kötő helyet tartalmazó enzim tirozin és triptofán aminosavak aromás oldalláncainak halogénezésében vesz részt. *Tioészterázok*: A nem integrált tioészterázok pantetein-tiolok deacilálásában, NRPS rendszerek aktiválásában, szállító domének újraaktiválásában vesznek részt. A *Planktothrix* fajokban lévő NRPS enzimek nem csak a mikrocisztin szintézisét katalizálják, hanem részt vesznek olyan metabolikus útvonalakban is, mint a cianopeptolin, az anabaenopeptin, a mikroviridin, az aeruginosin és a mikroginin szintézise (Trine et al., 2009). A cianopeptolin klaszter 35 kbp hosszúságú, három nagyobb (*ociA*, *ociB*, *ociC*) és három kisebb gént (*ociD*, *ociG*, *ociH*)

tartalmaz. A kondenzációs (C), tiolizációs (T), és adenilációs (A) domének között metiltranszferáz (M), tioészteráz (TE) és glicerinsav (G) domének is találhatók. Az anabaenopeptin klaszter 25 kbp hosszúságú, öt gént tartalmazó (*anaA*, *anaB*, *anaC*, *anaD*, *anaE*) szakasz, amelyben az alap domének (A,T,C) kívül epimerizációs domén is felbukkan. A mikrogenin klaszter 4 génből áll (*micA*, *micC*, *micD*, *micE*), amelynek jellegzetessége a glutamát-szemialdehid-aminotranszferáz (GAAT), a ketoacil-szintáz (KS), acil-transzferáz (AT), és az acil szállító protein (ACP). Az aeruginosin termeléséért egy több mint tíz génből álló, 30 kbp hosszúságú génklaszter felelős. A mikroviridinek a *Microcystis* fajokhoz hasonlóan szintetizálódnak, a klaszter legfontosabb elemei a MdnA mikroviridin prekursor, az MdnBC ligázok és az MdnD acetilációs domén. Mint látható, a cianobaktériumok, és ezen belül a *Planktothrix* fajok toxintermelő rendszere meglehetősen összetett és egyben változatos a különböző fajok között. Más cianobaktériumokkal összevetve a *Microcystis* fajok mellett a *Planktothrix* fajok a legfőbb mikrocisztin termelők (Fastner et al., 1999). A mérsékelt övben a *Planktothrix* az egyik legfontosabb genusz a toxintermelő mikroszervezetek közül, amely a közép-európai mezotrófik és oligotrófik tavakban ugyanúgy megtalálható, mint az észak-amerikai tavakban (Chorus és Bartram, 1999).

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 (23. ábra).



23. 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, IC₅₀ értéke (50 %-os növekedésgátlás) 0,35 mg/ml-nek (*P. rubescens*) és 1,2 mg/ml-nek (*P. agardhii*) adódott. A toxintesztből kiderült, hogy a mustár csíranövény érzékenyen reagált a cianobaktérium sejttartalmára, hiszen a csíranövény hypocotil hossza a

kezelés hatására lecsökkent. A különböző *Planktothrix*-minták növekedésgátló hatását a 5. táblázatban foglaltuk össze. Jól látható, hogy 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 növényeken megjelenő nekrotikus foltok és anatómiai elváltozások mikrocisztinek jelenlétét valószínűsítik. A mikrocisztinek kimutatását, CE méréseinket a sejt kivonatával végeztük el. A mikrocisztin tartalmú *Planktothrix* minták esetében jól definiálható csúcsot kaptunk az anyag és módszer fejezetben leírt körülmények között, a bioteszt eredményeit alátámasztva a *P. agardhii* minták esetében a Bivalyos mintából mértük a legnagyobb MYC tartalmat (Farkas et al., 2014).

A környezeti planktonminták vizsgálata során a cianotoxinok bioszintézisét meghatározó gének detektálása és a kifejeződést befolyásoló tényezők (belső és külső környezeti faktorok) kimutatása fontos a cianotoxin-termelés mechanizmusának megértésében, de a monitorozásban, a toxikus vízvirágzás előzetes kimutatásában is. A különböző vizes élőhelyekről begyűjtött környezeti mintákban vizsgáltuk a *mcy* gének jelenlétét. Kísérleteink olyan kiválasztott *mcy* gének detektálására irányultak, amelyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a mikrocisztin bioszintézisében. Ezek a gének a *mcyA*, *mcyB*, *mcyCJ*, *mcyE*, *mcyEG*, *mcyHA*, *mcyT* és *mcyTD*, voltak. A PCR vizsgálatokat a környezeti minták felhasználásával végeztük, melyek gyűjtési helyeit és fajneveit az 5. táblázat szemlélteti. A mikrocisztintermelő szervezetek toxinszintézisének feltétele, hogy a *mcy* klaszter összes eleme jelen legyen a genomban. Ha a klaszter egyes génjei mutálódnak illetve inaktívvá válnak, a bioszintézis leállhat vagy a toxintermelés mértéke lecsökken. Ez a jelenség az általunk vizsgált tömegprodukciók esetén is megfigyelhető. A *Planktothrix rubescens* és a várpalotai *Planktothrix agardhii* törzsek toxintermelő szervezetek, a *mcy* génklaszter hiánytalan. A többi minta esetén nem figyelhettünk meg toxintermelést, ezzel párhuzamosan pedig a klaszter egyes génjeinek hiányát tapasztaltuk. A Hősök-tavából (Gyula) izolált *P. agardhii* esetében *mcyCJ* hiányról beszélhetünk, amely esetében kondenzációs, adenilációs, tiolizációs, tioészteráz és O-metiltranszferáz domének tűnnek el a peptid-szintetáz rendszerből. A *mcyJ* gén modifikáló és vágó funkciókat kódol a mikrocisztin bioszintézisben. A gén hiányában nem történik meg a metilcsoportok átvitele az Adda oldalláncára, illetve a delécio ismeretlen mikrocisztinek képződéséhez vezet. A hajdúhadházi mintákban az előbb ismertett *mcyCJ* génen kívül a *mcyE* és a *mcyHA* gének is hiányoznak. *McyE* hiány ketoacil-szintáz, aciltranszferáz, acil-szállító fehérje, aminosztransferáz, kondenzációs, adenilációs, tiolizációs funkciók elvesztésével jár. Az aminosztransferáz domén nagyon hasonló a glutamát szemialdehid aminosztransferáz doménhez, amely a mikroginin génklaszter eleme, és az aminocsoport Adda oldalláncra való átvitelben vesz részt. A *mcyH* legfőbb szerepe a mikrocisztin aktív transzportja. A *mcyA* sajátossága a klaszteren belül az epimerizációs funkció, amit csak ez a gén kódol, jelenléte esszenciálisnak tekinthető a mikrocisztin szintézis szempontjából. *McyA* delécioja során leáll a D-aminosav szintézis. A Kis-Balatonból származó törzsek *mcy* génklaszteréből a *mcyA*, *mcyB*, *mcyCJ*, *mcyE*, *mcyEG*, *mcyHA*, *mcyTD* elemek hiányát fedeztük fel. A *mcyB* nagy GC tartalmú gén nem tartalmaz az A, C, T doméneken kívül mást, viszont nagy átfedést mutat a *mcyA* génnel. Feltételezhető, hogy a *mcyB* kiesése a *mcyA* működésében zavart okozhat. A *mcyG* tiolizációs és adenilációs doméneken kívül ketoacil-szintáz, acil-transzferáz, ketoreduktáz, és ACP doméneket

tartalmaz, mutáció esetén ezek sérülnek. A *mcyD* a klaszter legnagyobb génje. Csak PKS doméneket kódol, ezért hiánya során gátlódik a PKS szintézis és ebből kifolyólag a toxintermelés is. Feltűnő, hogy a nagy GC tartalmú *mcyT* minden gélen megjelent. Pontos funkciója még ismeretlen, viszont mivel ez a gén a *mcy* génklaszter kezdő szekvenciája, valószínűleg az átírásban lehet szerepe. Az eredményeink alapján a *mcyT* jó marker lehet *Planktothrix* fajok jelenlétének igazolására (Farkas et al., 2014).

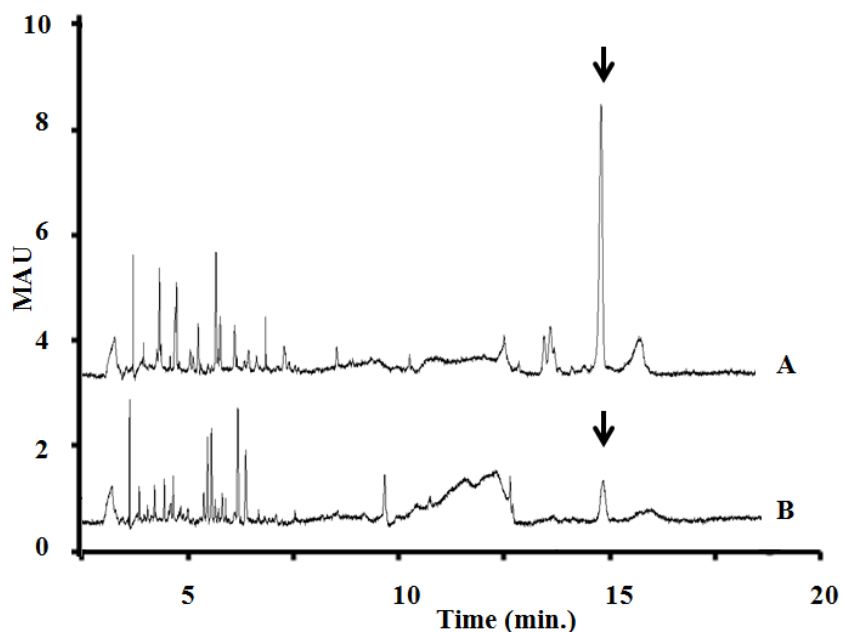
A *P. rubescens* megjelenése és tömeges előfordulása nem nevezhető szokványos jelenségnek hazánkban. Ahogyan bemutattuk, a faj elsősorban valódi rétegzett tavakban szokott tömegesen elszaporodni, Európában leginkább az alpesi országok víztereinek jellemző toxintermelő cianobaktérium faja. A szirmabesenyői Kocka-tó néhány fizikokémiai jellemzőjét a 8. táblázatban foglaltuk össze.

8. táblázat. Néhány jellemző fiziko-kémiai változó a Kocka-tóban az algavirágzás idején (Vasas et al., 2013).

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

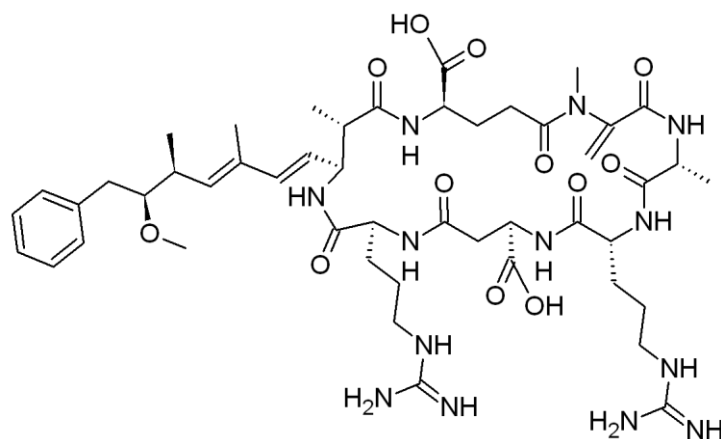
Bár hazánkra nem jellemző a tartósan rétegzett alpesi jellegű tavak jelenléte, egyes észak-magyarországi kavicsbányatavak hidrológiai viszonyai kedvező feltételeket teremthetnek az említett fajnak. A vizsgált kavicsbányató legnagyobb mélysége csupán 7 m, viszont a tó vízszintjét 3-4 méteres meredek part veszi körül, védve ezzel többek között a szél zavarásától, a felkavarodástól. Ez lehetővé teszi a tartós rétegződést és a stabil metalimnion kialakulását, ami kedvez a *P. rubescens* elszaporodásának. A vízben mért alacsony foszfor- és magas nitrogén formák koncentrációja, ahogyan több alpesi víztérben is megfigyelték, szintén kedvező feltételeket teremt a faj megjelenésének (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 (24. ábra).



24. 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., puffér: 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 (25. 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.

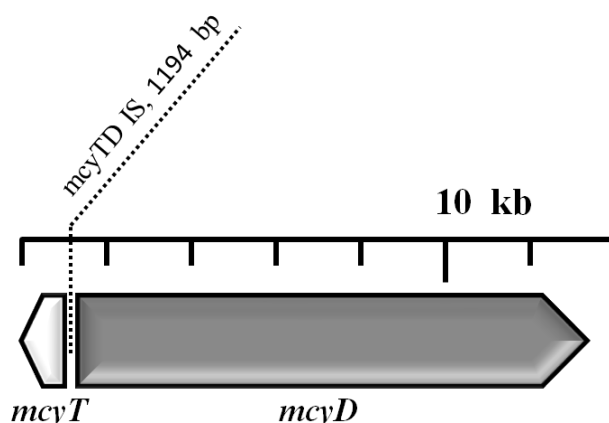


25. ábra. A *P. rubescens*-ből azonosított mikrocisztin [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR (Vasas et al., 2013).

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). Ahogyan részletesen bemutattuk, a környezeti feltételek egy adott törzs esetében változtathatják a toxintermelés mértékét, de egy algavirágzás szempontjából a legmeghatározóbb az vízvirágzást alkotó egyedek genetikai háttere, variabilitása. Azaz a toxintermelő és nem toxintermelő, valamint a különböző mértékben termelő egyedek aránya a populációban határozza meg az algavirágzás jellemző toxintartalmát. Jelen esetünkben egy olyan termelő szervezetet izoláltunk, amelynek kapcsán joggal merült fel a kérdés, hogy a toxintermelésért felelős klaszter teljesen épen jelen van-e a törzsben, inszerciós vagy deléciós szekvenciákat találunk-e a klaszterben.

Az 55 kb hosszúságú klaszter 9 génjének analízisét végeztük el összevetve a *P. agardhii* CYA 126/8 referencia törzzsel. 500 bp-t átfogó primerek segítségével vizsgáltuk a teljes klasztert és az elvárt PCR termékektől eltérő méretű szakaszokat szekvenáltuk. Egy pozícióban (23 612-24 003 nt) találtunk a vártnál kisebb terméket, ami a *mcyE* és *mcyG* gének közötti szpészer régióban lokalizálódott. A deléció mellett egy inszerciós szekvenciát azonosítottunk, amikor a *mcy3*–as primerpárt használtuk (945-1399 nt). Az inszerciós szekvencia a *mcyT* és *mcyD* gének közötti szpészer régióban lokalizálódott és 1606 nt hosszúságúnak határoztuk meg. Az inszerciós szekvencia a *mcyT* régió közvetlen szomszédságában található és hatással lehet a *mcyT* MC szabályozó funkciójára, ami nagyban befolyásolhatja a toxintermelést (Vasas et al., 2013).



26. ábra. A 1194 nt hosszúságú detektált inszerciós elem lokalizációja a *Planktothrix* *mcy* génklaszter *mcyT* és *mcyD* közötti régiójában (Vasas et al., 2013).

Mivel a toxin termelésében résztvevő domének szoros kapcsolatban állnak egymással, egy funkcionális fehérjerész inaktivitása negatív hatással lehet a többi működésére. Ez a jelenség nem egyedi a *Planktothrix* genuszra nézve, a cianobaktériumokra általánosan jellemző. Egy cianobaktériumfaj különböző populációi eltérő mértékben lehetnek toxintermelők, illetve az is előfordulhat, hogy egy, ugyanazon fajba tartozó populáció egyáltalán nem termel toxint. Egy nagyobb toxicitású szervezet, még ha a nagyszámú, toxint nem termelő alfajok között kis számban is van jelen, okozhat jelentős mértékű toxikus vízvirágzást (Chorus és Bartram, 1999; Carmichael, 1993). Ez azt jelenti, hogy azok a minták, amelyek a toxintesztek során nem minősültek toxintermelőnek, igenis tartalmazhatnak

toxintermelő egyedeket. A cianobakteriális tömegprodukciók természetesen vegyes genetikai állományú egyedekkel rendelkeznek, munkánk során az vetődött fel, hogy egy ilyen vízvirágzás összességében mennyire toxintermelő, mennyire toxikus. Szintén jellemző az alga-produkciókra és így az általunk vizsgált populációkra is, hogy a mikrocisztinek több mint 100 variánsa eltérő variabilitással jelenik meg bennük, illetve a mikrocisztineken kívül egyéb toxinok is kimutathatók. Egyes cianobaktériumfajok hepatotoxikus mikrocisztineken kívül neurotoxikus alkaloidokat és szaxitoxinokat is termelnek. A *Planktothrix* szervezeteink metanolos extraktumával elvégzett MALDI-TOF analízis során kiderült, hogy a szervezetek a jellemző mikrocisztin variánsokon kívül számos különböző lineáris és ciklikus peptidet termel, amelyek szintén befolyásolhatják a toxikusságot. A biológiailag aktív komponensek közül több toxintermelő cianobaktériumra jellemző peptidet azonosítottunk, amelyek elsősorban proteázinhibitorok. Az azonosított kasumigamid- és mikroginin variánsok lineáris-, az anabaenopeptin B és F ciklikus peptidek. Az említett peptid típusú toxinok a szervezet toxicitását nagyban növelik, valamint az utóbbi évek hidrobiológiai és ökotoxikológiai vizsgálatai kimutatták, hogy elsősorban egyes zooplankton szervezetekre, főleg *Daphnia* fajokra gyakorolnak erősen toxikus hatást (Baumann és Jüttner, 2008).

A vizsgálatunk tárgyát képező *Planktothrix* fajok az Északi-félteke édesvízeiben általánosan előforduló szervezeteknek tekinthetők, Európában és Észak-Amerikában egyaránt idézhetnek elő algavirágzást. Munkánk során, a hazai vizekből két *Planktothrix* fajt, a *P. agardhii*-t és a *P. rubescens*-t sikerült azonosítani.

A *Planktothrix agardhii* a mérsékelt övi eutrofikus vizek kedvelője, Magyarországon épp olyan általános a megjelenése, mint Európa más területein. Hazánkban biztosítottak a nyári-nyár eleji vízvirágzáshoz szükséges környezeti faktorok, ugyanakkor toxintermelése nem általánosítható. A vizsgált mintáink között találtunk erősen toxikus állományt (várpalotai minta) de jellemzőbb a kevésbé toxikus megjelenési forma (Vasas et al., 2009).

A *Planktothrix rubescens* magyarországi megjelenése azonban figyelemreméltó, tekintve, hogy nem vagyunk alpesi ország, valódi rétegzett mély tavaink száma csekély. A vízvirágzások túlnyomó részét Magyarországon a prokarióta cianobaktériumok idézik elő elsősorban a nyári időszakban, intenzív zöldes, kékes, sárgás színnel (Carmichael, 1994; Vasas, 2002; 2004). A 7 méteres mélységű Kocka-tó felszínén megfigyelt novemberi vízvirágzás azonban szokatlan, vörös színű volt. Laboratóriumi vizsgálatok kimutatták, hogy a jelenséget a *P. rubescens* okozta. A vörös színű cianobaktérium észak-magyarországi megjelenése azért szokatlan, mert a fajt eredetileg hidegvízi sztenoterm szervezetként tartják számon, amely Közép-Európa és Dél-Európa szubalpin, alacsony hegyvidéki, mély tavaiban terjedt el. Ezekben a tavakban a rétegződést mutató cianobaktériumok stabil nyári populációkat hoznak létre a termikusan rétegződő tavak és víztározók metalimnionnak nevezett közbülső zónájában. A *Planktothrix rubescens* által előidézett vízvirágzás nem más, mint a populációnak a metalimnionból a vízfelszínre történő vertikális migrációja, amely a sejtek gázvezikuláinak segítségével valósul meg. A vízkémiai paramétereket áttekintve elsősorban a pH, fajlagos vezetőképesség és a összes szerves szén adatait emeljük ki. A felszínen található *Planktothrix rubescens* tömeg megjelenéséért feltételezhetően a víz hőmérséklete a felelős. A víz hőmérséklete 4 °C fokos volt, feltehetően az őszi felkeveredésnek köszönhetően jelent meg a szervezet nagyobb tömegben a víz felszínén. A fő

célunk a szervezet toxintermelésének jellemzése volt, hiszen az elsősorban alpesi országok tavaiban előforduló *P. rubescens* az erősen toxikus szervezetek közé sorolják. 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).

7. A *Cylindrospermopsis raciborskii* toxintermelésének sajátosságai

A *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya et Subba Raju fonalas cianobaktérium jellegzetes morfológiai sajátosságokkal bír nitrogénkötés körülményei között. Fonalai terminálisan heterocisztákat hordozhatnak (28. ábra). A trichoma magányos, egyenes vagy enyhén hajlott, nyálkás hüvely nélküli. A sejtek hossza meghaladja szélességüket. Hosszúságuk 7-10 μm , szélességük 2-4 μm . A sejtek jellegzetes tilakoid mintázatot mutatnak, szórtan gázvakuólumokat tartalmaznak. Apikális sejtje kúp alakú. Terminálisan heterocisztát tartalmazhat, amely lág vagy kúp alakú. A heterociszta 3-5 μm széles és 3-8 μm hosszú (Anagnostidis és Komarek, 1988; Padisák és Istvánovics, 1995; Padisák, 1997).

Először *Anabaena raciborskii* néven írta le Woloszynska a szóbanforgó szervezetet 1912-ben. A faj egy olyan anyagból került elő, amelyet Raciborskii professzor hozott 1899-1900-as gyűjtései során, Jáva szigetéről egy Rawa Damangan nevű tóból. A *Cylindrospermopsis raciborskii*-t Skuja egy Jáva-szigetén található tóból írta le és az indo-malaysiai "alga flóra" meghatározó elemének tartja. Vinogradska által közölt információkból tudjuk, hogy e faj "szertelen, túlzó" terjeszkedésével jó néhány felszíni víztérben megjelent, amely hőmérséklete meghaladta a 25 °C-t (Singh, 1962; Padisák, 1997). Jelenlegi elterjedési területét tekintve e szervezetet megtalálták szinte az egész világon Közép-Ázsiában, Indiában, Európában, Észak-Amerikában és Ausztráliában (Kinnear, 2010). Hazánkban a *Cylindrospermopsis raciborskii*-t 1977-ben figyelték meg először a Szelidi-tóban és a Tiszában. A Balatonban 1978-ban találták meg. Jelenleg hazánkban már jó néhány felszíni víztérben előfordul (Hamar, 1977; Hindák, 1988; Padisák, 1997).

A nemzetközi közvélemény (a köznapis és a tudományos) egy ausztráliai vízvirágzás során figyelt fel e fajra. 1979 novemberében Palm Island-en, Észak-Queensland-ben 148 ember került súlyos májgyulladásos kórházba, mert a *Cylindrospermopsis raciborskii* belekerült a vízvezeték-hálózatba. A faj egy Solomon Dam nevű ivóvíztározóban idézett elő vízvirágzást, és hogy a vízvirágzást letörjék, a vizet rézszulfáttal kezelték. A kezelés hatására kerültek az ivóvízbe a sejtek anyagcseretermékei, így a cilindrospermopszin nevű cianotoxin is (Hawkins et al., 1985). A toxin által előidézett megbetegedés jól elkülöníthető az egyéb gastroenteriszeketől. Az ausztráliai, hasonló jellegű megbetegedések nem új keletűek, hiszen a múlt században leírásra került Barcoo-láz tünetei egyeznek a Palm-Islandi titokzatos betegség tüneteivel. Az ausztrál orvosi szakirodalom történeti áttekintése nyomán Hayman (1992) azonosítja a Barcoo lázat a cilindrospermopszin mérgezéssel (Hayman, 1992).

Az *Aphanizomenon ovalisporum* egy másik potens cianobaktérium faj, melynek cilindrospermopszin termelését számos esetben leírták (Kinnear, 2010). Az *A. ovalisporum* elsősorban a trópusi, szubtrópusi területeken tömeges, de a mérsékelt övben, így hazánkban is előfordul. A faj a vízvirágzást okozó cianobaktériumok között tartható számon. Ahogyan arról korábban már volt szó, legismertebb az 1994-ben, az izraeli Kinneret-tóban lezajlott tömeges elszaporodása (Berman, 1997; Pollingher et al., 1998; Hadas et al., 1999). Shaw és munkatársai leírták a faj virágzását Ausztráliában (Shaw et al., 1999), később pedig két görögországi tóban való megjelenéséről számoltak be (Gkelis et al., 2005).

Az *A. ovalisporum* toxikus cianobaktérium. A Kinneret-tóból izolált törzs által termelt toxint Banker és munkatársai (1997) jellemezték, a toxin a citotoxikus alkaloidok közé tartozó

cilindropermopszinnek bizonyult (a toxinról részletesebben a 2. fejezetben szóltunk). Későbbi vizsgálatok azt mutatják, hogy az izolált toxikus törzsek mindegyike cilindropermopszint termel. (Shaw et al., 1999; Gleiks et al., 2005).

Az elmúlt időszakban feltűnő az egyes vizekben megjelenő nitrogénfixáló szervezetek nagy aránya és azon belül is a *Cylindropermopsis raciborskii* jelenléte hazai és a világ számos pontján megtalálható vizekben (Sivonen et al., 1990; Skulberg, 1994; Harada et al., 1994; Hawkins et al., 1997). A cilindropermopszin-analízisek kapcsán megvizsgáltuk a különböző vizek planktonmintáit és a potenciálisan cilindropermopszin-termelő szervezeteket izoláltuk, megvizsgáltuk toxicitásukat (Vasas et al. 2010).

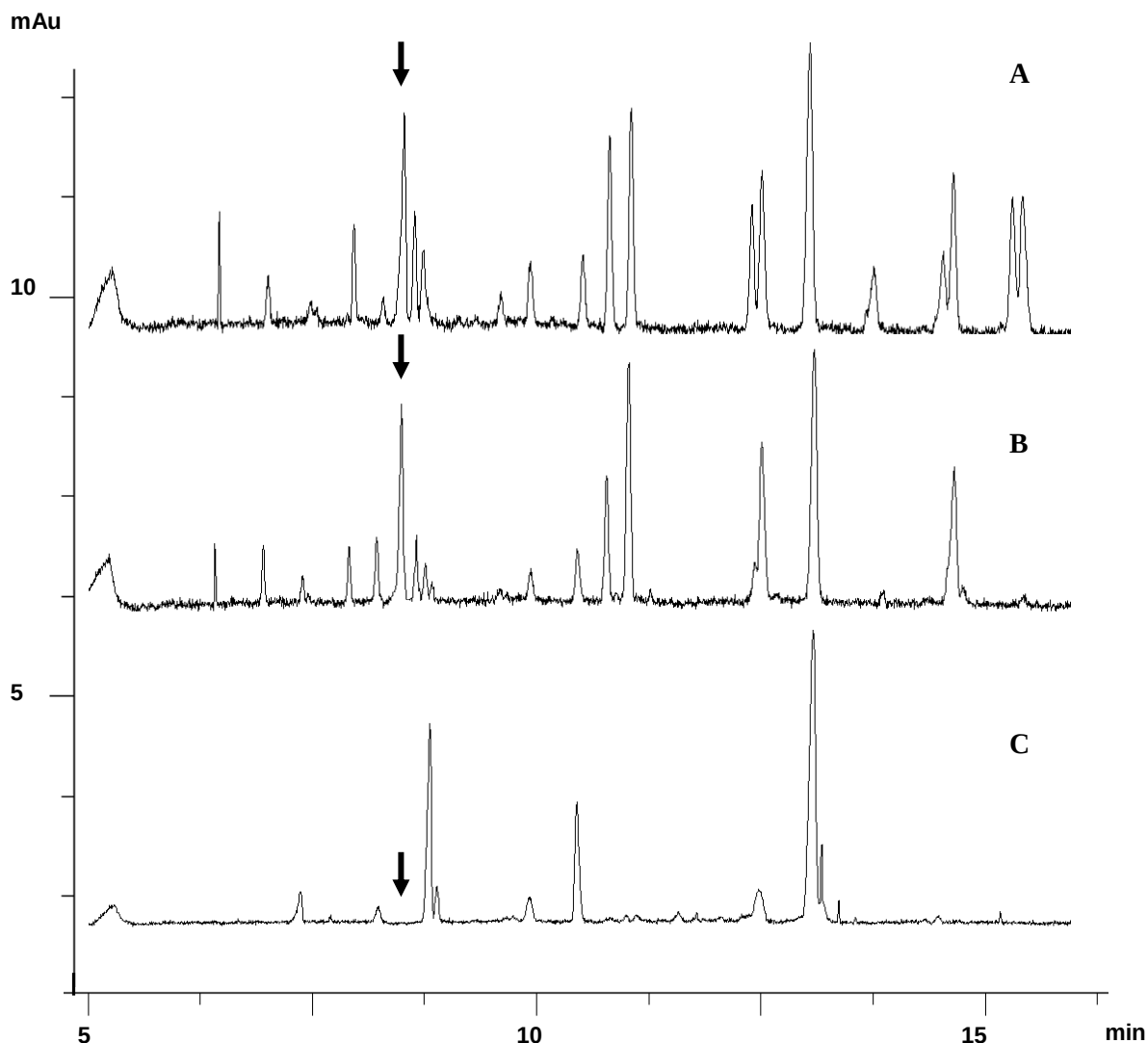
9. táblázat. Cianobaktérium törzsek/ algavirágzásminták cilindropermopszin analízise (Vasas et al. 2010).

faj	törzs	származási hely	PS/PKS gén	CYN tartalom mg/g
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	BGSD-266*	Balaton	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	BGSD-2000	Balaton	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	BGSD-2001	Balaton	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	BGSD-410	Kis-Balaton	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	BGSD-280	Szelidi tó	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	AQS**	Ausztrália	+/+	3.94
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	plankton minta	horgász tó, Doboz	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	plankton minta	Endrődi-holtág, Hungary	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	plankton minta	Békás tó, Debrecen	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	plankton minta	horgásztó, Zamárdi	-/-	n.d.
<i>Cylindropermopsis raciborskii</i>	plankton minta	Leveleki tározó	-/-	n.d.
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	ILC-164***	Izrael (Kineret tó)	+/+	4.78
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	BGSD-300	botanikus kerti tó, Blanes, Spain	+/+	4.52
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	BGSD-301	Szelidi tó	-/-	n.d.

11 *C. raciborskii* minta cilindropermopszin tartalmát vizsgáltunk meg, ebből 10 hazai és egy ausztráliai (AQS) minta volt (9. táblázat). Az összes magyarországi minta a toxin

termeléséért felelős génekre (*PKS* és *PS* gének) nézve negatívnak mutatkozott (9. táblázat). 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 (27. ábra).



27. ábra. *A. ovalisporum* cylindrospermopszin analízise. **A:** Izrael (ILC-164) CYN jelenlétét a nyíl mutatja; **B:** Spanyolország, Blanes (BGSD-300) CYN jelenlétét a nyíl mutatja; **C:** Magyarország, Szelidi-tó (BGSD-301) a CYN hiányát a nyíl mutatja; (MEKC: 25 mM nátrium-tetraborát, 100 mM SDS, pH 9,3; Vasas et al. 2010).

A különböző vizekből izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek toxicitása mustár csíranövénytesztben, vízterenként különbözött, amely alátámasztja azt a törvényszerűséget, hogy a cianobaktériumok toxicitása, egy adott cianotoxin termelése nem köthető kizárólagosan egy fajhoz, hanem a fajok egyes izolátumainak jellemzője. A magyarországi, általunk izolált törzsekről általánosan elmondható, hogy cylindrospermopszin jelenlétére utaló jeleket sem genetikai háttér sem a tesztekben megfigyelhető toxinspecifikus hatások során nem találtunk.

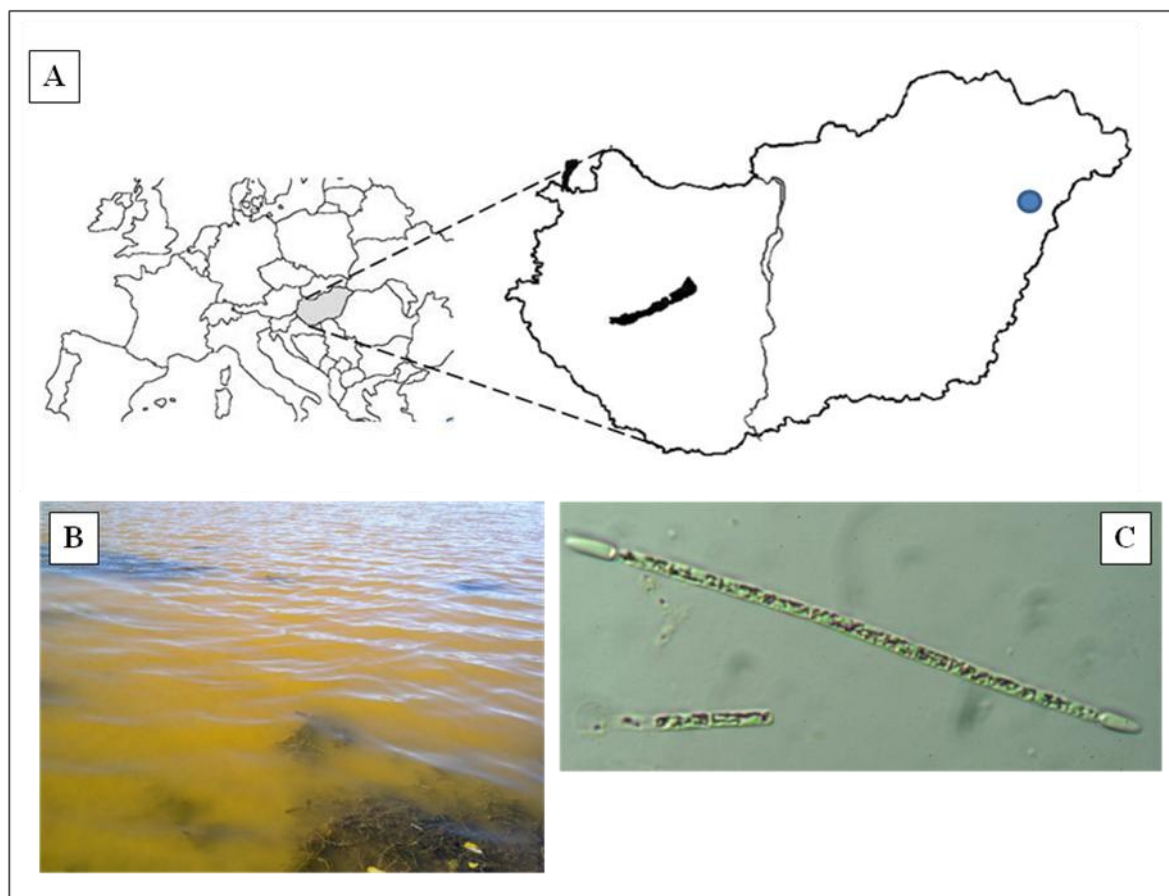
A toxin tényleges jelenlétét bizonyító méréseink alapján a magyarországi *C. raciborskii* és *A. ovalisporum* virágzásminták valamint izolátumok cilindrospermopszint nem tartalmaztak. Az ismert CYN termelő törzseknél egyértelműen bizonyítottuk a toxin jelenlétét és egy spanyolországi *A. ovalisporum* kapcsán is bizonyítottá vált a termelése (Vasas et al. 2010).

A magyarországi vizek *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumának cilindrospermopszin analízise természetesen nem általánosítható a magyarországi vizekben jelenlévő *C. raciborskii* törzsekre, nem zárható ki cilindrospermopszin termelő törzsek jelenléte Magyarországon, azonban a Balatonból származó több év izolátumának analízise valószínűsíti, hogy a Balatonban előforduló, szeptemberi időszakokban tömegprodukción adó *Cylindrospermopsis raciborskii* nem termel cilindrospermopszint (Vasas et al. 2010).

A cilindrospermopszin egy *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsből került leírásra, azóta több publikáció jelent meg cilindrospermopszint nem termelő *C. raciborskii* izolátumokról és sorra kerültek leírásra egyéb fajok (*Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*, stb.) melyek egyes izolátumai termelik az alkaloid típusú cilindrospermopszint (Othani és Moore, 1992). Az Ausztráliából származó izolátumaink (BGSD AQS, LT) szintén alátámasztották, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* CYN termelése eseti, hiszen az AQS izolátumunk termeli, míg LT izolátumunk nem termeli az alkaloid típusú hepatotoxint (Vasas et al. 2010).

Laboratóriumunk egyik modell-szervezetének, az Izraelből származó *Aphanizomenon ovalisporum*-nak (BGSD-423) a cilindrospermopszin analízisét az előzőekben részletesen tárgyaltuk. 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. Az említett időszakban a Debrecen melletti Fancsika tározó és horgásztóban tonnányi mennyiségű hal pusztult el. Az év végi időszak, a 4-5 °C -os víz ugyan nem valószínűsítette, de 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 zöldes 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).



28. 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).

A tározóban a nyári oxigénhiányos állapotokban gyakran jelentkezik részleges, néhány hal egyedet érintő elhullás, pipálás, de jellemzően ilyenkor a víz oldott oxigéntartalmára érzékeny fajokat érinti a jelenség. Jelen esetben 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 megfigyelhető volt a víz partján.

Az algavirágzásból gyűjtött mintából valamint annak fenntartott izolátumából megvizsgáltuk a lehetséges ismert toxinok jelenlétét. A faj már említett mozaikos toxintermelési képessége miatt mikrocisztin variánsokra, cilindrospermopszinre, anatoxin-a-ra végeztünk a már részletesen ismertetett körülmények között vizsgálatokat. Az ismert toxinok jelenlétét nem tudtuk igazolni és a dél-amerikai törzsekre jellemző szaxitoxin (Na^+ csatorna blokkoló) analógok jelenlétét is kizárhattuk specifikus elektrofiziológiai tesztek segítségével (akciós potenciálok amplitudójának csökkenése, alakjának torzulása az algakivonat jelenlétében).

Ugyanakkor 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 ugyanezek a sejteken ugyancsak nikotinerger blokkolónak bizonyult, míg a CYN termelő AQS (20 mg/ml-ig tesztelve) nem váltott ki reprodukálható vagy dóziszfüggő 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).

Amióta a *C. raciborskii* tömeges megjelenései kapcsán 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 (Runnegar et al., 1994; Terao et al., 1994; Bell és Codd, 1994; 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 elterjedésekor ugyan cilindrospermopszin jelenlétét igazolták vízterekben, de utólagos vizsgálatok egyértelművé tették, hogy annak termeléséért más, elsősorban *Aphanizomenon* fajok voltak felelősök. 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).

8. Cianobakteriális toxinok jelentősége a mikroalgák hasznosítása során

Az algák és cianobaktériumok kapcsán felmerülő toxinok variabilitásának a környezetben betöltött sajátos és részben tisztázatlan szerepe mellett néhány, az emberek mindennapjait érintő összefüggése is van, melyek az algaszervezetek hasznosítása mentén kerülnek elő (Becker, 2004).

Az egyik ilyen kifejezetten káros következmény: a táplálékként illetve táplálék-kiegészítőként hasznosított alga és cianobaktérium fajokban megjelenő toxinok közvetlenül a humán szervezetre gyakorolt hatása (Cardozo et al., 2007). A másik jelenség az alगतoxinok kétarcúságára hívja fel a figyelmet, hiszen az ismert toxinok és az algákból folyamatosan azonosított erős hatású komponensek veszélyesek, mérgezőek, de sokszor különleges hatással bíró ígéretes metabolitok (Gademann és Portmann, 2008; Araoz et al., 2009; Vasas et al., 2010). Számos példát ismerünk arra, hogy ezeket a komponenseket a farmakológia vagy a biológiai és a gyógyszer tudományokat érintő gyakorlat hasznosítja (Fattorusso és Tagliatela-Scafati, 2008; Bhakuni és Rawat, 2005). Jelen fejezetünkben az algavirágzásokat és azok toxinjait, mint fontos természetes hatóanyagforrásokat is tárgyaljuk és felhívjuk a figyelmet a jelentőségükre.

8.1. Táplálék kiegészítők

Az algák tömeges megjelenései, mint ahogyan említettük már, elsősorban az utóbbi évtizedek civilizációs tevékenységeinek is köszönhetőek (Chorus és Bartram, 1999), de a múltban is számos példa volt algavirágzásokra, algák tömeges megjelenésére (Reynolds, 1975). Az ilyen jelenségek gyakran állati vagy emberi mérgezésekhez kötődtek, de már az ősidőkben is felmerült az ilyen jelenségek mentén a felszaporodó mikroalgák hasznosítása, fogyasztása (Becker, 2004).

Napjainkban több mint 10^7 tonna algát takarítanak be évente a világ nagyvállalatai különböző céllal. A betakarított algát például étkezésre szánva értékesítik, vagy más esetben különböző technológiákat alkalmazva csupán néhány anyagcseretermék hasznosul (Garson, 1989; Vasas, 2011). Jelentős volt a múlt században az algák által termelt poliszacharidok ipari alkalmazása is. Az 1940-es évektől kezdve került egyre inkább előtérbe az alga, mint állati takarmány kagyló vagy halfarmokon (Albertus, 2004). Az alkalmazott algológia 1948 után indult jelentős fejlődésnek és a világ számos országában célul tűzte ki az algafehérje illetve zsiradék táplálék formájában történő hasznosítását (Ale et al., 2011). Az algák által termelt biológiailag aktív anyagcseretermékek vizsgálata során az első célkitűzés antibiotikumok izolálása volt. Az 1960-as években a *Chlorella* mint új élelmiszer sikeresnek bizonyult több országban és számos cég kezdett el foglalkozni az algák tömeges tenyésztésével. Az 1970-es évekbeli energiaválság volt az, ami elsőként elindította azt az elgondolást, hogy a hozzáférhető alगतömegből megújuló energiaforrásként lehetne üzemanyagot, illetve hasznosítható energiát előállítani (Randall et al., 2001). Az 1980-as években egyre több, a gyógyászatban, farmakológiában hasznosítható biológiailag aktív komponenst izoláltak és azonosítottak. Az 1980-as években már több nagyüzem működött a világban amely *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* illetve *Haematococcus* fajok tömeges tenyésztésével foglalkoztak. A

90-es évektől kezdve a megfogalmazott igények és lehetőségek kiszolgálására transzgenikus algatorzsek előállítását tűzték ki célul egyes laboratóriumok, amelyek segítségével próbálták optimalni a speciális anyagcseretermékek hozamát (Hallmann, 2007).

A planktonikus algák fogyasztásának etnobotanikája jóval szegényesebb, ha összevetjük az edényes flórához tartozó társaikkal, hiszen méretüknél fogva sokáig láthatatlanok voltak a hétköznapi ember számára. Ettől függetlenül ismerünk erre példát, hiszen fennmaradt írásos dokumentumokból tudjuk, hogy *Spirulina* elszaporodott tömegeit már fogyasztották több száz évvel ezelőtt is. A *Spirulina* emberi fogyasztásáról az első adatok az 1500-as évek elejéről származnak egy Benavente nevű atyától. Megfigyelései szerint a mexikói indiánok vizekben felszaporodó zöldes hártát gyűjtötték és az aztékok kedvelt tápláléka volt, elmondásaik szerint az algák fogyasztása jó erőnlétet biztosított számukra. Hasonló megfigyeléseket a Csád-tó környéki bennszülöttek esetében is leírtak, ők is szívesen fogyasztották a lúgos vizű tavuk felszínét beszövő kékes színű hártaszerű algát (Cardozo et al., 2007). Kínából is fennmaradtak olyan beszámolók, amelyek *Nostoc* fajok fogyasztásáról szóltak. Egy éhínséges időszakban egyéb táplálék híján, a környéken található nedves, vizes élőhelyeken elszaporodó jelentős nyálkatartalommal bíró *Nostoc* telepeket fogyasztották (Karkos et al., 2011).

A jelenkor részben a divaton, részben a megismert bizonyítékon alapuló *in vitro* és *in vivo* vizsgálatainak köszönhetően egyes cianobaktériumfajok közkedvelt táplálék-kiegészítőkként kerültek forgalomba. A *Spirulina* felkerült az amerikai Food and Drug Administration GRAS kategória listájára (általánosan biztonságosnak elismert élelmiszerek). 2011-ben a DSI-EC (The Dietary Supplements Information Expert Committee) of the United States Pharmacopeial Convention (USP) A osztálybeli biztonsági kategóriába sorolta a *Spirulina platensis* a szakirodalomban fellelhető 34 mellékhatás tanulmányozása során (Marles et al., 2011).

Ugyanakkor a *Spirulina* előretörésével szorult vissza egy másik cianobaktérium faj alkalmazása a Super-Blue-Green fantázianevet is viselő *Aphanizomenon* termék, amely kapcsán számos tanulmány rávilágított a faj nem csupán potenciális, hanem valós mérgezőképességére a benne található jól ismert mikrocisztinek miatt. Az *Aphanizomenon* genusz tagjaiból kimutatott toxinok sokfélesége természetesen további indokot szolgáltatott a termék háttérbe szorulásának (Vasas, 2014). A cianobaktériumok esetében a már tárgyalt toxintermelés sajátossága, hogy fajhoz egyértelműen nem rendelhető, hanem fajok egyes populációjához vagy kemitípusához kapcsolhatóak. Az újabban publikált analízisek megerősítik, hogy egyes táplálék-kiegészítőként alkalmazott *Spirulina* készítményekben is találtak ismert algatoxinokat (Cardozo et al., 2007).

További mikroalgák a *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Dunaliella* sp., melyek szintén komoly humán felhasználással bírnak és egyre népszerűbbek napjainkban. Az algák tömeges előállítására egyes alfafajok hasznosításának kapcsán merült fel az igény, hogy a megjósolhatatlan természetes körülmények között bekövetkező tömegprodukción túl, tudatos emberi tevékenységként szabadtéri vagy zárt rendszerekben előre tervezhető hozammal megoldható legyen egyes fajok gazdaságos nevelése (Cardozo et al., 2007; Hallmann, 2007). Akár természetes vagy mesterséges nyílt nevelőrendszerekről beszélünk, a létrehozott algakultúrák esetében gyakori fertőző „vendég” fajok jelenhetnek meg, mint pl.

Microcystis, *Limnothrix* vagy *Synechococcus* fajok, melyek kapcsán toxintermelést (mikrocisztinek és anatoxin-a) írtak le (Marles et al., 2011).

A táplálék-kiegészítőként használt algafajok esetében napjainkra már aktuális igényé vált az ismert toxinok analízise. A termékek ellenőrzése egyre szigorúbbnak mondható, de az algatoxinok ilyen irányú mérgezései és hatásai aktuális problémát jelentenek.

A táplálék-kiegészítő mikroalga fajok közül a legnépszerűbb *Spirulina* termékek indikációit mutatjuk be részletesen, melyek elsősorban a bizonyítékon alapuló alkalmazásoknak megfelelően tudományos hatásvizsgálatokon keresztül nyertek bizonyítást (Kay, 1991; Vasas, 2014).

Allergia, nátha és immun moduláció

A spirulináról ismert, hogy rendelkezik gyulladásgátló tulajdonsággal. Randomizált, kettős-vak placebo-kontrollos vizsgálatot végeztek allergiás náthával rendelkező egyéneken 12 héten keresztül. Perifériás vér mononukleáris sejteket izoláltak a vizsgálat előtt és után és mérték a citokin szinteket, melyek fontosak az immunglobulin E (IgE) mediálta allergia szabályozásában. A kísérletek kimutatták, hogy a magas dózisú *Spirulina* csökkenti az interleukin-4 citokin szintet. Ezen kívül a tüneteket is csökkentette, mint az orrfolyást, tüsszögést, orrdugulást és viszketést. Az alga immunmoduláló aktivitását az emberi nyálban megemelkedett IgA szint mérésével támasztották alá (Karkos et al., 2011).

Antivirális aktivitás

In vivo vizsgálatok tapasztalatai nem erősítik meg ezt a hatását az algának. Viszont *in vitro* a szulfatált poliszacharid, a kalcium-spirulan, mint aktív összetevő gátolja a burokkal rendelkező vírusok replikációját. Ilyen vírus a HHV1, CMV, HIV 1, kanyaró, mumpsz és influenza A. Más vizsgálat is alátámasztja azt, hogy a Ca-spirulan gátolja a HIV 1 szaporodását a T-sejtekben, perifériás vér mononukleáris sejtekben és a Langerhans sejtekben (Marles et al., 2011).

Koleszterinszintre kifejtett hatás

15 önkéntes férfi 8 hétig kapott *Spirulinát* és a vizsgálat során megfigyelhető volt, hogy az LDL koleszterinszint jelentősen csökkent, míg a HDL szint növekedése nem volt szignifikáns. Az aterogén hatás is csökkent. Egy másik tanulmányban ischaemiás szívbetegeknek adtak *Spirulinát* és az eredmények alapján megállapították, hogy csökkent a triglicerid-, koleszterin- és LDL szint. A HDL koleszterin mennyisége emelkedett a vérben. 15 cukorbeteg páciens is vizsgáltak, akik szintén *Spirulinát* kaptak. Ezeknél a betegeknél az LDL: HDL arány jelentősen csökkent, de ez még kevés bizonyíték ahhoz, hogy cukorbeteg kezeléseként ajánlják (Karkos et al., 2011).

Daganat ellenes tulajdonság

A *Spirulina* antioxidáns és immunmoduláló tulajdonságaiból következtetnek daganat ellenes hatására és arra, hogy szerepet játszhat a daganatos megbetegedések megelőzésében. Eddig humán vizsgálatok nem születtek, viszont *in vitro* és *in vivo* eredmények ezt alátámasztják. 77 fős hörcsög csoporton vizsgálva a *Spirulina* hatását azt tapasztalták, hogy 1 évvel az alga használata után az állatok 45%-ánál csökkent a leukoplakia teljes regressziója (Marles et al., 2011).

Krónikus arzénmérgezésben kifejtett hatása

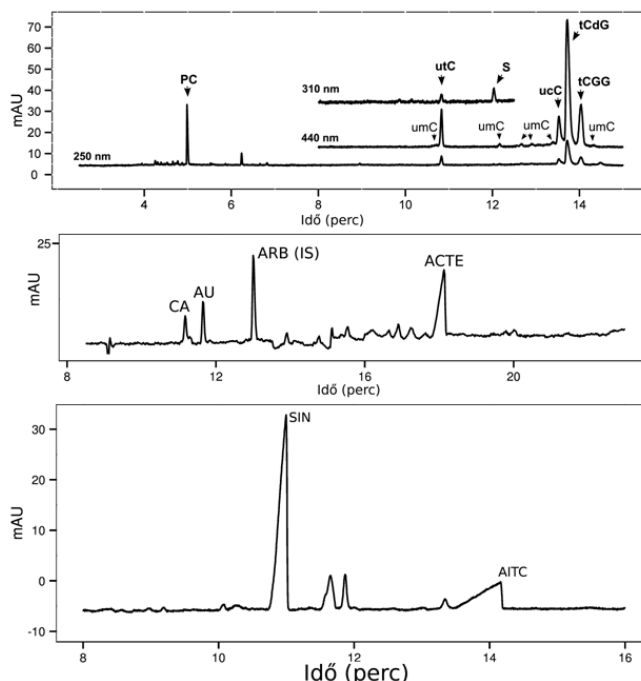
Egy placebo-kontroll, kettős vak vizsgálatot végeztek 41 krónikus arzén mérgezett betegen. 17 beteg placebót kapott, 24 pedig *Spirulina* és cink elegyét naponta kétszer 16 hétig. Összehasonlították a két csoport bőrtüneteit, a vizeletben és a hajszálban az arzén tartalmát. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a *Spirulina* hasznos a keratosisos és melanosisos bőrtünetek kezelésében (Karkos et al., 2011).

Antioxidáns aktivitás

A C-phycocianin fontos fikobiliproteinje az algának, mely rendelkezik gyökfogó és antioxidáns tulajdonsággal. Szelektív COX-2 gátló ezért gyulladás csökkentő hatása van (Marles et al., 2011). Megállapították, hogy 6 hónapon át történő 10 g napi adag fogyasztása mellett mellékhatás biztosan nem tapasztalható (Marles et al., 2011), azonban nem megfelelő minőségű táplálékkiegészítő *Spirulina* készítmények fogyasztásakor tapasztalt mellékhatások, mérgezések esetében mikrocisztin kontaminációt gyakran jelentették (Marles et al., 2011).

8.2 Metabolitok hasznosítása

A növényi hatóanyagtermelés sajátosságaira, változatosságaira számos példát lehet hozni a különböző általunk is vizsgált növények alkalmazásai kapcsán: A sáfrány (*Crocus sativus*; Gonda et al., 2012), fűszernövény illékony (szafranál), keserű (pikrokrocin) és színanyag (krocinok) komponenseinek viszonylag stabil, állandó termelése; az útifű (*Plantago lanceolata*; Gonda et al., 2013) változatos gyulladás-csökkentő iridoid (aukubin, katalpol) és feniletanoid termelése; a torma (*Armoracia rusticana*) enzimatikusan keletkező illékony antimikrobiális, jellemző organoleptikus sajátságokkal (Nguyen et al., 2013) bíró izotiocianátjai (29. ábra).



29. ábra A sáfrány (*Crocus sativus*; Gonda et al., 2012), az útifű (*Plantago lanceolata*; Gonda et al., 2013a, b) és a torma (*Armoracia rusticana*; Nguyen et al., 2013) hatóanyag analízise kapilláris elektroforézissel (PC: pikrokrocin, utC, umC, ucC, tCGG: krocinok, S: szafranál; CA: katalpol, AU: aukubin, ACTE: akteozid; SIN: szinigrin, AITC: allil-izotiocianát).

A fotoszintetizáló cianobaktériumok, eukarióta algák esetében, mint részletesen ismertettük számos mérgező metabolit, toxin termelésében is megnyilvánul anyagcseretermékeik változatossága. Ugyanakkor változatos szénhidrát, peptid, terpenoid, alkaloid és fenoloid komponensek bioszintézise révén alkalmazások sora merül fel ezen élőlénycsoportokkal kapcsolatosan (Bowles, 2007; Vasas, 2014).

A fotoszintetizáló makroszkópikus szervezetek, a virágos növények biológiailag aktív anyagcseretermékeinek kutatása, termelési körülményeik, analitikájuk, hatásmechanizmusuk részletes megismerése, alkalmazhatóságuk nagy hagyományokkal, több száz éves múlttal rendelkezik (Evans, 2009). Nem véletlen, hogy az ismert növényi eredetű gyógyszerek, mérgek több mint 90 %-a a magasabb rendű növényekből származik (Bruneton, 1995). Az általában mikroszkópikus méretű cianobaktérium- és algaszervezetek esetében elsősorban a tömeges megjelenés és azok következményei voltak azok, amelyek felhívták a figyelmet e szervezetek biológiailag aktív anyagcseretermékeire és a róluk szóló ismeretek hiányosságaira (Carmichael, 1994). Részben a tömeges megjelenés adott lehetőséget arra is, hogy a különböző biológiai és kémiai módszerekkel megkezdjék e különleges metabolitok azonosítását, megismerését. Jelenleg számos metabolitot azonosítottak cianobaktériumokból, algákból melyek hatásvizsgálatuk (preklinikai, klinikai) eredményei alapján ígéretes hatóanyagként hasznosulhatnak (Vasas et al., 2010; Vasas, 2014).

Rákellenes és citotoxikus hatás

Lyngbya majuscula-ból izolálták a curacin A-t, mely antimitotikus szer. Gátolja a mikrotubulusok összeszerelődését és a kolchicin tubulinhoz való kötődését (a kolchicin képes megállítani az osztódást a metafázisban). Két lineáris citotoxikus pentapeptidet a majusculamid D-t és a deoximajusculamid D-t is izolálták. A lingbiatoxin A felelős a faj által okozott dermatitis kialakulásáért és citotoxicitást mutat a P388 limfoid leukémiával szemben. Úgy gondolják, hogy szerepet játszhat a gyomorrák kialakulásában Hawaii-on, ahol az emberek sok algát fogyasztanak. Az egy *Nostoc* fajból származó cryptophycin-I mikrotubulus depolimerizáló hatású, ami azt jelenti, hogy a mikrotubulusok tubulin dimerekké esnek szét a metabolit hatására. A vegyület és analógiái hatásosak a tömör, szilárd tumorok esetén (Fattorusso és Tagliatela-Scafati, 2008; Gademann és Portmann, 2008; Araoz et al., 2009)

Tumor aktivitás elősegítése

A lingbiatoxin A és a debromoapliziatoxin az ornitin dekarboxiláz (ODC) aktivitását indukálja festett egér sejteken, hasonló hatásúak, mint a dihydroteleocidin B. A 13-cisz retinsav gátolja az ODC indukálását, ami a poliamin bioszintézis kulcsenzime. A poliaminok képesek kötődni a proteinekhez és a nukleinsavakhoz, a sejtosztódás S-fázisában nélkülözhetetlenek, hiányukban az osztódás leáll, a DNS szintézis csökken és a sejtek mitózisba lépése blokkolódik, mivel minimális mennyiségű poliaminra szükség van a G1 fázisból az S fázisba való átjutáshoz. Így ezekből következik, hogy ha megnő az ODC aktivitása, azáltal a poliamin mennyisége is és gyorsabb lesz a sejtosztódás, ami elősegíti a tumor képződését. A debromoapliziatoxin promieleocitás leukémia sejteket (HL-60) eredményez és gátolja a sejtek differenciálódását. A lingbiatoxin A nagy biológiai hatékonysággal bír *in vitro*, de a debromoapliziatoxin sokkal gyengébb hatású (Gademann és Portmann, 2008; Araoz et al., 2009).

Antibakteriális hatás

A *L. majuscula*-ból diklórmétánnal kivont γ -lakton malynolidnak antibiotikus hatása van a *Mycobacterium smegmatis*-szel és a *Streptococcus pyogenes*-szel szemben. A *L. majuscula* fő antimikrobiális összetevője az elemi kén és (-)-(4E, 7S)-7-metoxitetradec-4-énsav (Bhakuni és Rawat, 2005; Fattorusso és Taglialatela-Scafati, 2008).

Gombaellenes hatás

Különböző mélytengeri *L. majuscula*-ból nyert majusculamid C egy ciklikus depszipeptid, ami gátolja a növények gombaparazitáit (Fattorusso és Taglialatela-Scafati, 2008).

Immunszuppresszív aktivitás

A venezuelai *L. majuscula* mintákból nyerhető mikrocolin A és B immunszuppresszív lipoproteinek. A mikrocolin az egér vegyes limfocita- és az egér P388 leukémiára hatásos in vitro (Gademann és Portmann, 2008; Araoz et al., 2009).

A lipopeptidek jelentősége:

Antillatoxin: Az antillatoxin A-t egy trópusi cianobaktérium, a *Lyngbya majuscula* termeli. Az ichtyotoxikus vegyületek közé tartozik. Gyors neurális halált vált ki kisagyi szemcsés sejt tenyészetben. Citotoxikus hatása megelőzhető dextrorphanal és MK-801-gyel, melyek N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) antagonisták. A toxin molekuláris célpontjai a feszültség függő nátrium csatornák, melyeken aktiváló hatást fejt ki, ezért hatása felfüggeszthető tetradotoxinnal. Az antillatoxin gyors és koncentrációfüggő intracelluláris Na^+ koncentráció növekedést okoz az agykérgi neuronokban. Az intracelluláris Na^+ módosítja az NMDA receptor aktivitást.

Kalkitoxin: Tiazolin tartalmú vegyület, melyet *L. majusculából* nyernek ki. Ichtyotoxikus az aranyhalra (*Carassius auratus*) és hatással van a sós rákra is. A feszültség függő Na^+ csatornákat blokkolja.

Jamaicamide: Szintén a *L. majuscula* cianobaktériumban található és az A, B és C izomerei léteznek. Ezek az izomerek citotoxicitást mutatnak a H-460 (humán tüdő) és a neuro-2a egér neuroblasztóma sejt vonalak esetén. A Na^+ csatornákat blokkolják (Bhakuni és Rawat, 2005; Araoz et al., 2009).

8.3 Cianobakteriális alkaloidok

Az alkaloidok N-tartalmú, erős fiziológiás hatású, gyakran erősen toxikus, természetes (növényi) eredetű vegyületek. Nitrogén atomjuk (atomjaik) következtében - ritka kivételtől eltekintve - bázikus tulajdonságúak. Aminosavakból, vagy legalább részben aminosavakból épülnek fel. Az alkaloid tartalmú drogok gyógyászati felhasználása igen sokrétű, minden drog esetén más és más. Elnevezésük *Meissner* hallei gyógyszerésztől (1819) - alkálihoz hasonló - származik (Evans, 2003). Egy aminosavból igen különböző vázú alkaloidok keletkezhetnek és közel rokon fajokban ugyanabból az aminosavból keletkező, de különböző alapvázal bíró alkaloidok fordulhatnak elő. Ritkán az is megesik, hogy egy családban, sőt esetleg egy fajban két különböző aminosavból keletkezett alkaloid fordul elő. A 18.-19. században izolált növényi alkaloidok változatos kémiai, farmakológiai tulajdonságaikkal kétségtelenül nagyban

befolyásolták a biológiai aktív természetes anyagok kutatását valamint az orvostudományok fejlődését. Ahogyan bizonyos terpenoid eredetű vegyületek előfordulása (képződése) jellemző lehet egy családra, úgy az alkaloidok előfordulása, mint kémiai tulajdonság is jellemezhet egy-egy növény családot vagy más rendszertani egységet (Bruneton, 1995; Vasas et al., 2010; Vasas, 2014).

Az algákból az 1980-as évektől izoláltak elsőként alkaloidokat, később mind a mai napig számtalan alkaloid típusú komponenst izoláltak, igen változatos hatásmechanizmussal. A cianobaktériumokból izolált legjelentősebb alkaloidok szerkezetét a 30. ábrán, hatásukat a 10. táblázatban foglaltuk össze (Fattorusso és Taglialatela-Scafati, 2008).

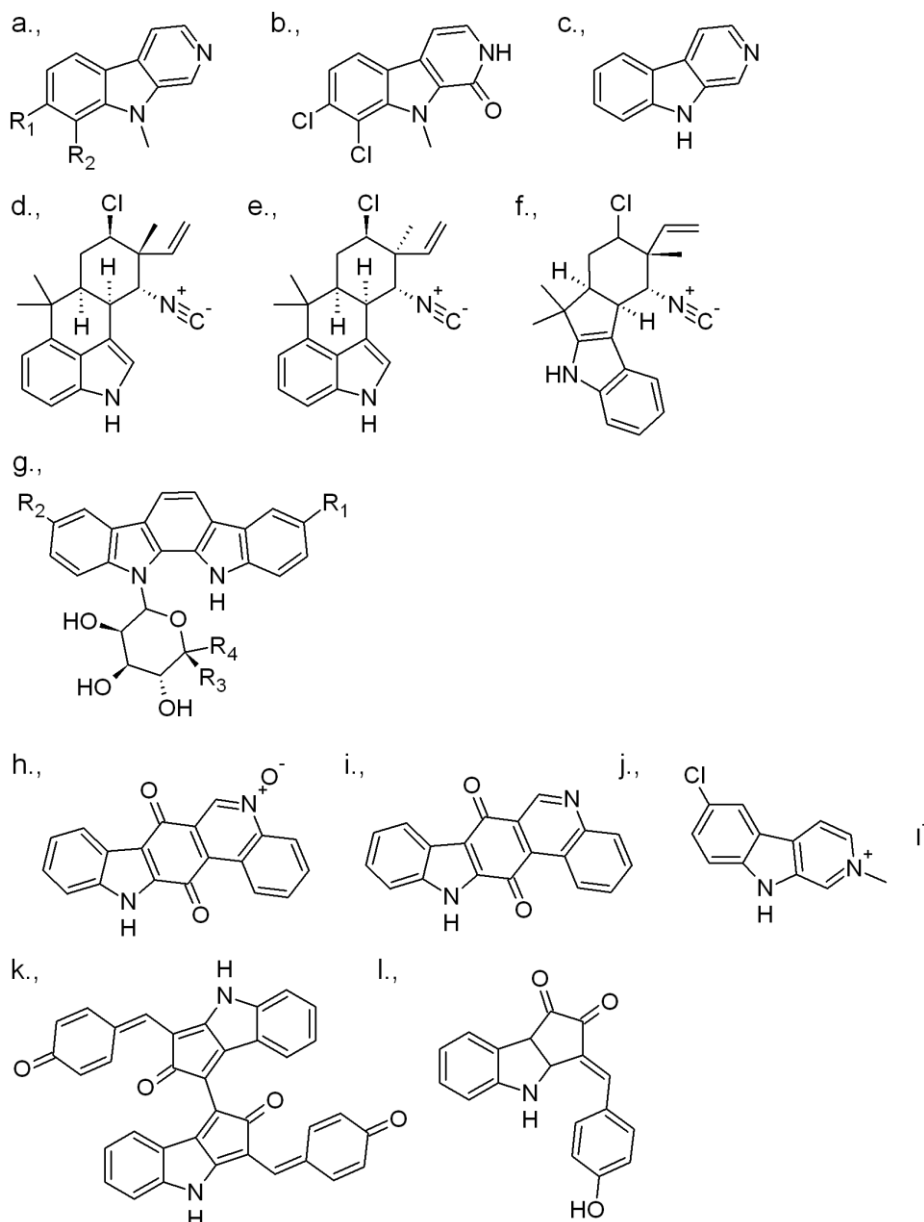
10. táblázat. Változatos hatású cianobakteriális alkaloidok (Vasas et al., 2010; Vasas, 2014).

alkaloid	Biológiai aktivitás
anatoxin-a	nikotinerg acetilkolin receptor blokkoló
anatoxin-a(s)	acetilkolin-észteráz inhibitor
szaxitoxin	feszültségfüggő nátrium-csatorna blokkoló (VGSC)
β -methyldamino-L-alanine	Parkinson és Alzheimer tünet-együttes iniciátor (ALS/PD)
cilindrospermopszin	protein-szintézis gátló
bauerinek	antivirális szer
norharmén	antimikrobiális szer
hapalindol	antifungális szer
tjipanazol	antifungal szer
kalotrixin A és B	antimaláriás szer
nostokarbolin	kolinészteráz inhibitor
szkitonemin	UV fényvédő

Az anatoxin-a az acetilkolin receptorok antagonistája és poszt-szinaptikus neuromuszkuláris blokkolóként működik. Normális esetben az acetilkolin molekulák az izomsejtekben az acetilkolin-receptorokhoz kötődnek, és a sejtek összehúzódását váltják ki, majd az acetilkolin-észteráz nevű enzim elbontja az acetilkolint, és a sejt nyugalmi állapotba kerül. Az anatoxin-a acetilkolinhoz hasonlóan kötődik az acetilkolin-receptorokhoz, kontrakciót vált ki, de az acetilkolin-észteráz nem tudja elbontani. Ily módon a sejt egy ún. „túlstimulált állapotba” kerül. Az anatoxin-a(s) az acetilkolin-észteráz enzimet gátolja és így akadályozza meg, hogy a receptorhoz kötődött acetilkolint elbontsa. A cianobaktériumokról feltételezik, hogy gazdag forrását képezik az orvosilag fontos összetevőknek, s ezzel kapcsolatban kutatásokat is folytatnak. Az anatoxin-a, mint acetilkolin-utánzó igen jó „kutatóeszköz” lehet, mivel rezisztens az acetilkolin-észteráz lebontó hatására. Ily módon a toxin és származékai segítségével az acetilkolin receptorhoz való kötődésére és a kötő receptorok aktivitásának befolyásolására kaphatnak választ a kutatók (Gademann és Portmann, 2008; Vasas et al., 2010).

A maryland-i orvostudományi egyetemen az anatoxin-a-t más aspektusból is vizsgálják. A kutatók feltételezik, hogy egy módosított változata hozzájárulhat ahhoz, hogy

késleltessék az Alzheimer-betegség okozta mentális degradációt. A szaxitoxin és a neoszaxitoxin megakadályozzák, hogy az idegsejtek az izomsejteken összehúzódást váltsanak ki. Ezt úgy érik el, hogy blokkolják a nátrium ionoknak a membránszatórnákon keresztüli beáramlását a sejtekbe. Amikor az idegsejtek ily 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).



30. ábra. Változatos hatású cianobakteriális alkaloidok (a: bauerin A: R1=Cl; R2=H, bauerine B: R1=R2=Cl, b: bauerin C, c: norharmén, d:hapalindol A, e:hapalindol L, f: fiserindol L, g: tjapanazol, h:nostokarbolin, i: kalotrixin A, j: kalotrixin B, k: szkitonemin, l: nostodion).

Az L-BMAA hidroklorid (β -methyl-amino-alanine) aminosav része a BMAA, egy fehérjealkotó aminosav, amelyet az ALS-PDC-ben vagy ehhez nagyon közel álló betegségekben elhunyt emberek agyszövetében nagy mennyiségben találtak meg. Az

érdeklődés középpontjába egyrészt azért került a dolog, mivel a rejtély megfejtése nagy áttörést jelenthet a Parkinson- és az Alzheimer-kór megértésében, másrészt mivel egyéb területeken, például Kanadában, Alzheimer-kórban meghalt emberek agyszövetéből is izolálták a BMAA-t, ami arra utal, hogy nem egyedi elszigetelt jelenségről van szó (Araoz et al., 2009; Vasas et al., 2010).

Az aminosavat szinte mindenhol megtalálható cianobaktérium fajok termelik, a guami esetében ez a *Nostoc*. Önmagában jelentéktelen ($0,3\mu\text{g/g}$) a termelt BMAA mennyisége, de szimbiózisban élve ez nagyságrendekkel nőhet ($2\text{--}37\mu\text{g/g}$). A cikász növény maghéjában ez a koncentráció elérheti a $1000\mu\text{g/g}$ -ot, míg az ezt fogyasztó denevérekben ennek több mint háromszorosa is felhalmozódhat (Vasas, 2011).

A szkitonemin egy már régen megfigyelt, de csak néhány évtizede tisztázott szerkezetű alkaloid, ami az UV-A tartomány elnyelésével komoly védelmet biztosít egyes cianobaktériumok számára az erős sugárzástól. Részben ezen hatása, illetve igazolt gyulladáscsökkentőként aktivitása miatt tesztelés alatt álló napvédőkrémek alkotójaként is ismerhető. A cianobakteriális indol alkaloidok között számos antimikrobiális hatású anyagot találunk (10. táblázat) (Fattorusso és Tagliatela-Scafati, 2008; Bhakuni és Rawat, 2005; Gademann és Portmann, 2008; Araoz et al., 2009; Vasas et al., 2010). A ciklikus peptid szerkezetű szkitonemin A erős kalcium agonista hatással rendelkezik. A humán T sejtes leukémiás sejtekben gátolta a sejtprolifерációt. A szkitoneminre jellemző, hogy gátolja a sejtciklusban szerepet játszó kinázok működését, antiproliferatív tulajdonsága is van (Fattorusso és Tagliatela-Scafati, 2008; Vasas et al., 2010).

A szaxitoxin az egyik legmérgezőbb vegyület, melyet a dinoflagellaták és egyes cianobaktériumok termelnek. Amint a tengeri toxinok kapcsán részletesen kifejtettük, kagylókra jellemző, hogy felhalmozzák a szervezetükben a szaxitoxint, mely emberbe kerülve bénulósos kagylómérgezést okoz. A szaxitoxin szelektív nátrium csatorna blokkolóként működik, az idegsejtek feszültség függő nátrium csatornáin hat és ezáltal megakadályozza a normális sejtfunkciót, mert nem keletkezik megfelelő akciós potenciál, ami neuromuszkuláris bénuláshoz és légzés leállásos halálhoz vezet. Több olyan helyi érzéstelenítő gyógyszer fejlesztés alatt áll, amelynek összetevői közt szaxitoxin analógot találunk (Gademann és Portmann, 2008; Araoz et al., 2009; Vasas et al., 2010; Vasas, 2014).

9. 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.

Az édesvízi vízvirágzásokat elsősorban a cianobaktériumok idézik elő, míg az eukarióta algák okozta mérgezések főként tengeri fajokhoz köthetők, amelyek tömeges elszaporodása közegészségügyi, gazdasági és természetvédelmi problémát okoz (Bácsi et al., 2009). Kontinentális vizekből is vannak ilyen jellegű ismereteink, bár jóval kisebb számban. Ilyen szervezetek közé tartozik a *Prymnesium parvum*, amely főként édes- és brakkvizekben idéz elő tömeges megjelenésével vízvirágzást és a mérgező anyagcsere termékei által hatalmas halpusztulásokat okozott a világ több országában. Munkánkban áttekintettük a faj felszíkes élőhelyeken történő megjelenését és az általa okozott mérgezéses eseteket. A faj által előidézett tömegprodukciókból 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). Tekintve, hogy a *P. parvum* proteázok az extracelluláris frakcióból is kimutathatók, azaz a proteázok a toxinokhoz hasonlóan kikerülnek a sejtekből, és jelentős koncentrációt érhetnek el a víztérben, valamint hogy működésük pH optimuma egybeesik a vízvirágzások mintáinak pH értékeivel, valószínűsíthető, hogy működésükkel hozzájárulnak a *P. parvum* okozta sokrétű mérgezési tünetek kialakításához. A proteolitikus hatású komponensek, feltételezhetően fontos szerepet játszhatnak a faj mixotróf anyagcseréjében is. A haptofita *P. parvum* esetében is bizonyítást nyert a sejtfelületen L-aminosav-oxidázok működése, amelyek aminosavakat és primer aminokat oxidálnak, a keletkező NH_4^+ ionok pedig már felvehetőek számukra. A fehérje/polipeptid lebontó képesség aminosavakká, a makroméretű szerves anyagok (áldozatok) kisebb méretű, bekebelezhető partikulumokká alakításának képessége óriási kompetíciós előnyt jelenthet a planktonikus fagocitózisra képes szervezetek számára. Ezek alapján lehetséges, hogy a hiányzó láncszem a felvehető ammónium ionokká átalakuló szabad aminosavak és a kötött formában előforduló aminosavak/áldozatokat alkotó fehérjék között az általunk nagy számban kimutatott proteáz enzim(ek) működése (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 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 munkánk során alkalmazott kapilláris elektroforézis két technikája a “kapilláris zónaelektroforézis”, valamint a “micelláris elektrokinetikus kromatográfia” pH, ionerő és SDS tartalom optimálás után alkalmasnak mutatkozott több mikrocisztin variáns elválasztására és a további fejlesztéseinknek köszönhetően a változatos

karakterű anatoxin-a, cilindropermopszin és mikrocisztin-LR elválasztására, rutin analízisére is (Vasas et al., 2004). Elsőként dolgoztunk ki olyan elektroforetikus környezetanalitikai módszert, aminek segítségével komplex biológiai és környezeti mátrixokból, vízvirágzásmintákból a cianobakteriális toxinok szimultán módon vizsgálhatók (Vasas et al., 2004).

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 cilindropermopszin tartalom csökkenéséhez vezet az *A. ovalisporum* sejtekben (Bácsi et al., 2006; 2007; Vasas et al., 2013). Ha a toxintartalmat száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg, legnagyobb mértékben a kénéheztetett tenyészetben csökkent 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 csökkent 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 (Bácsi et al., 2006; 2007; Vasas et al., 2013). 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. Ez a csökkenés nem csupán a növekedési rátában beállt változások eredménye, hanem az egyes sejtekben csökken a cilindropermopszin mennyisége. A száraz tömeg, illetve a sejtszám alapján mutatkozó különbség a toxintartalom csökkenésében a kénéhezés esetén az éhező sejtek metabolizmusának átalakulása adhat magyarázatot. Azt mondhatjuk tehát, hogy az *A.*

ovalisporum fonalas cianobaktérium esetén a szulfát, foszfát, illetve nitrát (nitrogén) metabolizmus a növekedési ráta és az elsődleges anyagcserefolyamatok, valamint a sejtosztódás szabályozásán túl mélyebb összefüggésben van a törzs cilindrospERMopszin termelésével is (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). A fő célunk a szervezet toxintermelésének jellemzése volt, hiszen az elsősorban alpesi országok tavaiban előforduló *P. rubescens* az erősen toxikus szervezetek közé sorolják. 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. Az elvégzett vizsgálatok eredménye alapján elmondható hogy a szervezet

kivonata a Magyarországon legtoxikusabbnak számító *Microcystis* populációk toxicitásával vetekszik, tömeges megjelenésükkor toxintermeléssel számolhatunk. Bár hazánkra nem jellemző a tartósan rétegzett alpesi jellegű tavak jelenléte, egyes magyarországi kavicsbányatavak hidrológiai viszonyai kedvező feltételeket teremthetnek az említett fajnak. A vizsgált kavicsbánya tó legnagyobb mélysége csupán 7 m, viszont a tó vízszintjét 3-4 méteres meredek part veszi körül, védve ezzel többek között a szél zavarásától, a felkavarodástól. Ez lehetővé teszi a tartós rétegződést és a stabil metalimnion kialakulását, ami kedvez a *P. rubescens* elszaporodásának (Vasas et al., 2013). A vízben mért alacsony foszfor és magas nitrogéntartalom, ahogyan több alpesi víztérben is megfigyelték, szintén kedvező feltételeket teremt a faj megjelenésének. Az algavirágzás mintából meghatározott MC tartalom kifejezetten magasnak számít nem csupán a *Planktothrix* genusz által okozott tömeges megjelenésre nézve, hanem más fajokkal összevetve is a legnagyobb MC tartalmat mutattuk ki régiókban, amely érték nemzetközi viszonylatban is jelentős. Szerkezetvizsgáló módszerekkel pontosan azonosítottuk a MC variánst, ami a genuszra jellemző demetilált MC-RR forma a [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR volt. A *P. rubescens* virágzásból izoláltunk egy laboratóriumban fenntartható törzset (BGSD-500), aminek folyamatosnak mondható toxintermelésének mértéke különbözött az algavirágzásban mért MC mennyiségi viszonyaitól. Érdekes módon ugyanazt a [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR variánst termelte, viszont analíziseink alapján csupán ötödannyi mennyiségben, mint a természetes cianobaktérium tömeg esetében volt mérhető (8.57 mg/g az algavirágzásban és 1.85 mg/g az izolált törzsben; 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. Elterjedése és tömeges megjelenései Európa országaiban is gondot okozott. Toxintermelése kifejezetten változatos és a tömeges megjelenésre hajlamos cianobaktériumokon belül is unikálisnak tekinthető. Az ausztráliai, egyes ázsiai és egyes afrikai populációk esetében cilindrospermopszin termelést azonosítottak, míg a dél-amerikai populációk esetében szaxitoxint és annak analógjait detektálták egyes előfordulásai kapcsán. 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). Az ismert CYN termelő törzsekről egyértelműen bizonyítottuk a toxin jelenlétét és egy spanyolországi *A. ovalisporum* kapcsán is bizonyítottá vált a cilindrospermopszin termelése (Vasas et al., 2010). A magyarországi vizek *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumának cilindrospermopszin analízise természetesen nem általánosítható a magyarországi vizekben jelenlévő *C. raciborskii* törzsekre, nem zárható ki cilindrospermopszin termelő törzsek jelenléte Magyarországon, de a vizsgálatok eredményei azt valószínűsítik, hogy a nálunk előforduló, tömegprodukción mutató *Cylindrospermopsis raciborskii* nem termel cilindrospermopszint (Vasas et al., 2010).

A *C. raciborskii* változatos toxintermelő képességét egy 10⁶/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. A faj már említett mozaikos toxintermelési képessége miatt mikrocisztin variánsokra, cilindropermopszinra, anatoxin-a végeztünk a már részletesen ismertetett körülmények között vizsgálatokat. Az ismert toxinok jelenlétét nem tudtuk igazolni és a dél-amerikai törzsekre jellemző szaxitoxin (Na^+ csatorna-blokkoló) analógok jelenlétét is kizárhattuk specifikus elektrofiziológiai tesztek segítségével (akciós potenciálok amplitudójának csökkenése, alakjának torzulása az algakivonat jelenlétében). Ugyanakkor 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 acetilkolinreceptora (nAChR) volt. Az anatoxin-termelő *Oscillatoria phormosa* PCC 6506 hasonlóképpen előállított kivonata ugyanezekben a sejteken ugyancsak nikotinerger blokkolónak bizonyult, míg a CYN termelő AQS (20 mg/ml-ig tesztelve) nem váltott ki reprodukálható vagy dóziszfüggő nAChR gátlást (Vehovszky et al., 2014). Eredményeink alapján a szervezet anatoxin hatású komponens(ek)e)t tartalmaz, melyek neurotoxikus terepi következményekért felelősek lehetnek. Méréseink a cilindropermopszin termelést kizárják a faj hazai megjelenései kapcsán és egy másik potenciálisan CYN termelő szervezet, az *A. ovalisporum* esetében sem igazoltuk azt a hazai megjelenései kapcsán. 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).

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). Számos példát ismerünk arra, hogy ezeket a komponenseket a farmakológia vagy a biológiai és a gyógyszer tudományokat érintő gyakorlat hasznosítja (Vasas, 2011; Gonda et al., 2013). 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).

Az elmúlt évtizedekben a világ számos pontján mind gyakoribbá váló mérgező algavirágzások és a velejáró mérgező 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.

10. Anyag és Módszer

10.1. A cianobaktérium és alga törzsek

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

10.2. 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).

10.3. 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) küvetába gyűjtöttük, míg a víz felszínén felgyülemlett sejtömegből 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). A sejtizolálást hígítási módszerrel nitrogénmentes, nitrogéntartalmú Allen valamint BG-11-es tápoldatokat tartalmazó folyadék- és agarral (1,5%) szilárdított táptalajon végeztük a monocianobakteriális kultúrák létrehozásáig.

A törzsek fenntartását, tenyésztését fényen (max. 35-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), rázatott illetve levegővel buborékolgatott tenyészetek segítségével végeztük 28 °C-on. A rázatott tenyészeteket 100-300 ml-es Erlenmayer lombikokban, a levegővel buborékolgatottakat 1-10 literes lombikokban neveltük, melyeket sterilre szűrt levegővel buborékolgattunk, megoldva így a tenyészetek keverését is. A rázatást Brunswick típusú rázógépen (100-120 rpm) folytattuk.

A sejtek növekedésének nyomon követésére a tenyészetekből szárazanyag, klorofill-a valamint összes fehérje tartalmat mértünk. A klorofill meghatározása során a 663 nm-en 80%-

os acetonban mért fényabszorpció alapján számítottuk a pigmenttartalmat (Bendall et al 1988).

10.4. A heterociszták izolálása

A heterociszták izolálásához a Smith és munkatársai által kidolgozott módszert alkalmaztuk, kis módosításokkal (Bryant,1993). A módszer lényege, hogy a centrifugálással töményített sejt (fonal) szuszpenziót lizozimos emésztésnek vetjük alá. A lizozim a sejtfalat roncsolja, a heterociszták speciális burka azonban hosszabb ideig ellenáll a roncsolásnak, mint a vegetatív sejtek „hagyományos” Gram-negatív sejtfala. A széteső fonalak illetve vegetatív sejtek közül a más ülepedési sajátságokkal bíró heterociszták differenciál-centrifugálással elválaszthatók.

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 (8500 rpm, 10 perc Beckman Avanti J-25), majd a sejteket 60 mM pH=7,5 Tris-HCl, 50 mM mannitol, 1 mM EDTA és 1,0 mg ml⁻¹ lizozim tartalmú szuszpenziós közegben vettük fel. A szuszpenziót 2 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőn tartottuk, majd desztillált vízzel a kiindulási térfogat tízszeresére hígítottuk. A lizozimmal való emésztés, majd a hígítás okozta ozmotikus sokk következtében a vegetatív sejtek elroncsolódtak. A heterocisztákat differenciál-centrifugálással választottuk el a sejttörmeléktől. A centrifugálást Janetzki K23 típusú, kilengőfejes centrifugával végeztük (3000-1500 rpm, minden fordulatszámon 5 perc). Minden centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót, és a heterociszták állapotát mikroszkóppal (JENAVAL) ellenőriztük. A következő centrifugálás előtt a csapadékot lizozim-mentes szuszpenziós közegben vettük fel. A centrifugálás után a sejttömeget UG-160 típusú szonikátorral háromszor 15 s időtartamban szonikáltuk. A szonikált sejttömeget szuszpenziós közegben mostuk, majd centrifugáltuk (8500 rpm, 10 perc Beckman Avanti J-25). A csapadékot – ép heterociszták tömegét – 5 mM pH=7,5 Tris-HCl pufferben vettük fel (a heterociszták épségét elsősorban a poláris testek megfelelő helyzete alapján állapítottuk meg). A heterociszták feltárása többszöri fagyasztás-olvasztással, illetve szükség esetén szonikálással történt. A feltárás, majd centrifugálás után nyert felülúszót alkalmaztuk a tisztított heterociszták enzimológiai (Western-blot) és toxikológiai (CE) vizsgálatához (Vasas et al., 2013).

10.5. 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 szétválasztott fehérjék transzferálásához blottolási eljárást alkalmaztunk. Az elektroblot során a gélen szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Schleicher &

Schuell Protron BA85 cellulóz nitrát, 0,45 μm) vittük át. Az eljárás alatt a gél és a membrán is 190 mM glicint és 20% metanolt tartalmazó 25 mM-os Tris-HCl pufferbe merül, pH = 8,3 (tank blotting). A gélen szétválasztott fehérjék membránra transzferálása 3 órán át, 300 mA áramerősséggel, Hoefer típusú blottoló készülékben zajlott.

A nitrogenáz enzimkomplex specifikus kimutatásához immunológiai módszert alkalmaztunk. A blottolási eljárást a nitrocellulóz membrán aspecifikus kötőhelyeinek telítése követte (blokkolás). A blokkoló oldat 2% BSA és 0,1 Tween 20 tartalmú egyszeres PBS, az inkubálási idő 1 óra. A nem specifikus kötőhelyek telítése után az elsődleges ellenanyaggal (AgriSera anti-nitrogenáz NifH) való kezelés következett. Az ellenanyagot háromezerszeres hígításban alkalmaztuk (a hígítást a blokkolóoldattal végeztük), a membránt 7 órán át inkubáltuk. 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 szubsztrátoldatot 0,05 mM MgCl_2 tartalmú 0,1 M-os Tris-HCl pufferben (pH=9,5) vettük fel. A szubsztrát oldattal való reakció eredményeként színes (ibolyásvörös) folt jelent meg a nitrocellulóz membránon ott, ahol az ellenanyagok az antigénhez kötődtek (Vasas et al., 2013).

10.6. A minták előkészítése a toxinteszthez

A felnevelt tenyészeteket késői exponenciális fázisban centrifugáltuk (Beckman Avanti J-25 12 000 $\times$ 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 IC_{50} valamint az LD_{50} értékeket szárazanyagtartalom/térfogat (mg/ml, $\mu\text{g}/\text{ml}$) értékben adtuk meg. A minták toxicitásának méréséhez, a mikrocisztin kimutatására és toxikológiai tesztelésére kidolgozott csíranövénytesztet, valamint továbbfejlesztett változatát használtuk (Vasas et al., 2002).

10.7. A toxintesztek

Az algák, cianobaktériumok toxicitásának méréséhez a Kós és munkatársai által, mikrocisztin kimutatására és toxikológiai tesztelésére kidolgozott csíranövénytesztet használtuk (Blue-Green Sinapis Test). A vizsgálati tesztnövény a fehér mustár (*Sinapis alba* L.). A toxicitási tesztekben H_2O_2 -dal sterilizált magvakat alkalmaztunk steril körülmények között. A minták nagy számára való tekintettel módosított csíranövénytesztet dolgoztuk ki, amelyet mikrotiter-lemezen hajtottuk végre. Az egyes kamrákba 100 μl agarral (1%) szilárdított tápoldat ($0.5 \times$ Allen) felületére, mely a friss mintát tartalmazza, helyeztük a steril, előcsíráztatott mustármagokat. A növényeket 25°C -os termosztátban sötétben, három-négy napig neveltük. A növények teljes hosszát, a gyökérzet és a hypocotyl hosszát mértük mm-ben (Vasas et al., 2002). A *Prymnesium parvum* minták toxicitását hal- és daphnia-tesztekkel

vizsgáltuk, melyeket nemzetközi szabványok szerint végeztünk (Standard Methods for the Examination of Water and Waste water, 1960).

10.8. 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, frakciónedő (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 Supelcosil™ SPLC-18 (25 x 10 mm, 5 µm), az eluens MeOH/H₂O 3 ml/perc. Az elválasztást gradiens elúcióval (1% MeOH-ról 5%-ra 10 perc alatt, majd 25 perc alatt 30 %-ra) végeztük. Az elváló csúcsok toxicitását a fent említett mustár csíranövényteszt segítségével követtük nyomon, úgy, hogy a frakciókból vett ismert térfogatú mennyiségeket teszteltük a mikrotiter lemez kamráiban (Vasas et al., 2006).

10.9. 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 polimimiddel borított szilika kapillárisban történtek (Supelco; 48.5 cm × 50 µm, tényleges hossz: 40 cm). Az injektálás hidrodinamikus mintabevitelrel 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 electrolit 25 mM nátrium tetraborátot (pH 9.1) és 100 mM SDS-t tartalmazott. Az electrolit és az analizált mintáinkat, Millipore Ultrafree Polysulfone membránnal (UFP1 THK24) szűrtük és 10 percig ultrahangos kezeléssel gázmentesítettük (Vasas et al., 2004; 2006).

10.10. NMR analízis

Az ¹H ¹³C NMR-vizsgálatokat Bruker DRX-500 berendezéssel 500.13/125.79 MHz-en végeztük. 1D ¹H-NMR spektrum felvétele deuterált vízben (D₂O), 298K hőmérsékleten történt Shigemi küvettában (250 µl). A kétdimenziós HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) spektrum identikus ¹H/¹³C eredményét irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze (Vasas et al, 2013).

10.11. 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

dc_819_13

történt. A műszer kalibrálását malto-oligoszacharid $[M+Na]^+$ 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 μ l matrix oldatot 0,5 μ l 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 $[M+H]^+$ csúcs (Vasas et al., 2006; 2013; 2009; 2014)

10.12. Toxin-gének detektálása - PCR analízisek

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

11. táblázat. A *Microcystis* sp. specifikus (*mcyA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *G*), és a *Planktothrix* sp. specifikus (*mcyA*, *HA*, *CJ*, *B*, *EG*, *E*, *T*, *TD*) mikrocisztin terelésért felelős gének primerjei (Mbedi et al., 2005; Mikalsen et al., 2003; Ouahid et al., 2005).

Gének	Primerpár	Szekvencia 5'→3'	Annealing hőmérséklet (°C)	Méret (bp)
<i>mcyA</i>	MSF MSR	ATCCAGCAGTTGAGCAAGC TGCAGATAAATCCGCAGTTG	47	1300
<i>mcyB</i>	2156-F 3111- R	ATCACTTCAATCTAACGACT AGTTGCTGCTGTAAGAAA	52	955
<i>mcyC</i>	PSCF1 PSCR1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG CCGACAACATCACAAAGGC	52	674
<i>mcyD1</i>	PKDF1 PKDR1	GACGCTCAAATGATGAAAC GCAACCGATAAAACTCCC	52	647
<i>mcyD2</i>	PKDF2 PKDR2	AGTTATTCTCCTCAAGCC CATTCGTTCCACTAAATCC	52	859
<i>mcyE</i>	PKEF1 PKER1	CGCAAACCCGATTTACAG CCCCTACCATCTTCATCTTC	52	755
<i>mcyG</i>	PKGF1 PKGR1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC AATCGCTAAAAACGCCACC	52	425
<i>mcyA</i>	<i>mcyA</i> .fw <i>mcyA</i> .rev	ATGTCACCTATTGGGCTTGC TCGATTCCCCTAAGTGATGC	57	839
<i>mcyHA</i>	<i>mcyHA</i> .fw <i>mcyHA</i> .rev	TTAGATGAAGCCACCAGTGC GATTAAAAATTGAATAGCTGCTAGG	57	540
<i>mcyCJ</i>	<i>mcyCJ</i> .fw <i>mcyCJ</i> .rev	TTGGATACAAGCGACAAAAGG TCTCCAGCTTGAAGTTCTGC	57	524
<i>mcyB</i>	<i>mcyB</i> .fw <i>mcyB</i> .rev	ATTACAGCAGAGAAAATCCAAGCA TCGCAATAGCGGGATCA	59	555
<i>mcyEG</i>	<i>mcyEG</i> .fw <i>mcyEG</i> .rev	GAATTCATTTTGTGAGGAAGG AGAAAACAAGCCCAGAGTGC	59	775 (642)
<i>mcyE</i>	<i>mcyE</i> .fw <i>mcyE</i> .rev	TTACCTAATTATCCCTTTCAAAG CAATGGGTAAGGTTTGCTT	48	589
<i>mcyT</i>	<i>mcyT</i> .fw <i>mcyT</i> .rev	CCCAATCTAACCCCAACTGC CAATAGCGATTTTCCCAAGC	55	747
<i>mcyTD</i>	<i>mcyTD</i> .fw <i>mcyTD</i> .rev	ATCCGCCCATACTGTGACC GATTTTGCCCGGTTTACTCC	59	763 (1300)

A cilindrospormopszin termeléséért felelős gének (PKS/PS) detektálásához a PKS-M4 (5'-GAAG CTCTGGAAT CCGGTAA -3') és PKS-M5 (5-AAT CCTTA CGGGAT CCGGTGC-3) valamint a PS M13 (5'-GAAG CTCTGGAAT CCGGTAA -3') és PS M14 (5-AAT CCTTA CGGGAT CCGGTG C-3) primer-párokat használtuk (Valerio et al., 2005).

A *Planktothrix rubescens* teljes génklaszterének tanulmányozásához a *mcy* klasztert teljes egészében átfedő, 2 kb méretű 28 primer párt alkalmaztunk. A deléciós 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).

10.13. A proteáz enzimaktivitások kimutatása poliakrilamid aktivitásgéleken

A proteáz enzimek kimutatásának jól bevált, általános módszere a Laemmli-féle gélrendszer 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 aktivitásgéleken 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.

A proteáz enzimek aktivitásának vizsgálata során szubsztrátként (0,04% tömeg/térfogat) zselatint tartalmazó 10%-os módosított Laemmli-féle poliakrilamid-gélrendszert (Laemmli, 1970) alkalmaztunk (Schlereth et al., 2000). A zselatin a legáltalánosabban alkalmazott szubsztrát, mert a szerin-, cisztein-, metallo-, aszpartát proteázok is képesek hasítani. A mintahelyekre egyenlő fehérjetartalmú mintamennyiségeket vittünk fel, a mintákat nem forraltuk. A proteáz géleket megfelelő mosási lépések után a bázikus proteázok kimutatásához pH 8,0-as 100 mM Tris-HCl pufferben (Sigma-Aldrich), savas proteázok kimutatásához pH 5,0-ös nátrium-foszfát pufferben (Reanal, Budapest) 5 mM ME jelenlétében, sötétben, 37 °C-on, 6 órán át inkubáltuk. A géleken az enzimaktivitással rendelkező fehérjék sávjait ún. negatív festéssel tettük láthatóvá Coomassie Brilliant Blue R250 oldatot (Schlereth et al., 2000) alkalmazva. A proteázok karakterizálásához különböző proteáz inhibitorokat, illetve fémionokat adagoltunk az inkubáló pufferekbe [EDTA, PMSF, Zn^{2+} (ZnCl_2 formájában) és Ca^{2+} (CaCl_2 formájában)] (Jámbrik et al., 2011; Vasas et al., 2012).

10.14. A poliakrilamid gélek értékelése

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 ábrázoltuk (Vasas et al., 2012).

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Borbély Györgynek szakmai iránymutatásaiért, baráti jótanácsaiért.

Köszönöm a Növényteni Tanszék minden dolgozójának, hogy munkámat jó légkörben, barátok közt végezhettem. Külön köszönet Dr. Mikóné Hamvas Mártának, Dr. Máthé Csabának és Dr. Surányi Gyulának segítségükért.

Köszönöm végzett PhD hallgatóim, Dr. Bácsi István és Dr. Gonda Sándor inspiráló munkáját, köszönöm, hogy mind a mai napig számos, tudományos kihívást jelentő munkában közösen vehetünk részt.

Köszönet az NMR mérésekért Dr. Batta Gyulának, a MALDI-TOF mérésekért Dr. Gyémánt Gyöngyinek.

Köszönöm Dr. Gáspár Atillának, hogy közös erővel alapított egyetemi cégünk a CETOX Kft. segítségével tudományos munkáink, eredményeink a mindennapi életben hasznosulhatnak.

Hogy idáig eljutottam, köszönöm szüleimnek, feleségemnek, Ágotának és gyermekeimnek, Ádámnak és Jázminnak.

12. 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.**, Borbely, 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 Közlemény 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-prefering 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., Jámbrík, 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

Jámbrík, 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., Bátor, 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

Gácsai, 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., Borbely, 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 cylindrospermopsin termelés analitikai vizsgálata *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumokban *Hidrológiai Közöny* 82, 143-144.

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

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

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

Hivatkozott irodalom

Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C.O., Dahl, E., Briggs, L.R., Aune, T. 2005. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): Uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*. 45, 265–272.

Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A. 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: Implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.* 133, 651–658.

Ade, P., Funari, E., Poletti, R. 2003. Risk to human health associated with marine toxic algae. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 39, 53–68.

Agrawal, A., Gopal, K. Toxic Cyanobacteria in Water and Their Public Health Consequences. In Agrawal, A., Gopal, K., Eds., *Biomonitoring of Water and Waste Water*, Springer, India, 2013.

Albertus, J.S. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* 16, 245–262.

- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S. 2011. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs*. 9, 2106–2130.
- Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T.D., Ferrari, B.C., Neilan, B.A. 2011a. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ. Microbiol.* 13, 1064–1077.
- Alexova, R., Haynes, P.A., Ferrari, B.C., Neilan, B.A. 2011b. Comparative protein expression in different strains of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Mol. Cell. Proteomics*. 10, M110.003749.
- Allen, M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4, 1–4.
- Allen, M.M., Hutchinson, I., Weathers, P.J. 1980. Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J. Bacteriol.* 141, 687–693.
- Almeida, V.P.S, Cogo, K., Tsai, S.M., Moon, D.H. 2006. Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37, 192–198.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Savar, V. 2008. First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish. *Toxicon*. 52, 39–48.
- Anagnostidis, K., Komarek, J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. I–V. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 43, 157–2260; 56, 247–345; 59, 1–73; 71, 291–302; 80, 327–472.
- Anagnostidis, K., Komárek, J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 – Oscillatoriales. *Algol. Stud.* 50–53, 327–472.
- Anderson, D.M., Hoagland, P., Kaoru, Y., White, A.W. Estimated annual economic impacts from harmful algal blooms (HABs) in the United States, technical report WHOI-2000-11. Woods Hole: Woods Hole Oceanographic Institution; 2000.
- Annala, A., Lehtimäki, J., Mattila, K., Eriksson, J.E., Sivonen, K., Rantala, T.T., Drakenberg, T. 1996. Solution structure of nodularin: an inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 27, 16695–16702.
- Aráoz, R., Molgó, J., de Marsac, N.T. 2009. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*. 56, 813–28.
- Araoz, R., Nghiem, H.O., Rippka, R., Palibroda, N., de Marsac, N.T., Herdman, M. 2005. Neurotoxins in axenic Oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology*. 151, 1263–1273.
- Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M., 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.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicology*. 181, 441–446.

- Babica, P., Bláha, L., Maršálek, B. 2006. Exploring the natural role of Microcystins—A review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 42, 9–20.
- Bagotsky, S.V. 1991. Mathematical model describing auto-oscillation in concentrations of toxins secreted by algae. *Biofizika.* 36, 117–121.
- Bales, M., Moss, B., Phillips, G., Irvine, K., Stansfield, J. 1993. The changing ecosystem of a shallow, brackish lake, Hickling Broad, Norfolk, U. K. II. Long-term trends in water chemistry and ecology and their implications for restoration of the lake. *Freshw. Biol.* 29, 141–165.
- Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K., Krienitz, L. 2003. Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya. *Limnologia.* 33, 2–9.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.* 33, 613–616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., Carmeli, S. 2000. 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J. Nat. Prod.* 63, 387–389.
- Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-Mozzini, Y., Kaplan, A. 2010. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Curr. Biol.* 20, 1557–1561.
- Bateman, K.P., Thibault, P., Douglas, D.J., White, R.L. 1995. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *J. Chromatogr. A.* 712, 253–268.
- Baumann H.I., Jüttner, F. 2008. Inter-annual stability of oligopeptide patterns of *Planktothrix rubescens* blooms and mass mortality of *Daphnia* in Lake Hallwilersee. *Limnologia.* 38, 350–359.
- Becker, W. Microalgae in human and animal nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture*; Richmond, A., Ed., Blackwell, Oxford, UK, 2004.
- Bee, A., Theakston, R.D.G., Harrison, R.A., Carter, S.D. 2001. Novel in vitro assays for assessing the haemorrhagic activity of snake venoms and for demonstration of venom metalloproteinase inhibitors. *Toxicon.* 39, 1429–1434.
- 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.
- Bendall, D.S., Bowes, J.M., Stewart, A.Q.C., Taylor, M.E. Oxygen-evolving Photosystem II particles from *Phormidium laminosum*. In *Methods in Enzimology* Vol. 167 Cyanobacteria; Packer, L., Glazer, A.N., Eds., Academic Press, London, 1988.
- Berdalet, E., 1992. Effects of turbulence on the marine Dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. *J. Phycol.* 28, 267–272.

- Bergmann, F., Parnas, I., Reich, K. 1963. Observations on the mechanism of action and on the quantitative assay of ichthyotoxin from *Prymnesium parvum* Carter. Toxicol. Appl. Pharmacol. 5, 637–649.
- Berman, T. 1997. Dissolved organic nitrogen utilization by an *Aphanizomenon* bloom in Lake Kinneret. J. Plankton. Res. 19, 577–586.
- Berman, T. 2001. The role of DON and the effect of N:P ratios on occurrence of cyanobacterial blooms: Implications from the outgrowth of *Aphanizomenon* in Lake Kinneret. Limnol. Oceanogr 46, 443–447.
- Berry, J.P., Gantar, M., Perez, M.H., Berry, G., Noriega, F.G. 2008. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. Mar. Drugs. 6, 117–146.
- Bhakuni, D.S., Rawat, D.S. Bioactive Marine Natural Products. Anamaya Publishers, New Delhi, India, 2005.
- Bialojan, C., Takai, A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Biochem. J. 256, 283–290.
- Bláhová, L., Oravec, M., Marsálek, B., Sejnohová, L., Simek, Z., Bláha, L. 2009. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. Toxicon. 53, 519–524.
- Borbély, Gy., Máthé, Cs., M-Hamvas M., Kós, P. 1997. A növények és a cianotoxinok interakciója. Hidrológiai közlöny. 77, 24-28.
- Bordalo, A.A., Vieira, M.E.C., 2005. Spatial variability of phytoplankton, bacteria and viruses in the mesotidal salt wedge Douro Estuary (Portugal). Estuar. Coast Shelf. Sci. 63, 143–154.
- Borner, T., Dittman, E. Molecular Biology of Cyanobacterial Toxins Genetic Basis of Microcystin Production. In Harmful Cyanobacteria; Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P., Eds., Aquatic Ecology Series, Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005; Volume 3, 25–40.
- 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.
- Bowles, D. Micro- and macro-algae: utility for industrial application. Outputs from the EPOBIO project. CNAP, University of York, CPL Press, Newbury, UK, 2007.
- Bownik, 2010. A. Harmful algae: Effects of alkaloid cyanotoxins on animal and human health. Toxin Rev. 29, 99–114.
- Branco, C. W. C., Senna, P. A. C. 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasilia, Brazil. Algological Studies 75, 85–96.
- Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Intercept Ltd, Andover, UK, 1995.
- Bryant, D.A. The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.

- Burgoyne, D.L., Hemscheidt, T.K., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. 2000. Biosynthesis of cylindrospermopsin. *J. Org. Chem.* 65, 152–156.
- Buskey, E.J. 2008. How does eutrophication affect the role of grazers in harmful algal bloom dynamics? *Harmful Algae*. 8, 152–157.
- Butterwick, C., Heaney, S.I., Talling, J.F. 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biol.* 50, 291–300.
- C'aceres, O., Reynolds, C.S. 1984. Some effects of artificially-enhanced anoxia on the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutz Emend Elenkin, with special reference to the initiation of its annual growth-cycle in lakes. *Arch. Hydrobiol.* 99, 379–397.
- Campbell, K., Huet, A.C., Charlier, C., Higgins, C., Delahaut, P., Elliott, C.T. 2009. Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Chromatogr. B.* 877, 4079–4089.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. 1999. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6, R319–R325.
- Cao, L., Caldeira, K., 2008. Atmospheric CO₂ stabilization and ocean acidification. *Geophys. Res. Lett.* 35, L19609.
- Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcao, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146, 60–78.
- Carlsson, P., Grane' li, E., Segatto, A.Z., 1999. Cycling of biological available nitrogen in riverine humic substances between marine bacteria, a heterotrophic nanoflagellate and a photosynthetic dinoflagellate. *Aquat. Microb. Ecol.* 18, 23–36.
- Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–459.
- Carmichael, W.W. A status report on planktonic cyanobacteria (blue green algae) and their toxins. Cincinnati Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 1992.
- Carmichael, W.W. Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In: *Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics*; Ownby, C.A., Odell, G.V., Eds., Pergamon Press, Oxford, 1989.
- Carmichael, W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 64–72.
- Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In *Marine Toxins, Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, Hall, S., Strichartz, G., Eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1990.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663–668.
- Carmichael, W.W., Beasley, V.R., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.I., Krishnamurthy, T., Yu, M.J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M., Watanabe, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptid toxins of cianobacteria (blue-green algae). *Toxicon.* 26, 971–973.

- Carmichael, W.W., Falconer, I.R. Diseases related to fresh-water blue-green algal toxins, and control measures. In *Algal toxins in seafood and drinking water*; Falconer, I.R., Ed., Academic Press, London, 1993.
- Carmichael, W.W., Gorham, P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In *The Water Environment: Algal Toxins and Health*; Carmichael, W.W., Ed., Plenum Press, New York/London, 1981.
- Carmichael, W.W., Jones, C.L.A., Mahmood, N.A., Theiss, W.C. 1985. Algal toxins and water-based diseases. *Environ. Control.* 15, 275–313.
- Carneiro, R.L., dos Santos, M.E.V., Pacheco, A.B.F., Azevedo, S.M.F.O. 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *J. Plankton. Res.* 31, 481–488.
- Casanova, T.M., Burch, D.M., Brock, A.M., Bond, M.P. 1999. Does Toxic *Microcystis aeruginosa* Affect Aquatic Plant Establishment. *Environ. Toxicol.* 14, 97–109.
- Castenholz, R.W. Oxygenic photosynthetic bacteria. In Boodne, D.R., Castenholz, R.W., Eds., *Bergey's Manual of Systematic bacteriology* (2nd edition); Springer–Verlag, New York, USA, 2001.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., Garcia, C., Vasquez, M. 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon.* 44, 483–489.
- Chen, H-M., Pang, Y., Zheng, J., Ding, Q., Yin, S-Y., Liu, C., Lu, M-Z., Cui, K-M., He, X-Q. 2012. The Ca^{2+} -dependent DNases are involved in secondary xylem development in *Eucommia ulmoides*. *J. Integr. Plant Biol.* 54, 456–470.
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z. 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon.* 43, 393–400.
- Chen, J., Xie, P. 2005a. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environ. Toxicol.* 20, 572–584.
- Chen, J., Xie, P. 2005b. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *macrobrachium* from a large shallow, eutrophiclake of the subtropical China. *Toxicon.* 45, 615–625.
- Chen, J., Zhang, H.Q., Hu, L.B., Shi, Z.Q. 2013. Microcystin-LR-induced phytotoxicity in rice crown root is associated with the cross-talk between auxin and nitric oxide. *Chemosphere.* 93, 283–293.
- Chen, J., Zhong, Y.M., Zhang, H.Q., Shi, Z.Q. 2012. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in microcystin-LR-induced oxidative stress in *Brassica rapa*. *Water Air Soil Pollut.* 223, 4141–4152.
- Chen, J.Z., Ye, J.Y., Zhang, H.Y., Jiang, X.J., Zhang, Y.X., Liu, Z.L. 2011. Freshwater toxic cyanobacteria induced DNA damage in apple (*Malus pumila*), rape (*Brassica napus*) and rice (*Oryza sativa*). *J. Hazard. Mater.* 190, 240–244.

- Chen, W., Song, L., Dai, J., Ganb, N., Liu, Z. 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon*. 43, 393–400.
- Chen, Y., Wu, H. 2010. Programmed cell death involved in the schizolysigenous formation of the secretary cavity in *Citrus sinensis* L.(Osbeck). *Chin. Sci. Bull.* 55, 2160–2168.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M. J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R. 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 14, 155–161.
- Chorus, I. Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- Chorus, I., Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, 1999.
- Chorus, I., Bartram, J. Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. WHO, Spon Press, London, 1999.
- Chorus, I., Niesel, V., Fastner, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Lindenschmidt, K. Environmental factors and microcystin levels in waterbodies. In Cyanotoxins—Occurrence, causes, consequences; Chorus, I., Ed., Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- Christiansen, G., Dittmann, E., Ordorika, L.V., Rippka, R., Herdman, M., Börner, T. 2001. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. *Arch. Microbiol.* 178, 452–458.
- 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.
- Christoffersen, K. 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia*. 35, 42–50.
- 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. Biological aspects of cyanobacterial toxins. In Toxic Cyanobacteria, Current Status of Research and Management: International Workshop; Steffensen, D.A., Nicholson, B.C., Eds., Adelaide, SA. Proceedings, Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research, Salisbury SA, 1994.
- Codd, G.A., Beattie, K.A. 1991. Cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins: awareness and action in the United Kingdom. *PHLS Microbiol. Digest*. 8, 82–86.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A. 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*. 37, 1181–1185.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 264–272.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Ward, C.J., Beattie, K.A., Bell, S.G., Kaya, K., Poon, G. K. 2001. Analysis of cyanobacterial toxins by physicochemical and biochemical methods. *J. AOAC I.* 84, 1626–1635.
- Collins, M. 1978. Algal toxins. *Microbiol. Rev.* 42, 725–746.

- Collins, M.D., Gowans, C.S., Garro, F., Estervig, D., Swanson, T. Temporal association between an algal bloom and mutagenicity in a water reservoir. In: The water environment; Carmichael, W.W., Ed., Plenum Press, New York, 1981.
- Courties, C., Vaquer A., Trousselier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Neveux, J., Machado, C., Claustre, H. 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature*. 370, 255.
- Cronberg, G., Annadotter, H. Manual on aquatic cyanobacteria. A Photo Guide and Synopsis of their Toxicology. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Copenhagen, 2006.
- Dafni, Z., Ulitzur, S., Shilo, M. 1972. Influence of light and phosphate on toxin production and growth of *Prymnesium parvum*. *J. Gen. Microbiol.* 70, 199–207.
- Davis, T.W., Harke, M.J., Marcoval, M.A., Goleski, J., Orano-Dawson, C., Berry, D.L., Gobler, C.J. 2010. Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during bloom events. *Aquat. Microb. Ecol.* 61, 149–162.
- Demott, W.R., Qing-Xue, Z., Carmichael, W.W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1346–1357.
- Dias, E., Pereira, P., Franca, S. 2002. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (cyanobacteria). *J. Phycol.* 38, 705–712.
- Dietrich, W., Hesse, K.J. 1990. Local fish kill in a pond at the German North Sea coast associated with a mass development of *Prymnesium* sp. *Meeresforschung. Rep. Mar. Res.* 33, 104–106.
- Ding, W.-X., Shen, H.-M., Ong, C.-N. 2000. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 32, 547–555.
- Ding, W.-X., Shen, H.-M., Ong, C.-N. 2001. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 64, 507–519.
- Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B.A., von Döhren, H., and Börner, T. 2001. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*. 147, 3113–3119.
- Dittmann, E., Neilan, B.A., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.* 26, 779–787.
- Dounay, A.B., Forsyth, C.J. 2002. Okadaic acid: The archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. *Curr. Med. Chem.* 9, 1939–1980.
- Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M. 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*. 37, 1187–1193.
- Dwiveldi, A., Srinivas, U.K., Singh, H.N., Kumar, H.D. 1994. Regulatory effect of external pH on the intracellular pH in alkalophilic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Hapalosiphon welwitschii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40, 261–263.

- Edebo, L., Lange, S., Li, X.P., Allenmark, S. 1988. Toxic mussels and okadaic acid induce rapid hypersecretion in the rat small intestine. *APMIS*. 96, 1029–1035.
- Edvardsen, B., Paasche, E. Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. In *The Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*; Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., Eds., Springer Verlag, Heidelberg, 1988.
- Edwards, C., Lawton, L.A., Coyle, S.M., Ross, P. 1996. Automated purification of microcystins. *J. Chromatogr. A*. 734, 175–82.
- El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., El Ghazali, I., Saqrane, S., Vasconcelos, V., Oudra, B. 2011. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-Rhizobia symbiosis. *Ecotoxicol. Environ.* 74, 431–438.
- Elliott, J.A. 2010. The seasonal sensitivity of cyanobacteria and other phytoplankton to changes in flushing rate and water temperature. *Global Change Biol.* 16, 864–876.
- El-Shehawey, R., Gorokhova, E., Fernández-Piñas, F., del Campo, F.F. 2012. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Res.* 46, 1420–1429.
- Entz, G., Sebestyén, O. A Balaton élete. Királyi Magyar Term. Tud. Társaság, 1942
- Eriksson, J.-E., Meriluoto, J.A.O., Kujari, H.P., Skulberg, O.M. 1988. A comparison of toxins isolated from the cyanobacteria *Oscillatoria agardhii* and *Microcystis aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 89, 207–210.
- Esquenazi, E., Jones, A.C., Byrum, T., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H. 2011. Temporal dynamics of natural product biosynthesis in marine cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108, 5226–5231.
- Evans, W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy, 16th Edition. Saunders Ltd, Edinburgh, UK, 2009.
- Fabbro, L., Baker, M., Duivenvoorden, L., Pegg, G., Shiel, R. 2001. The effects of the ciliate *Paramecium* cf. *caudatum* Ehrenberg on toxin producing *Cylindrospermopsis* isolated from the Fitzroy River, Australia. *Environ. Toxicol.* 16, 489–497.
- Falconer, I.R. 1999. An overview of problems caused by toxic Blue-Green Algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicol.* 14, 5–12.
- Falconer, I.R. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In *Algal toxins in seafood and drinking water*; Falconer, I.R., Ed., Academic Press, London, 1993.
- Falconer, I.R. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In *Algal toxins in seafood and drinking water*; Falconer, I.R. Ed., Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, London, Toronto, 1993.
- Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer, G.J., Hawkins, P.R. 1999. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* 14, 143–150.
- Fallon, R.D., Brock, T.D. 1981. Overwintering of *Microcystis* in Lake Mendota. *Freshw. Biol.* 11, 217–226.
- Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Röncke, H., Chorus, I. 1999. Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the

- genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. Arch. Hydrobiol. 145, 147–163.
- Fastner, J., Erhard, M., Döhren, H. 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5069–5076.
- Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, 2008.
- Fay, P. 1965. Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. J. Gen. Microbiol. 39, 11–20.
- Fay, W.F., Van Baalen, C. The Cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam, 1987.
- Felföldy, L. A vizek környezettana - Általános hidrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1981.
- Fergusson, K.M., Saint, C.P. 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria Environ. Toxicol. 18, 120–125.
- Figueredo, C.C., Giani, A., Bird, D.F. 2007. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? J. Phycol. 43, 256–265.
- Fischer, W.J., Althimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203, 257–263.
- Flewelling, L.J., Naar, J.P., Abbott, J.P., Baden, D.G., Barros, N.B., Bossart, G.D., Bottein, M.-Y.D., Hammond, D.G., Haubold, E.M., Heil, C.A., Henry, M.S., Jacocks, H.M., Leighfield, T.A., Pierce, R.H., Pitchford, T.D., Rommel, S.A., Scott, P.S., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Dolah, F.M.V., Landsberg, J.H. 2005. Red tides and marine mammal mortalities. Nature. 435, 755–756.
- Fogg, G.E. 1969. The physiology of an algal nuisance. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 173, 175–189.
- Franchini, A., Casarini, L., Ottaviani, E. 2008. Toxicological effects of marine palytoxin evaluated by FETAX assay. Chemosphere. 73, 267–271.
- Francis, G. 1878. Poisonous Australian Lake. Nature. 18, 11–12.
- Frosio, S.M., Humpage, A.R., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R. 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. Toxicon. 51, 191–198.
- Fujiki, H., Suganuma, M. 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: The okadaic acid class of compounds. Adv. Cancer Res. 61, 143–194.
- Fulton III, R.S., Paerl, H.W. 1987. Toxic and inhibitory effects of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* to herbivorous zooplankton. J. Plank. Res. 9, 837–855.
- Gademann, K., Portmann, C. 2008. Secondary metabolites from Cyanobacteria: complex structures and powerful activities. Curr. Org. Chem. 12, 326–341.
- Gago-Martinez, N., Pineiro, E.C., Aguet, E., Vaquero, M., Nogueiras, J.M., Leao, J.A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Dabek-Zlotorzynska, E. 2003. Further improvements in the application of high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and

- capillary electrochromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A.* 902, 159–68.
- 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.
- Gallon, J.R., Kittakoop, P., Brown, E.G. 1994. Biosynthesis of anatoxin-a by *Anabaena flos-aquae*: examination of primary enzymic steps. *Phytochemistry.* 35, 1195–1203.
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., Song, L. 2012. The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environ. Microbiol.* 14, 730–742.
- Garson, J. 1989. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 6, 143–170.
- Gáspár, A. Kapilláris zónaelektroforézis. Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000.
- 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.
- Gehring, M.M., Kewada, V., Coates, N., Downing, T.G. 2003. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicon.* 41, 871–876.
- Gilbert, J.J. 1996. Effect of food availability on the response of planktonic rotifers to a toxic strain of the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Limnol. Oceanogr.* 41, 1565–1572.
- Ginn, H.P., Pearson, L.A., Neilan, B.A. 2010. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4362–4368.
- Gkelis, S., Moustaka-Gouni, M., Sivonen, K., Lamas, T. 2005. First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. *J. Plankton. Res.* 27, 1295–1300.
- Glass, J., Linam, G., Ralph, J. The association of *Prymnesium parvum* with fish kills in Texas. Texas Parks and Wildlife Report. 1991.
- Glibert, P., Burkholder, J. 2011. Harmful algal blooms and eutrophication: “Strategies” for nutrient uptake and growth outside the Redfield comfort zone. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 29, 724–738.
- Gophen, M., Smith, V.H., Nishri, A., Threlkeld, S.T. 1999. Nitrogen deficiency, phosphorus sufficiency, and the invasion of Lake Kinneret, Israel, by the N-2-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *Aquat. Sci.* 61, 293–306.
- Gottesman, S., Maurizi, M.R. 1992. Regulation by Proteolysis: Energy –Dependent Proteases and Their Targets. *Microbiol. Rev.* 56, 592–621.
- Granéli, E., Edvardsen, B., Roelke, D.L., Hagström, J.A. 2012. The ecophysiology and bloom dynamics of *Prymnesium* spp. *Harmful Algae.* 14, 260–270.
- Granéli, E., Flynn, K. 2006. Chemical and Physical Factors Influencing Toxin Content. In *Ecology of Harmful Algae*; Granéli, E., Turner, J.T., Eds., Springer Berlin Heidelberg: New York, NY, USA,; Volume 189, pp. 229–241.

- Gupta, N., Bhaskar, A.S.B., Rao, P.V.L. 2002. Growth characteristics and toxin production in batch cultures of *Anabaena flos-aquae*: effects of culture media and duration. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 29–35.
- Guzman, E.R., Solter, P.F. 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin-LR exposure. *Toxicol. Pathol.* 27, 582–588.
- Hadas, O., Pinkas, R., Delphine, E., Vardi, A., Kaplan, A., Sukenik, A. 1999. Limnological and ecophysiological aspects of *Aphanizomenon ovalisporum* bloom in Lake Kinneret, Israel. *J. Plankton. Res.* 21, 1439–1453.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J. 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1609, 1–18.
- Halstead, B.W. Poisons and Venomous Animals of the World; US Govt. Printing Office: Washington, USA, 1965.
- Hallegraeff, G.M. 1992. Harmful algal blooms in the Australian region. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 186–190.
- Hallegraeff, G.M. Harmful algal bloom: A global overview. In *Manual on Harmful Marine Microalgae*; Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., Eds., IOC-UNESCO: Paris, France, 1995.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia.* 32, 79–99.
- Hallmann, A. 2007. Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal.* 1, 81–98.
- Hamar, J. 1977. Data on knowledge of the blue-green alga *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. Tiscia (Szeged). 12, 17–20.
- Harada, K. I., Ogawa, K., Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Itezono, Y., Nakayama, N. 1990. Structure determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 473–481.
- Harada, K. I., Tsuji, K. 1998. Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. *J. Toxicol.* 17, 385–403.
- Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M., Terao, K. 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon.* 32, 73–84.
- Harada, K.I., Krishnamurthy, T., Yu, M.J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M., Watanabe, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptid toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon.* 26, 971–973.
- Hasson, S.S., Theakston, R.D.G., Harrison, R.A. 2004. Antibody zymography: a novel adaptation of zymography to determine the protease-neutralising potential of specific antibodies and snake antivenoms. *J. Immunol. Methods.* 292, 131–139.
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R., Falconer, I R., 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon.* 35, 341–346.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga)

- Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Environ. Microbiol. 50, 1292–1295.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Environ. Microbiol. 50, 1292–1295.
- Hayman, J. 1992. Beyond the Barcoo - probable human tropical cyanobacterium poisoning in outback Australia. Med. J. Australia. 157, 794–796.
- Heintzelman, G.R., Fang, W.K., Keen, S.P., Wallace, G.A., Weinreb, S.M. 2001. Stereoselective total synthesis of the cyanobacterial hepatotoxin 7-epicylindrospermopsin: Revision of the stereochemistry of cylindrospermopsin. J. Am. Chem. Soc. 123, 8851–8853.
- Heintzelman, G.R., Fang, W.K., Keen, S.P., Wallace, G.A., Weinreb, S.M. 2002. Stereoselective total syntheses and reassignment of stereochemistry of the Freshwater cyanobacterial hepatotoxins cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin J. Am. Chem. Soc. 124, 3939–3945.
- Heintzelman, G.R., Weinreb, S.M., Parvez, M. 1996. Imino Diels-Alder-based construction of a piperidine A-ring unit for total synthesis of the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. J. Org. Chem. 61, 4594–4599.
- Heisler, J.P., Gilbert, J., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D., Suddleson, M. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. Harmful Algae. 8, 3–13.
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J., Moestrup, O. 1997. Detection of an anatoxin-a(S)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. Toxicon. 35, 901–913.
- Hesse, K., Dittmann, E., Börner, T. 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. FEMS Microbiol. Ecol. 37, 39–43.
- Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.M. 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. Toxicon. 46, 218–221.
- Hindak, F. 1988. Planktic species of two related genera *Cylindrospermopsis* and *Anabaenopsis* from Western Slovakia. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80, 284–302.
- Hitzfeld, B.C., Lampert, C.S., Spaeth, N., Mountfort, D., Kaspar, H., Dietrich, D.R. 2000. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. Toxicon. 38, 1731–1748.
- Hjerten, S. 1990. Zone broadening in electrophoresis with special reference to high-performance electrophoresis in capillaries—an interplay between theory and practice. Electrophoresis. 11, 665–90.

- Holdway, P.A., Watson, R.A., Moss, B. 1978. Aspects of the ecology of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) and water chemistry in the Norfolk Broads, England. *Freshw. Biol.* 8, 295–311.
- Holland, A., Kinnear, S. 2013. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Mar. Drugs.* 11, 2239–2258.
- Holmquist, E., Willén, T. 1993. Fish kill caused by *Prymnesium parvum*. *Vatten.* 49, 110–115.
- Hortobágyi, T. 1962. Két vízvirázás a Balatonon. *Botanikai Közlemények.* 49, 233–237.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., Van der Lin-den, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. *Climate Change 2001: The Scientific Basis.* Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
- Hu, Z.Q., Liu, Y.D., Li, D.H. 2004. Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environ. Toxicol.* 19, 571–577.
- Huang, W., Xin, W., Li, D., Liu, Y. 2008. Microcystin-RR induced apoptosis in tobacco BY-2 suspension cells is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *Toxicol. Vit.* 22, 328–337.
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. *Harmful Cyanobacteria.* Springer-Verlag, Berlin, 2005.
- Igarashi, T., Satake, M., Yasumoto, T. 1999. Structures and partial stereochemical assignments for prymnesin-1 and prymnesin-2: potent hemolytic and ichthyotoxic glycosides isolated from the red tide alga *Prymnesium parvum*. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8499–8511.
- IPCC, 2007: Summary for Policymakers. In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis.* Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jahnichen, S., Ihle, T., Petzoldt, T., Benndorf, J. 2007. Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6994–7002.
- James, T., De La Cruz, A. 1989. *Prymnesium parvum* Carter (Chrysophyceae) as a suspect of mass mortalities of fish and shellfish communities in western Texas. *Tex. J. Sci.* 41, 429–430.
- Jang, H.M., Ha, K., Takamura, N. 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon.* 49, 727–733.
- Jang, M.-H., Ha, K., Joo, G.-J., Takamura, N. 2003. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshw. Biol.* 48, 1540–1550.
- Jang, M.-H., Ha, K., Lucas, M.C., Joo, G.-J., Takamura, N. 2004. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquat. Toxicol.* 68, 51–59.

- Jang, M.H., Jung, J.M., Takamura, N. 2007. Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 52, 1454–1466.
- Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spoofa, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E., Meriluoto, J. 2007. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon.* 49, 865–874.
- Jensen, T.E., Sicko, L.M. 1974. Phosphate metabolism in blue-green algae. I. Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. *Can. J. Microbiol.* 9, 1235–1239.
- Jiang, J., Gu, X., Song, R., Wang, X., Yang, L. 2011. Microcystin-LR induced oxidative stress and ultrastructural alterations in mesophyll cells of submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. *J. Hazard. Mater.* 190, 188–196.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E., Antunes, M.B., de Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S., Azevedo, S.M., Jarvis, W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338, 873–878.
- Johansson, N., Granéli, E. 1999. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 239, 243–258.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spácil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B. 2010 Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 9252–9257.
- Jonasson, S., Vintila, S., Sivonen, K., El-Shehawy, R. 2008. Expression of the nodularin synthetase genes in the Baltic Sea bloom-former cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain AV1. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 31–39.
- Jonsson, P.R., Pavia, H., Toth, G. 2009. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 11177–11182.
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T., Neilan, B.A. 2002. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 449–455.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E. 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3387–3392.
- Kankaanpää, H., Vuorinen, P.J., Sipilä, V., Keinänen, M. 2002. Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 61, 155–168.
- Kankaanpää, H.T., Holliday, J., Schroder, H., Goddard, T.J., von Fister, R., Carmichael, W.W. 2005. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia - a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 243–256.

- Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.-M. 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Harmful Algae*. 2, 29–41.
- Kardinaal, E.W., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J., Visser, P.M. 2007. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2939–2946.
- Karkos, P.D., Leong, S.C., Karkos, C.D., Sivaji, N., Assimakopoulos, D.A. 2011. Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011, 1–4.
- Kaushik, R., Balasubramanian, R. 2013. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43, 1349–1383.
- Kawahara, H. 2002. The Structures and Functions of Ice Crystal-Controlling Proteins from Bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 492–496.
- Kay, R.A. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30, 555–573.
- Kearns, K.D., Hunter, M.D. 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microb. Ecol.* 42, 80–86.
- Kearns, K.D., Hunter, M.D. 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environ. Microbiol.* 2, 291–297.
- Keating, K. I. 1977. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake. *Science*. 196, 885–886.
- Keevil, C.W. Toxicology and detection of cyanobacterial (blue-green algal) toxins. In Codd, G.A., Roberts, C., Eds., *Public health aspects of cyanobacteria (blue-green algae)*; PHLS Microbiology Digest Supplement 8, 91–95. London, 1991.
- Kehr, J.C., Zilliges, Y., Springer, A., Disney, M.D., Ratner, D.D., Bouchier, C., Seeberger, P.H., de Marsac, N.T., Dittmann, E. 2006. A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 59, 893–906.
- Keleti, G., Sykora, J.L. 1982. Production and properties of Cyanobacterial endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 104–109.
- Kellmann, R., Mills, T., Neilan, B.A. 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J. Mol. Evol.* 62, 267–280.
- Kellmann, R., Neilan, B.A. 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. *J. Phycol.* 43, 497–508.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4044–4053.
- Kinnear, S. 2010. Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs*. 8, 542–564.
- Kinnear, S.H.W., Duivenvoorden, L.J., Fabbro, L.D. 2007. Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. *Harmful Algae*. 6, 642–650.

- Kinnear, S.H.W., Duivenvoorden, L.J., Fabbro, L.D. 2007a. Sublethal responses in *Melanoides tuberculata* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* containing cylindrospermopsin. *Harmful Algae*. 6, 642–650.
- Kinnear, S.H.W., Duivenvoorden, L.J., Fabbro, L.D. 2007b. Growth and bioconcentration in *Spirodella oligorrhiza* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* whole cell extracts. *Australasian Journal of Ecotoxicology*. 13; 19–31.
- Kinnear, S.H.W., Fabbro, L.D., Duivenvoorden, L.J. 2008. Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch. Environ. Contam. Toxcol.* 54, 187–194.
- Kiss, I. 1985. The development of striking algal mass productions at the Alpár-basin region of the Tisza-valley; Feltűnő alga-tömegprodukciók kialakulása a Tisza-völgy Alpár-medencéje területén. *Tiscia*. 20, 13–28.
- Kiss, K.T. 1998. Bevezetés az algológiába. Elméleti és gyakorlati ismeretek. Egyetemi Tankönyv, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 1998.
- Kiss, T., Vehovszky, A., Hiripi, L., Kovács, A., Vörös, L. 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comp. Biochem. Phys. C*. 131, 167–176.
- Kittler, K., Schreiner, M., Krumbein, A., Manzei, S., Koch, M., Rohn, S., Maul, R. 2012. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem.* 133, 875–879.
- Klemer, A.R. 1976. The vertical distribution of *Oscillatoria aghardii* var. *isothrix*. *Arch. Hydrobiol.* 78, 343–362.
- Komárek, J. 2003. Planktic oscillatorialeen cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiologia*. 502, 367–382.
- 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.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota, part 2. Oscillatoriales. In *Süßwasser Flora von Mitteleuropa Band 19/2*; Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M., Eds., Gustav Fischer, Jena, Germany, 2005.
- Komatsu, M., Furukawa, T., Ikeda, R., Takumi, S., Nong, Q., Aoyama, K., Akiyama, S.-I., Keppler, D., Takeuchi, T. 2007. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicol. Sci.* 97, 407–416.
- Konopka, A., Schnur, M. 1980. Effect of light intensity on macromolecular synthesis in cyanobacteria. *Microb. Ecol.* 6, 291–301.
- Konz, D., Marahiel, M.A. 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.* 6, R39–R48.
- 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.

- Kotak, B. G., Lam, A. K-Y., Prepas, E. E., Kenefick, S. L., Hrudey, S. E. 1995. Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypertrophic drinking water lakes. *J. Phycol.* 31, 248–263.
- Kotak, B.G., A.K-Y. Lam, E.E. Prepas S.E. Hrudey. 2000. Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1584-1593.
- Kozakai, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Isolation and structural elucidation of hemolysin from the phytoflagellate *Prymnesium parvum*. *Agric. Biol. Chem.* 46, 233–236.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S. 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of lesser flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 141–148.
- 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.
- Kumagai, M., Yamagi, T., Murata, M., Yasumoto, T., Kat, M., Lassus, P., Rodriguez-Vazquez, J.A. 1986. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2857–2863.
- Kurki-Helamso, K., Meriluoto, J. 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon.* 36, 1921–1926.
- Kurmayer, R. 2011. The toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *J. Phycol.* 47, 200–207.
- Kurmayer, R., Christiansen, G. 2009. The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshw. Rev.* 2, 31–50.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Chorus, I. 2003. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl. Environ. Microb.* 69, 787–795.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Gumpenberger, M., Fastner, J. 2005. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology.* 151, 1525–1533.
- Kurmayer, R., 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.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Lahrouni, M., Oufdou, K., El Khallouf, F., Baz, M., Lafuente, A., Dary, M., Pajuelo, E., Oudra, B. 2013. Physiological and biochemical defense reactions of *Vicia faba* L. – *Rhizobium* symbiosis face to chronic exposure to cyanobacterial bloom extract containing microcystins. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Lahrouni, M., Oufdou, K., Faghire, M., Peix, A., El Khalloufi, F., Vasconcelos, V., Oudra, B. 2012. Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation

- process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae). *Ecotoxicology*. 21, 681–687.
- Landers, J.P. Handbook of Capillary Electrophoresis. CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Landsberg, J. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish Sci.* 10, 113–390.
- Landsberg, J.H., Steidinger, K. A historical review of red tide events caused by *Gymnodinium breve* as related to mass mortalities of the endangered manatee (*Trichechus manatus latirostris*) in Florida, USA. In *Harmful Microalgae*; Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T., Eds., IOC-UNESCO: Xunta de Galicia, Spain, 1998.
- Láng, F. Növényélettan (A növényi anyagcsere). Egyetemi tankönyv. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 1998.
- Lankoff, A., Banasik, A., Nowak, M., 2002. Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress. *Arch. Toxicol.* 76, 158–165.
- Larsen, A., Bryant, S. 1998. Growth rate and toxicity of *Prymnesium parvum* and *Prymnesium patelliferum* (Haptophyta) in response to changes in salinity, light and temperature. *Sarsia*. 83, 409–418.
- Larsen, A., Medlin, L.K. 1997. Inter- and intraspecific genetic variation in twelve *Prymnesium* (Haptophyceae) clones. *J. Phycol.* 33, 1007–1015.
- Laughinghouse IV, H.D., Prá, D., Silva-Stenico, M.E., Rieger, A., Frescura, V.D., Fiore, M.F., Tedesco, S.B. 2012. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Sci. Total Environ.* 432, 180–188.
- Lawry, N.H., Jensen, T.E. 1979. Deposition of condensed phosphate as an effect of varying sulfur deficiency in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. (*Anacystis nidulans*). *Arch. Microbiol.* 12, 1–7.
- Lawry, N.H., Simon, R.D. 1980. The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae. *J. Phycol.* 18, 391–399.
- Leão, P.N., Vasconcelos, M.T.S.D., Vasconcelos, V.M. 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 271–282.
- Leflaive, J.P., Ten-Hage, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: A comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52, 199–214.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O., Granéli, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton—Biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*. 42, 406–419.
- Lehtimäki, J., Moisander, P., Sivonen, K., Kononen, K. 1997. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two baltic sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1647–1656.
- Lehtimäki, K., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I. 1994. The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and heptotoxin production by *Nodularia* strains. *Arch. Hydrobiol.* 130, 269–282.
- Li, P.C.H., Hu, S., Lam, P.K.S. 1999. Development of a Capillary Zone Electrophoretic Method for the Rapid Separation and Detection of Hepatotoxic Microcystins. *Marine Poll. Bull.* 39, 250–254.

- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhan, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K., Watanabe, M.M. 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*. 39, 973–980.
- Li, R.H., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D., Watanabe, M.M. 2001. First report of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 37, 1121–1126.
- Lillehoj, E.B. 1982. Evolutionary basis and ecological role of toxic microbial secondary metabolites. *J. Theor. Biol.* 97, 325–332.
- Linam, G., Ralph, J., Glass, J. 1991. Toxic blooms, an unusual algae threatens aquatic resources. *Chihuahuan Desert Discovery*. 28(Winter), 6-7.
- Lindner, P., Molz, R., Yacoub-George, E., Dürkop, A., Wolf, H. 2004. Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. *Anal. Chim. Acta*. 521, 37–44.
- Lindsay, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A. 2006. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon*. 48, 995–1001.
- Long, B.M., Jones, G.J., Orr, P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 278–283.
- Looper, R.E., Williams, R.M. 2004. A concise asymmetric synthesis of the marine hepatotoxin 7-epicylindrospermopsin. *Angew. Chem. Int. Edit.* 43, 2930–2933.
- Louzao, M.C., Ares, I.R., Cagide, E. 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: A new view of palytoxin toxicity. *FEBS J.* 275, 6067–6074.
- Lukac, M., Aegerter, R. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*. 31, 293–305.
- Lyck, S., Gjølme, N., Utkilen, H. 1996. Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*. 35, 120–124.
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264, 187–192.
- Malagoli, D., Casarini, L., Ottaviani, E. 2008. Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 180–186.
- Malta, B.M., Lira, M.S., Soares, S.L., Rocha, G.C., Knysak, I., Martins, R., Guizze, S.P.G., Santoro, M.L., Barbaro, K.C. 2008. Toxic activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon*. 52, 255–263.
- Manning, S.R., La Claire, J.W. 2010. Prymnesins: toxic metabolites of the Golden Alga, *Prymnesium parvum* Carter (Haptophyta). *Mar. Drugs*. 8, 678–704.
- Manning, S.R., La Claire, J.W., 2010. Multiplex PCR methods for the species-specific detection and quantification of *Prymnesium parvum* (Haptophyta). *J. Appl. Phycol.* 22, 587–597.

- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D., 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97, 2651–2673.
- Marles, R.J., Barrett, M.L., Barnes, J., Chavez, M.L., Gardiner, P., Ko, R., Mahady, G.B., Low Dog, T., Sarma, N.D., Giancaspro, G.I., Sharaf, M., Griffiths, J. 2011. United States Pharmacopeia Safety Evaluation of Spirulina. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 593–604.
- Maršálek, B., Bláha, L. 2004. Comparison of 17 biotests for detection of cyanobacterial toxicity. *Environ. Toxicol.* 19, 310–317.
- Martin, C., Codd, G.A., Siegelman, H.W., Weckesser, J. 1989. Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains. *Arch. Microbiol.* 152, 90–94.
- Máthé, C., Vasas, G., Borbély, G., Erdődi, F., Beyer, D., Kiss, A., Surányi, G., Gonda, S., Jámbrik, K., M-Hamvas, M. 2013a. Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biol. Hung.* 64, 75–89.
- Máthé, Cs., Bakos, F., M-Hamvas, M., Surányi, Gy., Vasas, G., Molnár, E., Grigorszky, I., Borbély, Gy. 2001. A NADP-függő izocitrát-dehidrogenáz (NADP-IDH) enzim aktivitásának változása mikrocisztinnel kezelt nád (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) sejtuszupenziós tenyészetekben. *Hidrológiai Közölny.* 81, 405–406.
- Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Mejean, A., Ploux, O. 2010. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4943–4949.
- Mazur-Marzec, H., Krezel, A., Kobos, J., Plinski, M. 2006. Toxic *Nodularia spumigena* blooms in the coastal waters of the Gulf of Gdansk: a ten-year survey. *Oceanologia.* 48, 255–273.
- Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C. 2005. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 299–306.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C. 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon.* 39, 1411–1420.
- McLaughlin, J.J.A. 1958. Euryhaline chrysomonads: nutrition and toxigenesis in *Prymnesium parvum*, with notes on *Isochrysis galbana* and *Monochrysis lutheri*. *J. Protozool.* 5, 75–81.
- Meissner, K., Dittmann, E., Börner, T., 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptid synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 295–303.
- Méjean, A., Mann, S., Maldiney, T., Vassiliadis, G., Lequin, O., Ploux, O. 2009. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7512–7513.

- Merchant, R.E., Andre, C.A. 2001. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Alter. Ther.* 7, 79–90.
- Meriluoto, J., Codd, G.A. Toxic: cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Åbo Akademi University Press, Åbo, 2005.
- Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A. 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 125–129.
- Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Saker, M.L., Codd, G.A. 2002. Effects of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and its recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 159–164.
- Metcalf, J.S., Codd, G.A. 2003. Analysis of Cyanobacterial Toxins by Immunological Methods. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 103–112.
- M-Hamvas, M., Vasas, G., Surányi, Gy., Máthé, Cs., Molnár, E., Grigorszky, I., Borbély, Gy. 2001. A toxikus *Microcystis aeruginosa* és *Cylindrospermopsis raciborskii* kionatok hatása a mustár csíranövények fehérjemintázatára. *Hidrológiai Közlöny.* 81, 410–412.
- Mihali, T.K., Carmichael, W.W., Neilan, B.A. 2011. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. *PLoS One.* 6, e14657.
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Neilan, B.A. 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochem.* 10, 8.
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K.D., Neilan, B.A. 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 716–722.
- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O.M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T.M., Rudi, K., Jakobsen, K.S. 2003. Natural Variation in the Microcystin Synthetase Operon *mcvABC* and Impact on Microcystin Production in *Microcystis* Strains. *J. Bacteriol.* 185, 2774–2785.
- Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J. 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 345–352.
- Mitrovic, S.M., Pflugmacher, S., James, K.J., Furey, A. 2004. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquat. Toxicol.* 68, 185–192.
- Moffitt, M.C., Neilan, B.A. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6353–6362.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J. 1971. Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. *Science.* 172, 495–498.
- Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A., Vasconcelos, V. 2013. Cylindrospermopsin: Occurrence, methods of detection and toxicology. *J. Appl. Microbiol.* 114, 605–620.

- Muenchhoff, J., Siddiqui, K.S., Poljak, A., Raftery, M.J., Barrow, K.D., Neilan, B.A. 2010. A novel prokaryotic L-arginine:glycine amidinotransferase is involved in cylindrospermopsin biosynthesis. *FEBS J.* 277, 3844–3860.
- Mulholland, M.R., Glibert, P.M., Berg, G.M., Van Heukelem, L., Pantoja, S., Lee, C. 1998. Extracellular amino acid oxidation by phytoplankton and cyanobacteria: a cross-ecosystem comparison. *Aquat. Microb. Ecol.* 15, 141–152.
- Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S., Yasumoto, T. 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.* 28, 5869–5872.
- Murray, S.A., Mihali, T.K., Neilan, B.A. 2011. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1173–1182.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C., Dittmann, E. 2012. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 15, 1239–1253.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Torokne, A., Burns, B.P. 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* 12, 133–140.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K-I., Shirai, M. 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 126, 520–529.
- Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K-I., Ochi, K., Shirai, M. 2000. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J. Biochem.* 127, 779–789.
- Nogueira, I.C.G., Saker, M.L., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Vasconcelos, V.M. 2004. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis radborskii* to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.* 19, 453–459.
- Nygaard, K., Tobiesen, A. 1993. Bacterivory in algae: A survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 38, 273–279.
- Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T. 1997. Toxicological evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins.* 5, 255–259.
- Oh, H.K., Lee, S.J., Kim, J.H., Kim, H.S., Yoon, B.D. 2001. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentrations in Daechung reservoir, Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1484–1489.
- Oh, H.-M., Lee, S.J., Jang, M.-H., Yoon, B.-D. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 176–179.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941–7942.
- Oliver, R.L., Thomas, R.H., Reynolds, C.S., Walsby, A.E. 1985. The sedimentation of buoyant *Microcystis* colonies caused by precipitation with an iron-containing colloid. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 223, 511–528.

- Onyewuenyi, N., Hawkins, P. 1997. Separation of toxic peptides (microcystins) in capillary electrophoresis, with the aid of organic mobile phase modifiers. *J. Chromatogr. A.* 749, 271–277.
- Ortea, P.M., Allis, O., Healy, B.M., Lehane, M., Ní Shuilleabháin, A., Furey, A., James, K.J. 2004. Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultraviolet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 55, 1395–1402.
- Otterstroem, C.V., Steemann, Nielsen E. 1939. Two cases of extensive mortality in fishes caused by the flagellate *Prymnesium parvum* Carter. Report of the Danish Biological Station. 44, 5–24.
- Ouahid, Y., Pérez-Silva, G., Campo, F.F. 2005. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environ. Toxicol.* 20, 235–242.
- Oullette, A., Wilhelm, S. 2003. Toxic cyanobacteria: The evolving molecular toolbox. *Front. Ecol. Environ.* 1, 359–366.
- 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.
- Padisák, J., Istvánovics, V. Hogyan magyarázhatók a rendszertelen *Cylindrospermopsis raciborskii* tömegprodukciók a Balatonban-egy nullhipotézis. In A XXXVII. Hidrobiológus napok Kiadványa; Bíró P., Ed., Innopress Kft, Veszprém, 1995.
- Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnol. Oceanogr.* 33, 823–847.
- Paerl, H.W. 2008. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 216–241.
- Paerl, H.W. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Hudnell, K.H., Ed., Springer, New York, 2008.
- Paerl, H.W., Bland, P.T., Bowles, N.D., Haibach, M.E. 1985. Adaptation to high-intensity, low-wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1046–1052.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S. Ecology of harmful cyanobacteria. In *Ecology of Harmful Marine Algae*; Graneli, E., Turner, J., Eds., Springer-Verlag, Berlin, 2006.
- Paerl, H.W., Huisman, J. 2008. Blooms like it hot. *Science*. 320, 57–58.
- Paerl, H.W., Ustach, J. 1982. Blue-green algal scums: an explanation for their occurrence during freshwater blooms. *Limnol. Oceanogr.* 27, 212–217.
- Palenik, B., Morel, F.M.M. 1990. Amino acid utilization by marine phytoplankton: a novel mechanism. *Limnol. Oceanogr.* 35, 260–269.
- Park, H.D., Iwami, C., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Okino, T., Hayashi, H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991–1994). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 61–72.

- Paster, Z.K. Pharmacology and mode of action of prymnesin. In Cell biology: A Series of Monographs, Marine Pharmacognosy. Action of Marine Biotoxins at the Cellular Level; Martin, D.F., Padilla, G.M., Eds., Academic Press, New York, 1973.
- Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A. 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6370–6378.
- Pearson, M.J., Ferguson, A.J.D., Codd, G.A., Reynolds, C.S., Fawell, J., Hamilton, R.M., Howard, S.R., Attwood, M.R. Toxic blue-green algae. The report to the National Rivers Authority. Water Quality Series No.2, NRA Peterborough, UK. 1990.
- Peary, J.A., Gorham, P.R. 1966. Influence of light and temperature on growth and toxin production by *Anabaena flos-aquae*. J. Phycol. 2, 3.
- Peeters, F., Straile, D., Lorke, A., Livingstone, D.M. 2007. Earlier onset of the spring phytoplankton bloom in lakes of the temperate zone in a warmer climate. Global Change Biol. 13, 1898–1909.
- 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.
- Peperzak, L. 2003. Climate change and harmful algal blooms in the North Sea. Acta Oecol. 24, 139–144.
- Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S. 2007. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). Environ. Toxicol. 22, 436–442.
- Peuthert, A., Pflugmacher, S. 2010. Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in alfalfa seedlings (*Medicago sativa*). Toxicon. 56, 411–417.
- Pflugmacher, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. 17, 407–413.
- Pflugmacher, S. 2004. Promotion of oxidative stress in aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. Aquat. Toxicol. 70, 169–178.
- Pflugmacher, S., Aulhorn, M., Grimm, B. 2007. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. New Phytol. 175, 482–948.
- Pflugmacher, S., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. 1999. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. Environ. Toxicol. 14, 111–115.
- Pflugmacher, S., Jung, K., Lundvall, L., Neumann, S., Peuthert, A. 2006. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of

- alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2381–2387.
- Pflugmacher, S., Olin, M., Kankaanpää, H. 2007. Nodularin induces oxidative stress in the Baltic Sea brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *Mar. Environ. Res.* 64, 149–159.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. 1998. Identification of enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527–533.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K.A., Krause, E., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. 2001. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (CAV.) Trin. Ex Steud. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 846–852.
- Pichardo, S., Pflugmacher, S. 2011. Study of the antioxidant response of several bean variants to irrigation with water containing MC-LR and cyanobacterial crude extract. *Environ. Toxicol.* 26, 300–306.
- Pierce, R.H., Pitchford, T.D., Rommel, S.A., Scott, P.S., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Van Dolah, F.M., Landsberg, J.H. 2005. Brevetoxicosis: Red tides and marine mammal mortalities. *Nature*. 435, 755–756.
- Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S., Vasconcelos, V. 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia*. 705, 27–42.
- Pinho, G.L., da Rosa, C.M., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proenca, L.A., Monserrat, J.M. 2005. Antioxidant responses after microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pre-treated with vitamin E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 361–365.
- Pinho, G.L.L., da Rosa, C.M., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini, A., Monserrat, J.M. 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 135, 459–468.
- Plominsky, A.M., Soto-Liebe, K., Vasquez, M. 2009. Optimization of 2D-PAGE protocols for proteomic analysis of two nonaxenic toxin-producing freshwater cyanobacteria: *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis* sp. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 332–337.
- Pollingher, U., Hadas, O., Yacobi, Y.Z., Zohary, T., Berman, T. 1998. *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in Lake Kinneret, Israel. *J. Plankton. Res.* 20, 1321–1339.
- Pomati, F., Neilan, B.A., Suzuki, T., Manarolla, G., Rossetti, C. 2003. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). *J. Phycol.* 39, 535–542.
- Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., Neilan, B.A. 2003. Effects of saxitoxin (STX) and veratridine on bacterial Na⁺-K⁺ fluxes: A prokaryote-based STX bioassay. *Appl. Environ. Microb.* 69, 7371–7376.

- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A. 2004. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology*. 150, 455–461.
- Pomogyi, P. A Kis-Balaton Védőrendszer kémiai, biológiai, anyagforgalmi vizsgálatai, Összefoglaló jelentés az 1985-1990 közötti kutatásokról. – Nyugat-dunántúli Vízügyi Igazgatóság, Szombathely-Keszthely, 1991.
- Prescott, G.W. The algae: A review. Houghton Mifflin Co., Boston, 1968.
- Preston, T., Stewart, W.D.P., Reynolds, C.S. 1980. Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on sediment surface. *Nature*. 288, 365–367.
- Preussel, K., Stuken, A., Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J. 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*. 47, 156–162.
- Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., Long, B.M. 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J. Exp. Bot.* 59, 1441–1461.
- Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V. 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 1973–1980.
- Rai, A.N. CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria. CRC Press, Boca, Raton, 1990.
- Rantala, A. 2007. Evolution and Detection of Cyanobacterial Hepatotoxin Synthetase Genes; University of Helsinki: Helsinki, Finland.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 568–573.
- Rantala-Ylinen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Guggen, M., Sivonen, K. 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7271–7278.
- Rao, P.V.L., Bhattacharaya, R. 1996. The cyanobacteria toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*. 114, 29–36.
- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., Lahti, K. 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of methods. *Anal. Chim. Acta*. 466, 213–231.
- Rapala, J., Sivonen, K. 1998. Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microb. Ecol.* 36, 181–192.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukainen, R., Niemala, S.I. 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains in a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* 5, 581–591.

- Rasmussen, J.P., Cursaro, M., Froschio, S.M., Saint, C.P. 2008. An examination of the antibiotic effects of cylindrospermopsin on common gram-positive and gram-negative bacteria and the protozoan *Naegleria lovaniensis*. *Environ. Toxicol.* 23, 36–43.
- Raven, J.A. 2010. Cyanotoxins: A poison that frees phosphate. *Curr. Biol.* 20, R850–R852.
- Reich, K., Parnas, I. 1962. The effect of illumination on ichthyotoxin in an axenic culture of *Prymnesium parvum* Carter. *J. Protozool.* 9, 38–41.
- Reichenbach-Klinke, H. Fish Pathology. T.F.H. Publications, Neptune City, 1973.
- Repavich, W.M., Sonzogni, W.C., Standridge, J.H., Wedepohl, R.E., Meisner, L.F. 1990. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Res.* 24, 225–231.
- Repka, S., Mehtonen, J., Vaitomaa, J., Saari, L., Sivonen, K. 2001. Effects of nutrients on growth and nodularin production of *Nodularia* strain GR8b. *Microb. Ecol.* 42, 606–613.
- Reskóné, N.M. 1998. Vízminőségi monitoring. Összefoglaló jelentés az 1998-as évről. (Waterquality monitoring. Summary report on 1998). Manuscript.
- Reskóné, N.M., Ponyi, J., Szító, A., Kiss, G., Ács, É., Borsodi, A. 2001. A Velencei-tó biológiai állapota. *Hidrológiai Közöny* 81, 448–451.
- Reynolds, C.S. Cyanobacterial water blooms. In *Advances in Botanical Research*; Callow, J.A., Ed., Academic Press, London, 1987.
- 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.
- Reynolds, C.S., Morison, H.R., Butterwick, C. 1982. The sedimentary flux of phytoplankton in the south basin of Windermere. *Limnol. Oceanogr.* 27, 1162–1175.
- Reynolds, C.S., Walsby, A.E. 1975. Water-blooms. *Biol. Rev.* 50, 437–481.
- Reynolds, C.S., Wiseman, S.W. 1982. Sinking losses of phytoplankton in closed limnetic ecosystems. *J. Plank. Res.* 4, 489–522.
- Rhodes, K., Hubbs, C. 1992. Recovery of the Pecos River fishes from a red tide fish kill. *The Southwestern Naturalist.* 37, 178–187.
- Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. App. Phycol.* 6, 159–176.
- Romanowska-Duda, Z., Tarczyńska, M. 2002. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environ. Toxicol.* 17, 434–440.
- Rounge, T.B., Rohrlack, T., Nederbragt, A.J., Kristensen, T., Jakobsen, K.S. 2009. A genome-wide analysis nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrix rubescens* strain. *BMC Genomics.* 10,.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kaplowitz, N. 1995. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 264–272.
- Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Ge, J.L., Lu, S.C. 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 235–241.

- Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Lu, S.C., Ge, J.L. 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.
- Runnegar, M.T., Lu, S.C. 1994. The role of glutathione (GSH) in the hepatotoxicity caused by the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin (CY). *FASEB. J.* 8, A419–A419.
- Saker, M.L., Eaglesham, G.K. 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quandricarinatus*. *Toxicon.* 37, 1065–1077.
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Vasconcelos, V.M. 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon.* 43, 185–194.
- Saker, M.L., Neilan, B.A. 2001 Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* from northern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1839–1845.
- Saqrane, S., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V. 2008. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Health. B.* 43, 443–451.
- Saqrane, S., El ghazali, I., Ouahid, Y., El Hassni, M., El Hadrami, I., Bouarab, L., del Campo, F.F., Oudra, B., Vasconcelos, V. 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.* 83, 284–294.
- Saqrane, S., Oudra, B. 2009. CyanoHAB occurrence and water irrigation cyanotoxin contamination: Ecological impacts and potential health risks. *Toxins.* 1, 113–122.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E., Kaplan, A. 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ. Microbiol.* 9, 965–970.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 16, 413–421.
- 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.
- Schmidt, A., Erdle, I., Kost, H.-P. 1982. Changes of C-phycocyanin in *Synechococcus* 6301 in relation to growth on various sulfur compounds. *Z. Naturforsch. C.* 37, 870–876.
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marin III, R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van Dolah, F.M. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature.* 430, 80–84.
- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 383–406.

- Sergeev, V.N., Gerasimenko, L.M., Zavarzin, G.A. 2002. The proterozoic history and present state of cyanobacteria. *Microbiology*. 71, 623–637.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ. Microbiol.* 10, 2476–2483.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Peleato, M.L., Fillat, M.F. 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*. 19, 1167–1173.
- Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R., Kaplan, A. 2002. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 87–91.
- Shalev-Malul, G., Lieman-Hurwitz, J., Viner-Mozzini, Y., Sukenik, A., Gaathon, A., Lebendiker, M., Kaplan, A. 2008. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environ. Microbiol.* 10, 988–999.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore, M.R. 1999. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 14, 167–177.
- Shen, X.Y., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Wickramasinghe, W. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon*. 40, 1499–1501.
- Shilo, M. 1967. Formation and mode of action of algal toxins. *Bacteriol. Rev.* 31, 180–193.
- Shilo, M. Toxins of Chrysophyceae. In *Microbial Toxins. Algal and Fungal Toxins*, Vol. 7; Kadis, S., Ciegler, A., Ajl, S.J., Eds., Academic Press, New York, 1971.
- Shilo, M., Aschner, M. 1953. Factors governing the toxicity of cultures containing phytoflagellate *Prymnesium parvum* Carter. *J. Gen. Microbiol.* 8, 333–343.
- Shilo, M., Sarig, S. *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. Franklin Book Co., Inc., Elkins Park, Pennsylvania, USA, 1989.
- Shilo, M., Shilo, M. 1953. Conditions which determine the efficiency of ammonium sulphate in the control of *Prymnesium parvum* in fish breeding ponds. *Appl. Microbiol.* 1, 330–333.
- Silva, P., Vasconcelos, V. 2010. Allelopathic effect of *Cylindrospermopsis raciborskii* extracts on the germination and growth of several plant species. *Chem. Ecol.* 26, 263–271.
- Simonsen, S., Moestrup, O. 1997. Toxicity tests in eight species of Chrysochromulina (Haptophyta). *Can. J. Bot.* 75, 129–136.
- Singh, D.P., Tyagi, M.B., Kumar, A., Thakur, J.K., Kumar, A. 2001. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 15–22.
- Singh, R.N. 1962. Seasonal variants of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. *Hydrobiologia*. 20, 87–91.

- Sire'n, H., Jussila, M., Liu, H., Peltoniemi, S., Sivonen, K., Riekkola, M. 1999. Separation, purity testing and identification of cyanobacterial hepatotoxins with capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 839, 203–215.
- Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on the growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2658–2666.
- Sivonen, K., Namikoshi, M., Luukkainen, R., Fardig, M., Rouhiainen, L., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., Niemela, S.I., Variation of cyanobacterial hepatotoxins in Finnland. In *The contaminants in the Nordic ecosystem: dynamics, processes and fate. Ecovision World Monograph Series; Munawar, M., Luotola, M., Eds., SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, 1995.*
- Sivonen, K., Niemelä, S.I., Niemi, R.M., Lepistö, L., Louma, T.H., Räsänen, L.A. 1990. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia.* 190, 267–275.
- Sivonen, K., Skulberg, O.M., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L. 1992. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. *Toxicon.* 30, 1465–1471.
- Skulberg, O.M. 1994. Toxic waterblooms with cyanophytes in Norway-current knowledge. *Algological Studies.* 75, 279–289.
- Skulberg, O.M. Terrestrial and limnic algae and cyanobacteria. In *A Catalogue of Svalbard Plants, fungi, Algae und Cyanobacteria; Elvebakk, A., Prestrud, P., Eds., Norsk Polarinstitut Skrifter, 1996.*
- Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A., Skulberg, R. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water; Falconer, I.R., Ed., Academic Press, London, 1993.*
- Skulberg, O.M., Codd, G.A., Carmichael, W.W. 1984. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *AMBIO* 13, 244–247.
- Snider, B.B., Harvey, T.C. 1995. Synthesis of a bicyclic model for the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. *Tetrahedron Lett.* 36, 4587–4590.
- Snider, B.B., Xie, C.Y. 1998. Model studies for the synthesis of the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. Preparation of a bicyclic guanidine with the hydroxymethyluracil side chain. *Tetrahedron Lett.* 39, 7021–7024.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Alley, R.B., Berntsen, T., Bindoff, N.L., Chen, Z., Chidthaisong, A., Gregory, J.M., Hegerl, G.C., Heimann, M., Hewitson, B., Hoskins, B.J., Joos, F., Jouzel, J., Kattsov, V., Lohmann, U., Matsuno, T., Molina, M., Nicholls, N., Overpeck, J., Raga, G., Ramaswamy, V., Ren, J., Rusticucci, M., Somerville, R., Stocker, T.F., Whetton, P., Wood, R.A., Wratt, D.,: Technical Summary. In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007.*

- Sosa, S., Del Bavello, G., De Bortoli, M., Vita, F., Soranzo, M.R., Beltramo, D., Ardizzone, M., Tubaro, A. 2009. Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicol. Lett.* 191, 253–259.
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A., Vásquez, M. 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon*. 56, 1350–1361.
- Stanier, R.Y., Cohen-Bazire, G. 1977. Phototrophic procaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 225–274.
- Starmach, K. Chrysophyceae und Haptophyceae. In Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 1; Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, G.H., Mollenhauer, D., Eds., Gustav Fischer Verlag, New York, 1985.
- Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health — a review. *Environ. Health. Glob. Access Sci. Source*. 5, 7.
- Stoecker, D.K. 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 397–401.
- Strichartz, G., Rando, T., Hall, S., Gitschier, J., Hall, L., Magnani, B., Bay, C.H. 1986. On the mechanism by which saxitoxin binds to and blocks sodium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 479, 96–112.
- Stucken, K. Physiogenomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis brookii* with emphasis on cyanobacterial evolution, nitrogen control and toxin biosynthesis. In Faculty of Biology and Chemistry. (PhD Thesis); University of Bremen, Bremen, Germany, 2010.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., Vásquez, M., Glöckner, G. 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS One*. 5, e9235.
- Stuken, A., Jakobsen, K.S. 2010. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organisation and recombination. *Microbiology*. 156, 2438–2451.
- Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu Y., Day, J.G. 2002. Taxonomic revision of water bloom-forming species of oscillatoroid cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1577–1595.
- Takamura, N., Yasuno, M., Sugahara, K. 1984. Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kutz in a shallow lake. *J. Plank. Res.* 6, 1019–1029.
- Taniyama, S., Mahmud, Y., Terada, M., Takatani, T. 2002. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J. Nat. Toxins*. 11, 277–282.
- Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M., Yasumoto, T. 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*. 28, 1095–1104.
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E., Watanabe, M. 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice

- induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*. 32, 833–843.
- Thomas, R.H., Walsby, A.E. 1985. Buoyancy regulation in a strain of *Microcystis*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 799–809.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A. 2000. Structural organization of microcystin of biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7, 753–764.
- Tillmann, U. 1998. Phagotrophy by a plastidic haptophyte, *Prymnesium patelliferum*. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 155–160.
- Tillmann, U. 2003. Kill and eat your predator: a winning strategy of the planktonic flagellate *Prymnesium parvum*. *Aquat. Microb. Ecol.* 32, 73–84.
- Tomas, C.R., Glass, J., Ralph, J., Lewitus, A. Blooms of the ichthyotoxic flagellate *Prymnesium parvum* in U.S. waters: an emerging or a perennial problem? In *Harmful algae 2002. Proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae*; Steidinger, K., Landsberg, J., Tomas, C., Vargo, G., Eds., Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, 2002.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P.M., Huisman, J. 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Microb. Ecol.* 46, 117–123.
- Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O., Wiedner, C., Mur, L.R., Huisman, J. 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5177–5181.
- Törökné, K.A., László, E., Chorus, I., Fastner, J., Heinze, R., Padisák, J., Barbosa, F.A.R. 2000. Különböző országokból származó cianobaktérium populációk toxicitása. *Hidrológiai Közlöny*. 80, 350–351.
- Törökné, K.A., Mayer, G. 1988. Toxikus cianobaktériumok hazai felszíni vizekben. *Hidrobiológiai Közlöny*. 68, 49–54.
- Törökné, K.A., Pálovics, Á., László, E., Nagy, G. 2001. Különböző rekreációs felszíni vizekből gyűjtött cianobaktériumok (kéalgák) allergizáló hatásának vizsgálata. *Hidrológiai Közlöny* 81, 495–496.
- Trimbee, A.M., Harris, G.P. 1984. Phytoplankton population-dynamics of a small reservoir – use of sedimentation traps to quantify the loss of diatoms and recruitment of bloom-forming Blue-Green Algae. *J. Plank. Res.* 6, 897–918.
- Trimbee, A.M., Prepas, E.E. 1987. Evaluation of total phosphorous as a predictor of the relative biomass of Blue-Green Algae with emphasis on Alberta Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1337–1342.
- 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.
- Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M., Yasumoto, T. 2003. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon*. 41, 783–792.

- Ulitzer, S., Shilo, M. 1966. Mode of action of *Prymnesium parvum* ichthyotoxin. J. protozool. 13, 332–336.
- Utkilen, H., Gjølme, N. 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 797–800.
- Valério, E., Pereira, P., Saker, M.L., Franca, S., Tenreiro, R. 2005. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. Harmful Algae. 4, 1044–1052.
- Van de Waal, D.B., Verspagen, J.M., Finke, J.F., Vournazou, V., Immers, A.K., Kardinaal, W.E., Tonk, L., Becker, S., Van Donk, E., Visser, P.M., Huisman, J. 2011. Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO₂. ISME J. 5, 1438–1450.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- Van Dolah, F.M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environ. Health Perspect. 133–141.
- Van Dolah, F.M. Effects of harmful algal blooms. In Marine mammal research: conservation beyond crisis; Reynolds III, J.E., Perrin, W.F., Reeves, R.R., Montgomery, S., Ragen, T.J., Eds., Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 2005.
- Van Dolah, F.M., Ramsdell, J.S. 2001. Review and assessment of in vitro detection methods for algal toxins. J. AOAC Int. 84, 1617–1625.
- Van Gremberghe, I., Vanormelingen, P., van der Gucht, K., Mancheva, A., D'Hondt, S., de Meester, L., Vyverman, W. 2009. Influence of *Daphnia* infochemicals on functional traits of *Microcystis* strains (cyanobacteria). Hydrobiologia. 635, 147–155.
- Vasas, G., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Molnár, E., Grigorszky, I., Borbély, Gy. 2000. Cianotoxinok kimutatása mustár csiranövény-teszttel (BGST) *Cylindrospermopsis raciborskii* cianobaktériumból. Hidrológiai Közlöny. 80, 380–382.
- Velkov, T., Lawen, A. 2003. Mapping and molecular modelling of S-adenosyl-L-methionine binding site in N-methyltransferase domains of the multifunctional polypeptide cyclosporin synthase. J. Biol. Chem. 278, 1137–1148.
- Vézic, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. Microb. Ecol. 43, 443–454.
- Vierstra, R.D. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. Plant Mol. Biol. 32, 275–302.
- Vining, L.C. 1990. Functions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol. 44, 395–427.
- Vining, L.C. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity—A review. Gene. 115, 135–140.
- Visser, P.M., Ibelings, B.W., Mur, L.R. 1995. Autumnal sedimentation of *Microcystis* spp as result of an increase in carbohydrate ballast at reduced temperature. J. Plank. Res. 17, 919–933.
- Wagner, C., Adrian, R. 2009. Cyanobacteria dominance: quantifying the effects of climate change. Limnol. Oceanogr. 54, 2460–2468.
- Walsby, A.E. 1994. Gas vesicles. Microbiol. Rev. 58, 94–144.

- Walsby, A.E., Avery, A., Schanz, F. 1998. The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zürich, Switzerland. J. Plankton Res. 20, 1357–1375.
- Walsby, A.E., Hayes, P.K., Boje, R., Stal, L.J. 1997. The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. New Phytol. 136, 407–417.
- Walsby, A.E., Schanz, F. 2002. Light-dependent growth rate determines changes in the population of *Planktothrix rubescens* over the annual cycle in Lake Zürich, Switzerland. New Phytol. 154, 671–687.
- Wang, D.Z. 2008. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. Mar. Drugs. 6, 349–371.
- Wang, J., Liu, B., Guo, N., Xie, P. 2006. Alkaline phosphatase activity in four *Microcystis aeruginosa* species and their responses to nonylphenol stress. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76, 999–1006.
- Wanner, G., Henkelmann, G., Schmidt, A., Köst, H.P. 1986. Nitrogen and sulfur Starvation of cyanobacterium *Synechococcus* 6301. An ultrastructural, morphometrical and biochemical comparison. Z. Naturforsch. C. 41, 741–750.
- Ward, C.J., Codd, G.A. 1999. Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. J. Appl. Microbiol. 86, 874–882.
- Watanabe, M.M., Kaya, K., Takamura, N. 1992. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (Cyanobacteria) in a hypertrophic lake. J. Phycol. 28, 761–767.
- Wattenberg, E.V. 2007. Palytoxin: Exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292, C24–C32.
- Weber, B., Wessels, D.C.J., Büdel, B. 1996. Biology and ecology of cryptoendolithic cyanobacteria of a sandstone outcrop in the northern Province, South Africa. Algological Studies. 83, 565–579.
- Weiss, J., Liebert, H-P., Braune, W. 2000. Influence of microcystin-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor* L. J. Appl. Bot. 74, 100–105.
- 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., Fastner, J., Erhard, M., von Döhren, H. 2002. Application of MALDI-TOF MS in cyanotoxin research. Environ. Toxicol. 17, 367–374.
- Welker, M., von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiol. Rev. 30, 530–563.
- White, J.D., Hansen, J.D. 2000. Approach to the total synthesis of cylindrospermopsin. Abstr. Pap. Am. Chem. S. 219, 812-ORGN Part 2.
- White, J.D., Hansen, J.D. 2005. Total synthesis of (-)-7-epicylindrospermopsin, a toxic metabolite of the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*, and assignment of its absolute configuration. J. Org. Chem. 70, 1963–1977.

- Whitton, B.A. Diversity ecology and taxonomy of cyanobacteria. In Photosynthetic Prokaryotes; Mann, N.H., Carr, N.G., Eds., Plenum Press, New York, 1992.
- Whitton, B.A. Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Springer, New York, 2012.
- Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S., Carmeli, S. 2002. Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. Environ. Toxicol. 17, 400–406.
- Wiese, M., D’Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A. 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. Mar. Drugs. 20, 2185–2211.
- Wilken, S., Wiezer, S., Huisman, J., van Donk, E. 2010. Microcystins do not provide anti-herbivore defence against mixotrophic flagellates. Aquat. Microb. Ecol. 59, 207–216.
- Xie, C.Y., Runnegar, M.T.C., Snider, B.B. 2000. Total synthesis of (+/-)-cylindrospermopsin. J. Am. Chem. Soc. 122, 5017–5024.
- Yamasaki, S. 1993. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. J. Plant. Res. 106, 113–120.
- Yariv, J., Hestrin, S. 1961. Toxicity of the extracellular phase of *Prymnesium parvum* cultures. J. Gen. Microbiol. 24, 165–175.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxin. Tetrahedron. 41, 1019–1025.
- Yi, D., Yijun, Z., Xue, B., Zhihui, F., Kai, C. 2009. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on *Lemna minor* and *Myriophyllum spicatum* phyto-tolerance and superoxide dismutase activity. Environ. Toxicol. 24, 304–308.
- Yin, L., Huang, J., Huang, W., Li, D., Liu, Y. 2005c. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. Toxicon. 46, 859–864.
- Yin, L., Huang, J., Li, D., Liu, Y. 2005a. Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.) Harms. Environ. Toxicol. 20, 308–313.
- Yin, L.Y., Huang, J.Q., Huang, W.M., Li, D.H., Wang, G.H., Liu, Y.D. 2005b. Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. Toxicon. 46, 507–512.
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Ichihara, A., Carmichael, W.W., Fujiki, H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116, 609–614.
- Yunes, J.S., De La Rocha, S., Giroldo, D., Silveira, S.B.d., Comin, R., Bicho, M.d.S., Melcher, S.S., Sant’anna, C.L., Vieira, A.A.H. 2009. Release of carbohydrate and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. J. Phycol. 45, 585–591.
- Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M. 2006. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut. 611, 25–33.
- Zegura, B., Lah, T.T., Metka, F. 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. Toxicol. 200, 59–68.

- Žegura, B., Sedmak, B., Filipič, M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*. 41, 41–48.
- Zhang, L., Xu, Q., Xing, D., Gao, C., Xiong, H. 2009. Real-time detection of caspase-3-like proteases activation *in vivo* using fluorescence resonance energy transfer during plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Plant Physiol.* 150, 1773–1783.
- Zhang, Z., Zhang, X.X., Qin, W., Xu, L., Wang, T., Cheng, S., Yang, L. 2012. Effects of microcystin-LR exposure on matrix metalloproteinase-2/-9 expression and cancer cell migration. *Ecotox. Environ. Safety*. 77, 88–93.
- Zilliges, Y., Kehr, J.-C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., Kaplan, A., Börner, T., Dittmann, E. 2011. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS One*. 6, e17615.
- Zilliges, Y., Kehr, J.C., Mikkat, S., Bouchier, C., de Marsac, N.T., Börner, T., Dittmann, E. 2008. An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J. Bacteriol.* 190, 2871–2879.
- Zingone, A., Enevoldsen, H. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast. Manage.* 43, 725–748.