

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT
NÖVÉNYBIOLÓGIAI INTÉZET

A *Microcystis aeruginosa* toxintermelése

Kós Péter



Doktori értekezés

1995.

Rövidítések jegyzéke

ADDA	3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav
AE	A bszorbancia e gység
BGSD	cianobaktérium gyűjtemény (B lue- G reen collection of S zeged and D ebrecen)
Dha	d ehidro a lanin
G6PDH	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
HPLC	nagynyomású folyadék kromatográfia (H igh P erformance L iquid C hromatography)
IC ₅₀	Az 50 %-os (növekedés) gátlást kiváltó koncentráció (50 % I nhibitory C oncentration)
LD ₅₀	Az 50 %-os halálozást kiváltó dózis (50 % L ethal D ose)
MC-LR	M ikrocisztin- LR
Mdha, MeΔAla	N- m etil- d ehidro- a lanin
MeΔAbu	α-(metilamino)-dehidro-butirilsav
rpm	percenkénti fordulatszám (R evolutions p er m inute)
DTT	D ithiothreitol, <i>threo</i> -1,4-dimerkapto-2,3-butándiol
TRIS	t ris(hidroximetil)aminometán, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol
SDS	Nátrium laurilszulfát
TMS	t etra- m etil- s zilán
TFA	trifluór ecetsav

1. A bevezetés és a célkitűzés

Vörös tajték a tengerpartokon, az élénkzöld tavak és folyók: romló környezetünk mind gyakoribb kísérői. Az élővizeinkben elszaporodó algák és baktériumok olykor az emberek és a parti élővilág mérgezésével járnak együtt, sokszor betegségeket és gazdasági károkat is maguk után vonva. A cianobaktériumok között is találhatók emberre veszélyes, toxikus fajok. Ezek, és közöttük első helyen a *Microcystis aeruginosa*, világszerte mind gyakrabban súlyos mérgezéseket okoznak. Ez szükségessé teszi a probléma tudományos vizsgálatát.

A toxintermelés önmagában is érdekes jelenség, és bár a toxinok kémiai szerkezetét, biológiai és biokémiai hatásmechanizmusát világszerte tanulmányozzák, a termelésüket szabályzó külső és belső tényezőkről még szinte semmit sem tudunk. Ugyanígy nem ismerjük a toxintermelés "célját", vagyis azokat az esetleges előnyöket, amelyekhez ennek során juthat az adott szervezet ill. faj.

Célul tűztük ki, hogy a Magyarországon izolált, cianotoxint termelő *Microcystis aeruginosa* nevű cianobaktérium fajból kivonjuk, tisztítsuk és azonosítsuk a toxint, majd vizsgáljuk meg, hogy milyen hatással van (lehet) a toxin a vízi életközösség tagjaira, ökológiai szempontból, vagyis más szervezetekkel való egymásra hatás során ennek termelése előnyt jelent-e a cianobaktérium faj számára.

Általánosan elfogadott, hogy a mérgező esetek megelőzését célzó, valamint a kutatás során alkalmazandó toxikológiai vizsgálatokhoz leggyakrabban egereket használnak, ami a kísérleti állatok szenvedésével, majd végül az eredménytől függetlenül azok pusztulásával járnak együtt. Ugyanakkor e tesztekől nem lehet eltekinteni, hiszen ezek a mikrobák elszaporodásukkal komoly veszélyt jelentenek a velük kapcsolatba kerülő emberekre és állatokra egyaránt. Célul tűztük ki egy, az egértesztnél humánusabb, de nem kevésbé megbízható, széles körben alkalmazható cianotoxin vizsgálati módszer kidolgozását is.

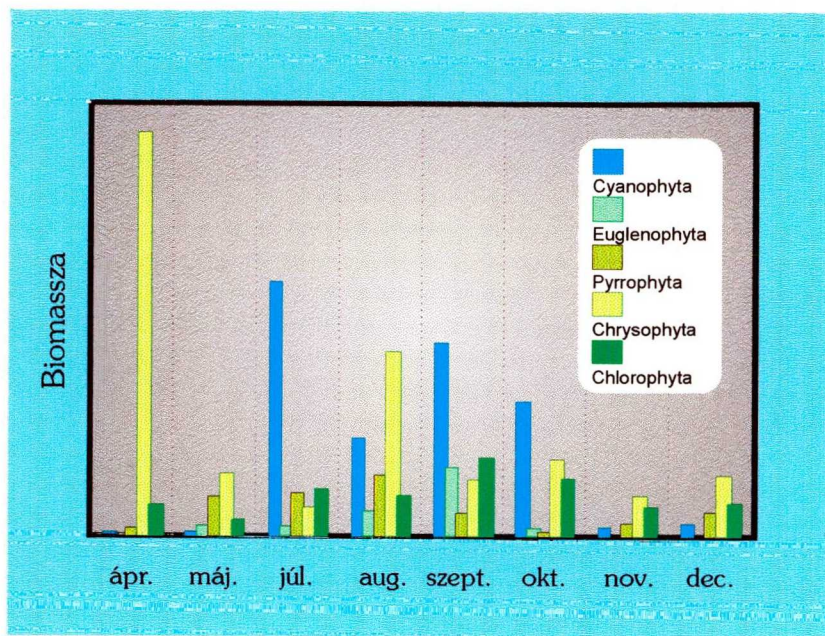
2. Irodalmi áttekintés

2.1. *A vízvirágzásokat okozó cianobaktériumok és toxinjaik*

2.1.1. A toxikus vízvirágzások

Környezetünk egyre romló minősége századunk végének egyik égető problémája. Az utóbbi években, évtizedekben egyre gyakrabban kerülnek a figyelem középpontjába olyan esetek, amikor az egyes természetes, vagy mesterséges felszíni vizek fogyasztásra alkalmatlanná válnak, higiénés gondokat okoznak a lakosságnak, vagy még súlyosabb esetben életveszélyt jelentenek az ember, a vízi, illetve vízparti állatok, a vadon élő és a háziállatok számára. Az említett esetek között, a folyókba, tengerekbe jutott kőolajszármazékok, vagy gyári hulladékok által okozott szennyezések mellett, egyre több gondot okoznak azok, amelyeket valamely planktonalkotó szervezet elszaporodása eredményez. Leggyakrabban nem új fajok megjelenéséről van szó, hanem arról, hogy egyes környezeti feltételek megváltozása miatt bizonyos organizmusok a szokásosnál jobban elszaporodhatnak.

Ez különösen a sekély tavakban, vizekben gyakori, ahol a víz hőmérséklete a tengerekénél sokkal inkább követi az évszakok váltakozását. A változó hőmérséklet, a rendelkezésre álló oxigén-, tápanyag- és nyomelem koncentráció, pH és fénymennyiség nem egyidőben kedvez a különböző mikroorganizmusok növekedésének, így időben változik a plankton mennyisége és a planktonalkotók megoszlása is (1. ábra). Ezek azután egymásra is hatnak az általuk termelt anyagokkal, illetve az oxigén, a tápanyag, vagy a fény mennyiségét csökkentve stb. Hasonló jelenség a tengerekben is megfigyelhető, legnagyobb mértékben a parti szakaszokon, az öblökben és a folyók torkolatánál (1).



1. ábra A fitoplankton megoszlása a Balatonban 1976-ban (1)

A mikroorganizmusok mennyiségének és megoszlásának ez a váltakozása természetes jelenség, és csupán egyes fajok nagy tömegű elszaporodása okoz problémát, különösen olyan esetben, ha ezek magasabb rendű élőlényekre, így elsősorban az emberre veszélyes anyagokat termelnek. Ilyen anyagokat, toxinokat, igen változatos, egymástól evolúciósan akár nagyon távoli szervezetek is termelhetnek. A különböző rendszertani törzsekbe tartozó, de még az egy adott törzsön belüli különböző fajok által termelt toxikus anyagok kémiai szerkezetük és biológiai hatásmechanizmusuk tekintetében jelentősen különbözhetnek egymástól. Ezen változatosság szemléltetésére álljon itt néhány kiragadott példa (2):

A zöldalgák (Chlorophyta) némelyike ehető. Ilyenek pl. a Fülöp-szigeteken kedvelt egyes *Caulerpa* fajok, azonban ezek az esős évszakban mérgezővé válnak. A mérgezés tünetei néhány órán át tartó zsibbadás és hideg érzet a végtagokban, gyors és nehézkes légzés, depresszió és egyensúly veszteség. E tünetek okozói hosszú telített szénláncú hidroxil-amidok (kaulerpicin), és egy pirazin-származék (kaulerpin).

A *Prymnesium parvum* nevű sárgásmoszat (Chrysophyta) Észak-Európától a Közel-Keletig súlyos halpusztulásokat okozott. Csak a kopoltyúval lélegző állatokra (halakra és a kétéltűek még kopoltyúval lélegező lárváira) jelent veszélyt. Hatféle toxint mutattak ki benne, ezek glikolipidek és lipoprotein-szénhidrát molekulák.

A barázdásmoszat (Pyrrophyta) *Nocticula miliaris* Japán partjainál gyakran olyan tömegben jelenik meg, hogy több négyzetkilométeres területen pirosra festi a vizet, és jelentős pusztulást okoz a halak, valamint gerinctelenek között. Kimutatták, hogy a mérgező anyag az ammónia, ami az alga tömegének akár 7 %-át is kiteheti.

Vörösmoszatokból (Rhodophyta) anionos poliszacharidokat izoláltak, amelyek galaktóz és származékainak váltakozó polimerei. Ezek rendkívül sokféle fiziológiai hatást fejthetnek ki emlősökre, így gyulladásokat, makrofágokra gyakorolt szelektív toxicitást, erős immunszuppressziót és tumor képződést okozhatnak.

A sekély, édesvízi tavakban az eutrofizálódás következtében évről évre mind gyakrabban következik be az algák túlszaporodása. Ilyenkor a tó vize zavaros lesz, kékes-zöld, zöld, vöröses vagy sötétbarna színűvé válik (3,4). Ezt a jelenséget nevezzük **vízvirágzásnak**. A jelenség általános velejárója, hogy a víz felszínén a mikroorganizmusok akár több centiméter vastag tömör réteget alkotva felhalmozódnak, majd esetenként az áramlások és a szél hatására a parton nagy mennyiségben összegyűlnek.

A vízvirágzásokat kiváltó tényezők között minden bizonnyal első helyen szerepel a környezetszennyezés, az élővizekbe juttatott nagy mennyiségű műtrágya és egyéb, a trofitást növelő anyag. Azonban a kérdés ennél összetettebb, hiszen a világ szinte minden táján előfordulnak vízvirágzások, nem kizárólag a mezőgazdaságilag művelt területekkel övezett, vagy sűrűn lakott, és így a civilizációs szennyezésnek kitett vidékeken. Ráadásul a jelenség nem is újkeletű, ugyanis vízvirágzásokra vonatkozó adatok, utalások a mai típusú és mértékű környezetszennyezést messze megelőző időkben is ismeretesek. Ilyen pl. egy utazó beszámolója 1188-ból, ami a walesi Llangorse tó különös viselkedését írja le. Ez mai szemmel egy jellegzetes vízvirágzásnak tűnik (5). Maga a vízvirágzás (*flos-aquae*) sem új megnevezés, már Linné alkalmazta ezt a kifejezést egyes kéalgák (cianobaktériumok) nevének megalkotásakor.

Magyarországon is számos esetben előfordultak toxikus vízvirágzások (6,7). Ezek közül a Velencei-tavon 1991 augusztusában bekövetkezett eset az egyik legismertebb. A sajtóban több cikk jelent meg ezzel kapcsolatban, és óvintézkedéseket kellett életbe léptetni a mérgezések megelőzése érdekében.

A vízvirágzások túlnyomó többségét cianobaktériumok okozzák. A cianobaktériumok (kéalgák, Cyanophyta, Cyanoprokariobionta) prokarióta, oxigénfejlesztő fotoszintetikus rendszerrel rendelkező, jobbra obligát fotoautotróf mikroorganizmusok. Rendszertani helyüket, néhány morfológiai és biokémiai sajátosságukat az 2.2. fejezetben tárgyaljuk kissé részletesebben.

2.1.2. A toxikus cianobaktériumok

A toxikus cianobaktérium fajokat tartalmazó vízvirágzásokban a mérgezéseket elősegíti, hogy a toxint termelő sejtek nem egyenletesen oszlanak meg a víz teljes térfogatában, hanem gyakran a felszínen gyűlnek össze nagy tömegben. A szóban forgó cianobaktériumok többsége ugyanis gázvakuolumokkal rendelkezik, amivel faj súlyuk szabályozására képesek. Az eddig tanulmányozott összes közepes hőigényű gázvakuolumos cianobaktériumnak van toxikus izolátuma. A két tulajdonság között azonban nincs szoros összefüggés, minthogy vannak gázvakuolummal rendelkező, de nem

toxikus izolátumok, és ismert néhány gázvakuolummal nem rendelkező, de toxikus faj is (8).

A legtöbb európai országban jeleztek már toxikus vízvirágzásokat, és vannak adatok Észak- és Dél-Amerikából, Ausztráliából, Ázsiából és Afrikából is. A nyolcvanas években megvizsgált 381 európai eset alapján az egyes országokban a cianobakteriális vízvirágzások a 45-70 %-a (összesen több mint fele) volt toxikus (9), Minnesota államban egy hároméves periódusban 60 közül 49 (82 %) (10). Magyarországon is számos esetben regisztráltak toxikus vízvirágzást (6,7).

A cianobaktériumok mintegy 40 fajáról feltételezik, hogy toxint termel. Több esetben azonban nem állt rendelkezésre tiszta tenyészet így nem sikerült minden kétséget kizáróan bizonyítani, hogy nem a vízvirágzás valamely másik résztvevője, esetleg egy heterotróf baktérium volt felelős a toxintermelésért. Az már bizonyított, hogy a következő nemzetségekbe toxintermelő fajok is tartoznak: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Nodularia* és *Nostoc*. További mintegy kilenc nemzetséggel kapcsolatban feljegyeztek toxikus vízvirágzást, és több toxint tisztítottak is, de a fentiek értelmében még nem bizonyították hitelt érdemlően ezek cianobakteriális eredetét. További problémát okoz, hogy nem mindig sikerül egyszerű összefüggést találni az egyes vízvirágzások során egyazon tóban, de különböző időben, helyen, vagy mélységben vett minták cianobaktérium- és toxintartalma között sem (3,11,12).

2.1.3. A cianotoxinok típusai

A cianobaktériumok számos toxikus anyagot termelhetnek. Ezek között citotoxinokat is, amelyek egysejtűekre, algákra, baktériumokra ill. gerincesek sejtenyészeire hatnak, míg a többsejtűekre ártalmatlanok. A magasabbrendű szervezetekre ható cianotoxinokat kémiai szerkezetük és a toxicitás elsődleges hatóhelye szerint az alábbi három csoportba sorolhatjuk:

- lipopoliszacharidok

- alkaloid analógok; az idegsejtek működését, az idegingerület vezetését gátolják (neurotoxinok)
- peptidek; leggyorsabban a májsejtekre, májszövetekre fejtik ki hatásukat (hepatotoxinok)

2.1.3.1. A lipopoliszacharidok

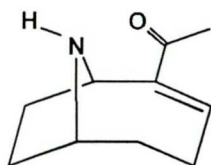
A vízvirágzások több mint felében a *Microcystis aeruginosa* a domináns cianobaktérium faj. E faj toxicitásának tanulmányozása során két különböző típusú toxint találtak (13). A kevésbé toxikus, lassabban (4-48 óra alatt) ható anyagot "lassan ölő faktornak" (Slow Death Faktor, SDF), az erősebben mérgezőt, amelyik egyben gyorsabban (1-3 óra alatt) is hatott, "gyorsan ölő faktornak" (Fast Death Faktor, FDF) nevezték el. Az SDF a későbbi vizsgálatok alapján lipopoliszacharidok (LPS) elegyének bizonyult.

A lipopoliszacharidok a Gram-negatív baktériumok jellegzetes anyagai, ezek a baktériumok sejtfalának alapvető összetevői (14). Magasabbrendű szervezetekre általában mérgező, erősen gyulladáskeltő anyagok, számos hormonális-, immun- és sejtfolyamatot aktiválhatnak. Meg kell jegyezni, hogy a vízvirágzások során a cianobaktériumok mellett számos más baktérium is elszaporodhat és termelhet LPS-okat. A *Microcystis*ből izolált LPS toxicitása nem túl jelentős más baktériumok hasonló komponenseihez és a FDF-hoz viszonyítva (15).

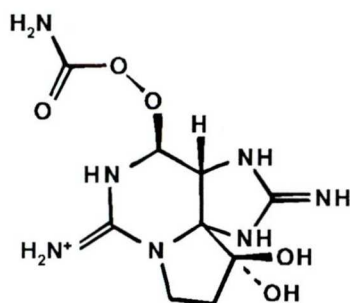
2.1.3.2. A neurotoxinok

Az *Anabaena flos-aquae* több esetben igen komoly mérgezést okozott. Vízvirágzásokban leggyakrabban a vízi madarakra és a kérődző állatokra jelent veszélyt. Vannak toxikus és nem toxikus izolátumai is, sőt úgy találták, hogy egy adott izolátum toxicitása is változhat a környezeti tényezők változtatásával (16).

Az e fajból izolált toxin laboratóriumi kísérletekben még a *Microcystis aeruginosa* FDF komponensénél is gyorsabban, néhány percen belül a kísérleti állatok halálát okozza, ezért eredetileg "nagyon gyorsan ölő faktornak" (Very Fast Death Factor, VFDF) nevezték el. A mérgezés tünetei: bénulás, remegés, hányás; a halál légzésbénulás következtében áll be. Fiziológiai szempontból e toxin posztzinaptikus neuro-



2. ábra Az anatoxin-a szerkezeti képlete



3. ábra A saxitoxin szerkezeti képlete

(16). Kis molekulatömege miatt a tápcsatornán keresztül is gyorsan felszívódik. Az újabban *anatoxin-a*-nak nevezett anyag kokain analóg; szerkezeti képletét a 2. ábra mutatja (17,18).

Egy másik jelentős cianobakteriális neurotoxint *Aphanizomenon flos-aque*-ből izoláltak. Régen ismert volt, hogy e faj a halakra és a szárazföldi állatokra egyaránt veszélyes vízvirágzást okozhat. Csak 1967-ben kezdték részletesen tanulmányozni, miután egy New Hampshire-i tóban több mint 6 tonna hal pusztulását okozta (19). Úgy találták, hogy e faj toxicitása is függhet a környezeti paraméterektől (20). A mérgezés tünetei az *Anabaena flos-aquae*-nél leírtakhoz hasonlóak. A gyors hatása miatt eredetileg szintén a VFDF-csoportba sorolták. E toxin membrán szinten ható neuromuszkuláris inhibítor, az ideg ingerület vezetését akadályozza meg (19). Kémiai szerkezetének meghatározásával kiderült, hogy azonos a *Gonyaulax catenella* nevű tengeri barázdásmoszat által termelt saxitoxinnal (3. ábra).

2.1.3.3. A hepatotoxinok

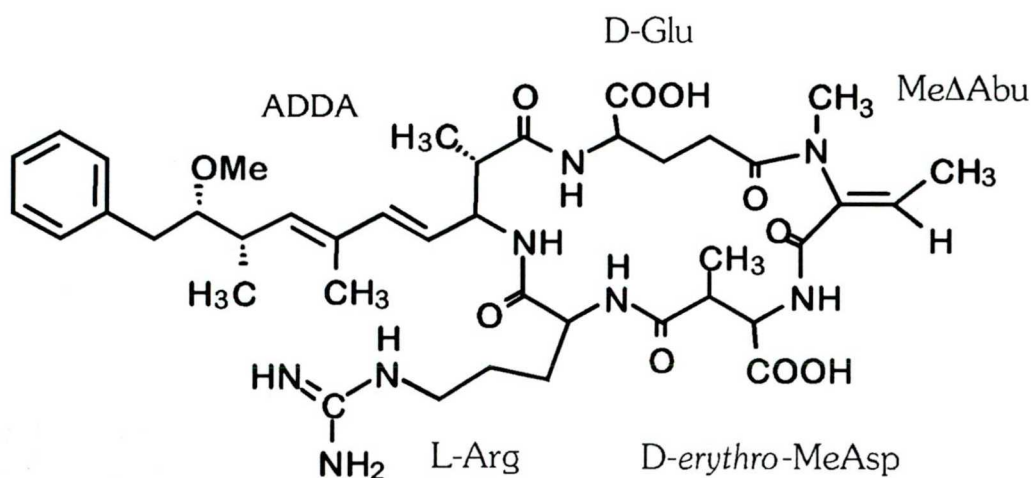
A hepatotoxikus vízvirágzásokkal kapcsolatos kárjelentések leggyakrabban tehenek, juhok és kutyák elhullásáról szólnak. Emberek mérgezésére is volt példa, de a betegek a legsúlyosabb esetben is felgyógyultak néhány napos kórházi kezelés után.

2.1.3.3. A hepatotoxinok

A hepatotoxikus vízvirágzásokkal kapcsolatos kárjelentések leggyakrabban tehenek, juhok és kutyák elhullásáról szólnak. Emberek mérgezésére is volt példa, de a betegek a legsúlyosabb esetben is felgyógyultak néhány napos kórházi kezelés után.

Hepatotoxinokat, vagy májtoxinokat számos cianobaktérium faj termel. E toxinok okozzák az édesvízi vízvirágzásokkal kapcsolatos környezeti problémák túlnyomó részét, így a mérgezéses esetek statisztikái alapján e toxinok a legjelentősebbek a vízvirágzásokban. Leggyakrabban *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* és *Nodularia* nemzetségek okoznak hepatotoxikus vízvirágzásokat. A mérgezés tünetei változatosak, ezek között bőrkiütéseket, szem- és bőrgyulladást, súlyosabb esetben fejfájást, gyengeséget, hányást, a végtagok kihűlését, hasmenést, nehéz légzést és néhány órán belül halált okozhatnak (21).

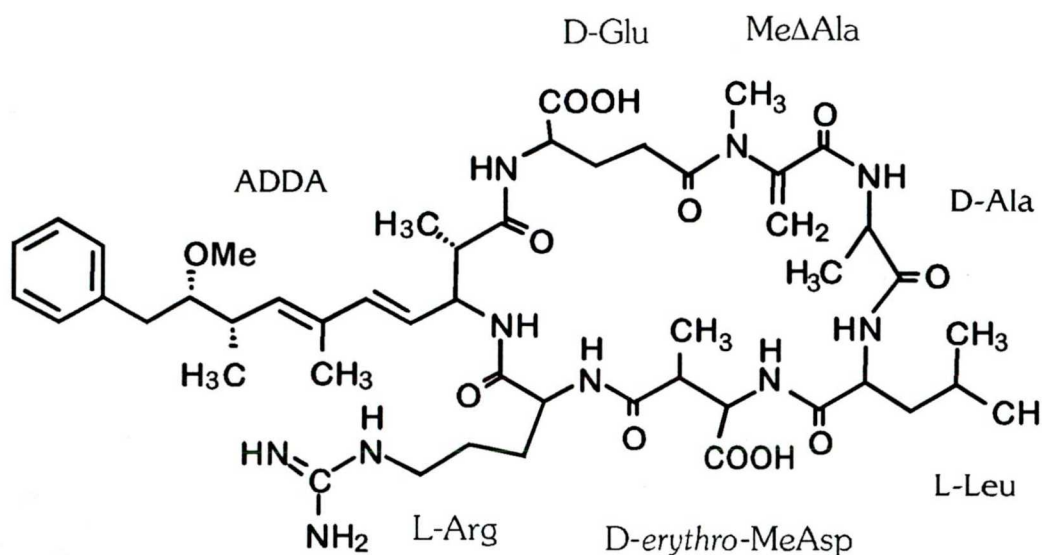
A hepatotoxinok, a kisebb jelentőségű és mérgezéseket csak ritkán okozó, *Cylindrospermopsis raciborskii*-ből izolált alkaloid típusú cylindrospermopsin (22) kivételével ciklikus peptidek: a *Nodularia spumigena* által termelt pentapeptid, a nodularin (4. ábra) és a *Microcystis aeruginosa*-ból izolálható heptapeptid, a mikrocisztin (5. ábra). Mindkét peptid tartalmaz rendhagyó aminosavakat, ezek közül a legkülönösebb a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deka-4,6-diénsav (ADDA). Ezt az aminosavat eddig kizárólag ezekben a toxinokban mutatták ki, de ezeknek állandó komponense, jelenléte a toxikus hatás egyik szükséges feltétele. A nodularinnak nem ismeretesek változatai, szerkezetének további érdekessége az N-metilált dehidrobutirin (MeΔAbu). A mikrocisztint alkotó hét aminosav közül kettő L-konfigurációjú az egyes izolátumokból tisztított toxinokban különbözhet. További különbség az egyes mikrocisztin változatok között a metilcsoport megléte vagy hiánya a D-eritro-β-metil-aszparaginsavon (MeAsp), ill. az N-metil-dehidroalaninon (MeΔAla). Az állandó aminosavaknak is előfordulhatnak módosított származékai (23). Az 5. ábrán látható mikrocisztin-LR a már eddig ismert mintegy 40 változat közül a leggyakoribb. A változatok közül egyazon sejten akár több is termelődhet, különböző koncentrációban. Az állandó aminosav



4. ábra A nodularin szerkezeti képlete

komponensek közül három (alanin, izo-aszparaginsav és izo-glutaminsav) a fehérjéket felépítő aminosavaktól eltérően **D**-konfigurációjú (24).

A mikrocisztin és nodularin az 1, ill. 2A típusú protein-foszfatázokat gátolják (25-28). A hidrofób oldalláncuk (ADDA) a savas központi magtól minél távolabb igyekszik elhelyezkedni, és a protein-foszfatáz enzimek hidrofób üregébe illeszkedik, ahol az olefin szerkezetnek lényeges szerepe van a receptor fehérjével való kapcsolat kialakításában (29). Ugyancsak a mikrocisztin—enzim kapcsolat kialakulásával függ össze, hogy a mikrocisztin gátolja az említett típusú protein-foszfatázok metilációját is (30). A glutaminsav savas COOH csoportja és a hidrogén híd kialakítására alkalmas CO csoportok az ADDA és Glu aminosavakban szintén szükségesek a biológiai hatás kiváltásában. A cianobakteriális hepatotoxinok élettani hatása azonos, csupán toxicitásuk mértéke különbözik. Az egyes mikrocisztin változatok toxicitásában mutatkozó különbségeknek az az oka, hogy a különböző oldalláncok egymástól többé-kevésbé eltérő térszerkezetet tesznek energetikailag kedvezményezetté, és így a kapcsolat kialakításához szükséges molekula részletek különböző mértékben hozzáférhetőek (31).



5. ábra A mikrocisztin-LR szerkezeti képlete

Számos sejtfolyamat szabályzásában a fehérjék foszforiláltsági szintjének lényeges szerepe van. Emiatt egy protein-foszfatáz enzim-inhibitor különféle rendszertani egységekbe tartozó szervezetekre változatos hatást fejthet ki, így toxikus lehet egyes alacsonyabb rendű állatokra is. Mégis, tekintettel arra, hogy e toxinok a magasabbrendű állatokra fokozottan veszélyesek, élettani hatásukat leggyakrabban egereken, tengerimalacokon, nyulakon és háziszárnyasokon stb. tanulmányozzák (7,32). Más protein-foszfatázok inhibitorokkal összehasonlítva szembeszökő a hepatotoxinok erős szövet- és szerv-specifitása. (33). A kísérleti állatok veséjében például, amely szerv nem akkumulálja a mikrocisztint, semmilyen elváltozás nem tapasztalható (26). A gerincesek mája akkumulálja a mikrocisztint. Halálos dózissal intraperitoniálisan kezelt egerek májában a foszfataáz aktivitás 15 perc alatt 44 %-ra, egy óra alatt 22 %-ra csökken (26). Számos folyamat sebessége megváltozik a hepatotoxinok hatására, pl. a hepatocita DNS-replikáció (34) és a lipidek peroxidációja; a sejtvez -SH tartalma lecsökken, a szérum enzimtartalma jelentősen növekszik (35). Valószínűleg e változások eredményeképpen a májsejtek mikroszómáiban megváltozik a membrán-fluiditás (36), a szövetek

elveszítik eredeti felépítésüket (35,37). A máj az eredeti méretének másfélszeresére duzzadhat, majd a szédülést, a vérnyomás csökkenését, a végtagok kihűlését és pilo-erekciót követően a keringés összeomlása miatt áll be a halál (38,39).

Kimutatták, hogy kisebb dózisokban, de hosszú időn keresztül adagolva tumor-promóter hatásuk van, azaz a rákos daganatok növekedését gyorsítják (40). Kína egyes részein különösen gyakoriak a toxikus vízvirágzások, és előfordulhat, hogy az ivóvíz hepatotoxinokat tartalmaz az akut megbetegedéshez szükséges dózisonál kisebb mennyiségben. Az utóbbi időben ezt összefüggésbe hozzák azzal a ténnyel, hogy az ottani lakosság körében az átlagosnál magasabb a májrákos megbetegedések gyakorisága (41).

2.2. *A cianobaktériumok*

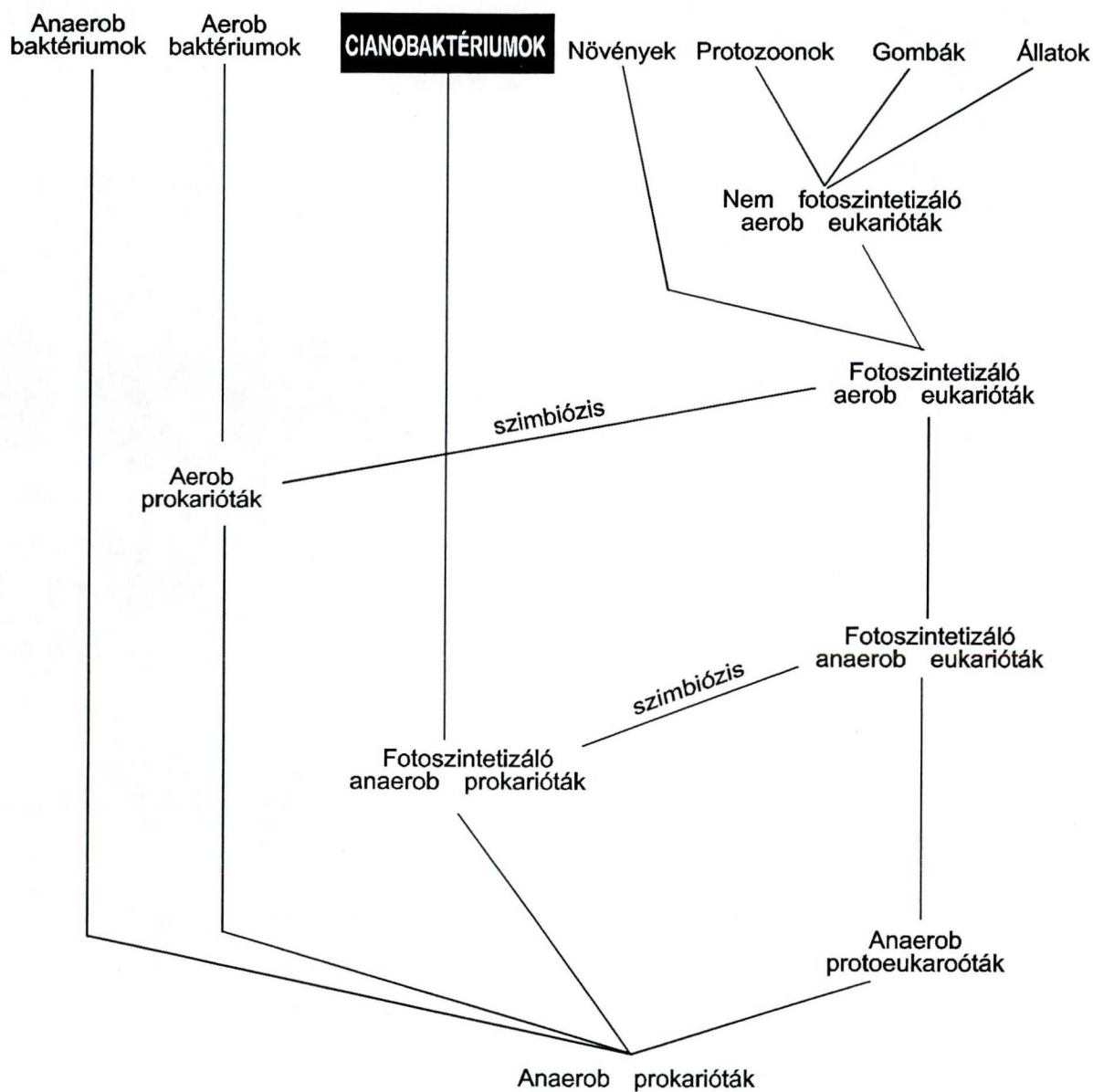
2.2.1. A cianobaktériumok megjelenése a Földön, az ökológiai jelentőségük

A cianobaktériumok ősi prokarióta szervezetek. A fosszilis leletek (sztromatolitok) tanúsága szerint kb. 3 milliárd évvel ezelőtt váltak gyakorivá. Oxigénfejlesztő fotoszintetikus tevékenységük révén megjelenésüknek alapvető jelentősége volt a Föld atmoszférájának kialakításában. Valószínű, hogy evolúciójuk a ma ismert, viszonylag gyors, főként szexuális reprodukción alapuló mindinkább specializálódó eukarióta törzsfajlódással ellentétes szabályok szerint halad, az egész Földön elterjedt igen hosszú élettartamú, nagy egyedszámú, stabil és százmillió éveken keresztül változatlan populációkat eredményezve (42). Ma az egész világon előfordulnak. Élőhelyeik a sarki jeges tengerektől a hőforrások akár 60 fokosnál is melegebb vizéig terjednek, az Arktisz és az Antarktisz fő nitrogénkötői, de az óceáni régiókban, édesvizekben, sivatagokban, homokdűnéken stb. is megtalálhatók. A cianobaktériumoknak, mint önálló biológiai csoportnak a felismerése ennek ellenére csak a XIX. század elején történt meg. A cianobaktériumok evolúciós helye sajátos (6. ábra). A közöttük és a baktériumok között meglévő lényeges hasonlóságokat alapul véve nevezzük őket cianobaktériumoknak a korábban alkalmazott, de prokarióta sejtszerveződésükre nem utaló kékalga

elnevezés helyett (43,44). Ám ez utóbbi elnevezésük továbbra is használatos, egyrészt megszokásból, másrészt azért, mert a hasonló ökológiai szerepük, életterük, megjelenésük és néhány más tulajdonságuk miatt olykor az algákkal együtt említik őket. Jellegzetes fotoszintézisük és biokémiai tulajdonságaik alapján könnyen elkülöníthetők a zöld- és a bíborbaktériumoktól (44,45) (ld. az 1. táblázatot).

A cianobaktériumok sok hasonlóságot mutatnak a magasabbrendű algák (főleg vörösmoszatok) és a növények kloroplasztiszaival (46-48). A citológiai és biokémiai hasonlóság a cianobaktériumok és a kloroplasztisz, mint eukarióta sejtorganelium szerveződése között (kloroplasztisz DNS, prokarióta típusú riboszómák, a klorofill-a jelenléte a fotoszintetizáló apparátusban) alátámasztja a hipotézist, mely szerint a mai kloroplasztisz az endoszimbiota cianobaktériumokból fejlődött ki az evolúció során (49,50).

Nagy hatásfokú fotoszintézisük a víz, széndioxid, nitrogén, foszfor és néhány egyéb ásványi anyag jelenlétén túl mást nem igényel (51,52).



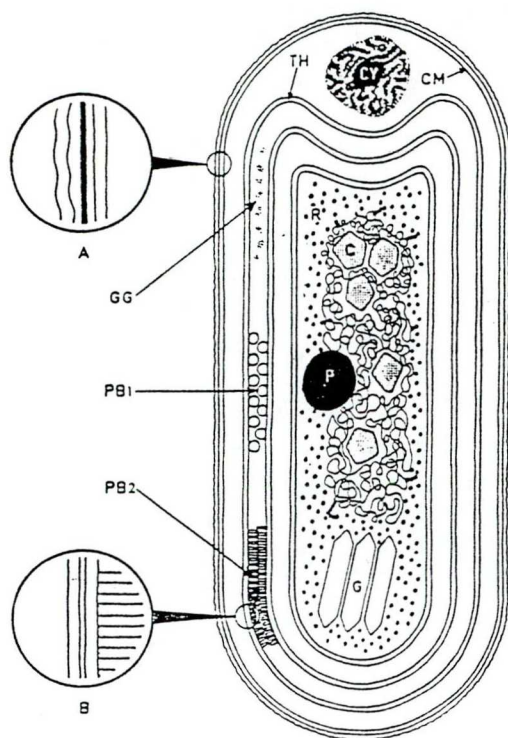
6. ábra A cianobaktériumok helye az evolúciós törzsfán

2.2.2. A cianobaktériumok sejtszerveződése

A cianobaktériumok prokarióták, vagyis sejttartalmuk nem különül el citoplazmára és sejtmagra. A színes kromatoplazma veszi körül a színtelen, központi helyzetű centroplazmát. A prokarióta típusú cianobaktérium sejtfalát kívülről poliszacharid nyálkaburok fedheti; citoplazma membránját lizozim-szenzitív, Gram-negatív sejtfal veszi körül. Sejtfaluk strukturális merevségét a peptidoglikán réteg biztosítja, így a sejtfal-szintézis penicillin-érzékeny. Sejthártyájuk tipikus egységmembrán.

A cianobakteriális protoplazma jelentős részét a fotoszintetikus apparátus foglalja el, amely tilakoid membránrendszerbe szerveződött. A sejtekre jellemzőek az extratilakoidális elhelyezkedésű fénygyűjtő pigmentek, a fikobiliproteinek (kovalens kötással fehérjéhez kötött nyitott tetrapirrol-láncú vegyületek) jelenléte, amelyek a fikobiliszómákba szerveződnek. A fikobiliszómák sorokba rendeződve helyezkednek el a tilakoid membránok felületén (53). (ld. a 7. ábrát.) A legismertebb fikobiliproteinek a fikoeitritinek, a fikocianinok és az allofikocianinok. Ezek stabil oligomerekké kapcsolódnak össze a fikobiliszómákban. A fikocianin és a fikoeitritin oligomerek hat pénztekercsszerű oszlopba állnak össze, és ezek az oszlopok a három allofikocianinból álló központi egységhez kapcsolódnak.

A citoplazmamembrán és a tilakoidmembrán között találjuk a cianoficin szemcséket, amelyek nitrogén depóként működnek és kizárólag a cianobaktériumokra jellemzőek. A tilakoid membránok közötti glikogén szemcsék, valamint a polifoszfát testek is tápanyag raktárak, míg az ún. karboxiszómák a széndioxid felvételben játszanak szerepet, mivel a Calvin-ciklus karboxiláló enzimét, a ribulóz 1,5-difoszfát-karboxilázt tartalmazzák. Jellemző képletek a fajsúly szabályozását végző gázvakuolumok is. (7. ábra)



7. ábra Egy cianobaktérium sejt sematikus képe

Citoplazmamembrán: CM, tilakoidmembrán: TH, cianoficin szemcsék: CY, glikogén szemcsék: GG, polifoszfát testek: PB, karboxiszómák: C, gázvakuumok: G.

A cianobaktériumok nukleoplazmáját nem borítja maghártya. Genomjuk a prokarióták közül a legnagyobb, feltehetően cirkuláris a kromoszómájuk. Ennek mérete átlagosan $2-5 \cdot 10^9$ Dalton. A cianobaktérium sejtekben számos extrakromoszómális elem, plazmid mutatható ki. A mutagénnel és a sugárzási károsodásokkal szembeni extrém rezisztenciájuk elsősorban annak tudható be, hogy a genom egynél több másolata van meg egy sejtben. Az ultraviola sugárzás károsító hatása ellen a növényi flavonoidokkal ill. állati melaninnal hasonló funkciójú szkintonemin (54) vagy biopterin glükozid (55) termelésével is védekeznek.

70 S-es riboszómájuk 50 S-es és 30 S-es alegységekből épül fel.

Egyes fonalas cianobaktériumok (IV-V. szekció, ld. később) kötött nitrogén hiányában képesek áttérni a légköri nitrogén kötésére. Ehhez egyes vegetatív sejtek specializált sejté, az ún. heterocisztává alakulnak át. A heterocisztákat vastag fal

borítja, pigmenttartalmuk alacsonyabb, méretük nagyobb a vegetatív sejtekénél. Jellemző rájuk a szubcelluláris zárványok hiánya és az, hogy a vegetatív sejtekhez közel eső részükön ún. poláris testeket tartalmaznak. Itt bonyolódik a sejtek közötti szén- ill. nitrogénforgalom.

Az akinéták (spóra-analógok) csak a heterociszta-képző fajokban fordulnak elő. Tulajdonképpen kiszáradással szemben rezisztens sejtek. Létrejöttük körülményei ma még pontosan nem ismertek. Nagyobbak, mint a vegetatív sejtek és gazdagok tartalék-nitrogén és glikogén elemekben. A légtéren keresztül való elterjedést teszik lehetővé.

Egyes fonalak csúcsán (pl. az *Oscillatoreaceae*-k) hormogóniumok fejlődnek, ezek vékony sejtfallal körülvett képletek, amelyek fiziológiai egységet képező sejteket rejtenek. Lefűződve a szülői fonalról a vízi miliókben való elterjedést szolgálja.

2.2.3. A cianobaktériumok rendszertani és biokémiai helye, C- és N-anyagcseréjük

2.2.3.1. A cianobaktériumok rendszerének rövid áttekintése

Jellegzetes fotoszintézisük és biokémiai tulajdonságaik alapján a cianobaktériumok könnyen elkülöníthetők a zöld- és a bíborbaktériumoktól (44) (lásd az 1. táblázatot).

ZÖLD FOTOSZINTETIZÁLÓ BAKTÉRIUMOK		BÍBOR BAKTÉRIUMOK		CIANOBAKTÉRIUMOK
Zöld kénbaktériumok (Chlorobiaceae)	Zöld fonalas baktériumok (Chloroflexaceae)	Bíbor kénbaktériumok (Chromatiaceae)	Bíbor nem kénbaktériumok (Rhodospirillaceae)	
<i>Egy fotocentrum</i>	<i>Egy fotocentrum</i>	<i>Egy fotocentrum</i>	<i>Egy fotocentrum</i>	<i>Két fotocentrum</i>
<i>Elektronforrás: hidrogén, kén, tioszulfát</i>	<i>Elektronforrás: kénhidrogén, szerves molekulák</i>	<i>Elektronforrás: hidrogén, kén, tioszulfát, kén- hidrogén és bizonyos esetek- ben szerves molekulák</i>	<i>Elektronforrás: kénhidrogén, szerves molekulák, de sohasem kén</i>	<i>Elektronforrás: víz</i>
<i>Leadott anyagcsere termék: szulfát</i>		<i>Leadott anyagcsere termék: szulfát</i>		<i>Leadott anyagcsere termék: oxigén</i>
<i>Szigorúan anaerobok Légzésre képtelenek</i>	<i>Aerobok, fakultatív anaerobok Oxigénnel lélegeznek</i>	<i>Anaerobok Légzésre képtelenek</i>	<i>Mikroaerofilek</i>	<i>Aerobok, fakultatív anaerobok Oxigénnel lélegeznek</i>

1. táblázat A cianobaktériumok elkülönítése biokémiai sajátásaik alapján

A cianobaktériumok morfológiailag igen változatosak, közöttük egysejtű, többsejtű, fonalas, spóráképző, telepes stb. fajok is előfordulnak (44,56,57). Általánosan elfogadott rendszerük még nem alakult ki. Jelenleg az egyik legelfogadottabb, a szervezetek biokémiai tulajdonságait is figyelembe vevő felosztást Rippka és munkatársai készítették 1979-ben. Az azóta elvégzett enzimológiai és nukleinsav vizsgálatok is alátámasztják ezt. A felosztás 5 szekciót különít el:

I. szekció:

Egysejtű, hengeres vagy ovoid alakú szervezetek tartoznak ide.

Chamaesiphon

Synechococcus

Microcystis

Gloeotheca

Gloeobacter

Gloeocapsa

Synechocystis genusok

II. szekció:

Olyan egysejtű cianobaktériumok, amelyek többszörös hasadással:

Dermocarpa

Xenococcus genusok,

vagy mind kettős, mind többszörös hasadással szaporodnak:

Dermocarpella

Mixosarcina

Chroococcidiopsis

Pleurocapsa genusok.

III. szekció:

Az ide tartozó cianobaktériumok egysejtsoros fonalakból álló szervezetek, melyek csak vegetatív sejtekből állnak, heterocisztát nem tartalmaznak. Reprodukciójuk sejtosztódás, amely mindig a trichóma hosszanti tengelyére merőlegesen történik. Ide tartoznak a

Spirulina

Oscillatoria

Pseudoanabaena genusok

IV. szekció:

Egysejtsoros, heterocisztát is tartalmazó fonalas cianobaktériumok. Reprodukciójuk a trichóma hosszanti tengelyére merőleges sejtosztódással történik.

Anabaena

Nodularia

Cylindrospermum genusok.

Hormogóniumokkal szaporodnak a
Nostoc
Scytonema
Calothrix genusok.

V. szekció:

Olyan fonalas cianobaktériumok, melyek részlegesen többsorosak is lehetnek. Szaporodásuk nemcsak a trichóma hosszanti tengelyére merőlegesen történik, hanem hormogóniumokkal és akinéták rügyezésével is. Az hormogóniumok kis, hengeres sejtekből állnak, amelyek megnöve gömbölyűvé válnak. A heterociszta fejlődése lehet terminális és interkaláris.

Pl. *Fisherella* genusok tartoznak ide.

2.2.3.2. A cianobaktériumok energianyerése és szénanyagcseréje

A cianobaktériumok fototróf organizmusok, a magasabbrendű növényekhez hasonlóan aerob fotoszintetizálók. Növekedésük a fényenergiától függ, szénforrásként specifikusan a CO_2 -t hasznosítják, míg az oxigén és az elektronok forrása a víz. A cianobaktériumok fotoszintetikus elektrontranszportja és fotofoszforilációja, amely nagy vonásokban azonos a növények kloroplasztisaiban folyó fotoszintézissel, ATP-t és NADPH-t termel (58). A magasabbrendű növényekhez hasonlóan a cianobaktériumok fotoszintetizáló apparátusában két fotoszisztéma található. A fénygyűjtő komplexek specifikus polipeptideken kívül klorofillt és fikobillproteineket tartalmaznak (53). A termelődő ATP és a NADPH a fénytől közvetetten függő folyamatban, a redukív pentóz-foszfát-úton (Calvin-ciklus) a szénforrás, a széndioxid redukciójára használdik el (59-62).

A vízbontás (PSII) során O_2 szabadul fel (a heterocisztákban fotoszintetikus úton nem képződik O_2), a "redukálóerő" pedig NADPH formájában stabilizálódik. Bizonyos körülmények között glikogén halmozódik fel a sejtekben, amely később mobilizálódhat és szén- valamint energiaforrásként szolgálhat (44,63). A fény és a sötét periodikus változása miatt a cianobaktériumok is naponként változtatják a fénytől függő metabolikus aktivitásukat. A túlélés alapja a belső ATP-szint fenntartása, a "fenntartó anyagcsere", amely külső energiaforrás hiányában a belső tartalékoktól (glikogén) függ.

A cianobaktériumok vagy a glikogén rovására tartják fenn az ATP-szintet a sötétben, vagy egy bizonyos mértékig csökkentik azt ("adenylate energy charge") (59,64-66) .

Az energianyerés fő útja a fény hiányában az oxidatív pentóz-foszfát út. A fotoszintetikus reduktív pentóz-foszfát-ciklus (Calvin-ciklus) és az oxidatív pentóz-foszfát-út reakciólépései nagyrészt közösek, a szén útja azonban teljesen más fényen mint sötétben. Fényben a G6PDH gátolt, így az oxidatív ciklus "zárva" van, míg sötétben a gátlás megszűnésével "nyitva", ekkor a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz működik és a 6-foszfoglükonát-dehidrogenázzal együtt termel NADPH-t. Ennek oxidatív lebontása során pedig ATP keletkezik.

2.2.3.3. A nitrogén anyagcsere

A cianobaktériumok képesek egyrészt szervesetlen nitrogén tartalmú vegyületek felvételére (nitrát-, nitrit-, ammónium-sók), másrészt néhány faj képes az elemi nitrogén (N_2) felvételére és beépítésére is. Ez a tulajdonságuk kiemeli ökológiai jelentőségüket, hiszen ez lehetővé teszi, hogy olyankor is elszaporodjanak, amikor a fotoautotróf szervezetek növekedésének fő limitáló tényezője a kötött nitrogén hiánya, ami foszfáttal szennyezett vizekben általános. A legtöbb faj fel tudja használni a szerves nitrogénvegyületeket, bár sejtjeikbe ezek csak nehezen jutnak be.

A cianobaktériumok átlagos N-tartalma a környezeti tényezőktől, a növekedési fázistól stb. függően a szárazsúly 3-9 %-a. Ez gazdasági jelentőséget is kölcsönöz nekik. A rizsföldek nitrogén utánpótlását sok helyen cianobaktériumok elszaporításával oldják meg (67), és hasonló módszert alkalmaznak más gabonák (68) és konyhakerti növények termesztésénél (69) is.

A kizárólag prokariótáknál előforduló biológiai nitrogénkötés, vagyis a molekuláris nitrogénnek ammóniává alakítása a bioszféra egyik igen fontos biokémiai történése. Ismeretes, hogy az *Azotobacterek* a fogyasztott szénhidrát grammjaira számítva csupán 5-50mg ammónia fixálására képesek. Az ilyen fixálók nagymennyiségű hasznosítható szerves anyagot igényelnek, amely a legtöbb talajban nem könnyen elérhető. A gyökérgümő szimbiota *Rhizobium* számára a fixált szén

rendelkezésre áll ugyan, de a molekuláris nitrogén redukciójához a fotoszintézissel előállított anyagokat a növényi produkcióból kell elvonni. A cianobaktériumok azonban nem csak nitrogént kötnek, hanem a fényenergia felhasználásával fixált szénigényüket is saját maguk fedezik szén-dioxidból.

Minden nitrogénkötő cianobaktérium (és az összes többi nitrogénfixáló prokarióta) nitrogenáz enzimet tartalmaz. A nitrogenáz rendkívül oxigénérzékeny enzim. Sejtmentes kivonatokban az enzimfehérjét már 0,5 % oxigén percek alatt teljesen és irreverzibilisen inaktíválja. Ez a tulajdonsága valószínűleg az ősi redukív légkör idejéből származik, és az enzim a ma élő fajokban is csak O_2 -től védve funkcionálhat. Ezt a "célt" a cianobaktériumoknál a következő strukturális és biokémiai megoldások szolgálják:

1. A nitrogenáz speciális sejtek (a heterociszták) védhetik, melyeknek belső miliője szabad oxigéntől mentes, minthogy a fotoszintézis oxigéntermelő rendszere (PS II) bennük nem funkcionál.
2. A heterociszták vastag sejtfalát kívülről még nyálkás burok is övezi, ennek funkcionális szerepe lehet a nitrogénkötés szabályozásában.
3. A heterociszták légzési enzimeket is tartalmaznak, melyek minden szabad oxigént azonnal eliminálnak.
4. A nitrogént kötő, de heterocisztákat nem fejlesztő (nem fonalas) cianobaktériumokban az oxigénfejlesztő fotoszintézis és az oxigénérzékeny nitrogenáz-aktivitás időben elkülönül egymástól.

2.2.3.4. A makromolekulák anyagcseréjének általános jellemzése és fényfüggősége

A cianobaktériumokban a makromolekulák anyagcseréje is prokarióta jellegű (a replikáció, a transzkripció és a transláció "szerkezeti" elemei, valamint működése), a heterotróf baktériumokból ismert genetikai és biokémiai sajátságokkal bír, de a lényegi különbség a cianobakteriális makromolekula-anyagcsere fényfüggősége. A cianobaktériumok fényről sötétbe kerülve nemcsak az intermediér anyagcseréjüket, de a makromolekuláris szintetikus folyamataikat is gyorsan megváltoztatják (49,70).

A cianobaktériumok fehérjeszintézisének jellegzetessége, hogy az RNS-szintézishez hasonlóan az összprotein-szintézis is fénytől függ (56,71,72). A sötétben

szintetizált fehérjék funkciója ismeretlen, de feltételezik, hogy az ún. "fenntartó anyagcserében" kaphatnak szerepet.

A cianobakteriális fehérjeszintézis speciális része a fényintenzitás és/vagy fény minőségi kontroll alatt álló fikobiliprotein szintézis. Az első esetben a fény intenzitása (energiafluxus) befolyásolja a sejtek fikobiliprotein tartalmát. A második lehetőség - a fény minőségi kontroll - azt jelenti, hogy bizonyos cianobaktérium fajok a rendelkezésre álló fény hullámhosszától függően különböző fikobiliproteineket szintetizálnak (kromatikus adaptáció) (73). Ezek a fajok eredményesen változtatják pl. a fény hullámhosszától függően a fikocianin/fikoeritrin arányt a sejtekben, és ilyen módon a fényhasznosítási képességet maximálják, amelynek ökológiai jelentősége nyilvánvaló (53,74,75).

A cianobakteriális DNS-, RNS- és proteinszintézis intenzitása tehát a sötétben csökken, de állandó marad hosszú időn át (kb. 24 óra), és azonnal megnő, ha tényészeteket megvilágítjuk (71,76,77). A sötétben bekövetkező redukció legegyszerűbb magyarázata az lenne, hogy a szintetikus folyamatok energiát igényelnek, amely nem áll rendelkezésre a sötétben. Ez azonban nem lehet a probléma megoldása, hiszen az ATP-szint nem csökken a sötétben (lásd a 2.2.3.2. fejezetet "fenntartó anyagcsere"). Általános az a nézet, hogy a cianobaktériumokban az makromolekulák szintézise fénytől függő, fény által szabályozott folyamat (78).

2.2.3.5. Az obligát fotoautotrófia biokémiai alapjai a cianobaktériumokban

Az obligát fotoautotrófia a fotoautotrófia egy speciális esete, és mint ilyen, csak bizonyos cianobaktérium fajokra jellemző. Több fajról derült ki, hogy bizonyos körülmények között képesek heterotróf növekedésre is. Az ilyen fajok többsége ún. fotoheterotróf, ami azt jelenti, hogy jelentősebb mértékű növekedéshez fény által termelt ATP-re van szükségük (79-81). Más fajok esetében az energia- és szénszükséglet cukrokból is származhat (pl. glukóz, szaharóz stb.) és így ezek sötétben is jól növekedhetnek, bár ez a kemoheterotróf növekedés nem mérhető össze a

fotoheterotróf növekedéssel, annál sokkal lassúbb. Ezek a szubsztrátok az oxidatív pentóz-foszfát úton hasznosulnak a sötétben (59-61,82).

2.3. *A Microcystis aeruginosa*

A *Microcystis aeruginosa* Földön igen széles körben elterjedt faj. A toxikus vízvirágzásokban betöltött szerepe, valamint a belőle izolálható különös metabolitok miatt világszerte egyre inkább az érdeklődés középpontjába került.

Amint az 2.1. fejezetben említettük, a *Microcystis aeruginosa* egysejtű, édesvízi faj. A fenti rendszerezés szerinti I. szekcióba tartozik. Gázvakuolumos sejtjeit vastag, poliszacharid tartalmú nyálkaréteg borítja (83), emiatt a sejtek egymással és rendszerint heterotróf baktériumsejtekkel is összetapadnak. A fentebb a cianobaktériumoknál általánosságban leírtaknak megfelelően az életfolyamataikhoz szükséges energiát nappal a napfényből, éjjel pedig aerob légzéssel, a glikogén elégetésével szerzi. Előfordul azonban, különösen vízvirágzások idején, hogy olyan nagy tömegű sejt tapad össze, és képez vastag tajtékot a víz felszínén, hogy ennek alsóbb rétegei még nappal is sötétben vannak, sőt, az oxigén korlátozott diffúziója miatt itt anoxia alakul ki (84). Ilyen sötét anaerob körülmények között a *Microcystis aeruginosa* a glikogént etanollá, acetáttá, széndioxiddá és hidrogénné fermentálja (85).

A mikrocisztin mellett több különböző, szokatlan összetételű peptidet (86,87), valamint proteáz inhibitor hatású ciklikus peptid laktonokat (88,89) izoláltak *Microcystis aeruginosa*-ból. Jungmann és munkatársai olyan anyagot mutattak ki benne, amely a *Daphniára* a tiszta mikrocisztinnél is toxikusabbnak bizonyult (90).

2.4. *A cianobaktériumok kapcsolata életközösségük tagjaival*

Az említett cianotoxinok biológiai szerepe a természetes életközösségükben egyelőre nem ismert. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a vízvirágzásokban csupán a természetes folyamatok (toxintermelés, társulások aspektusa) markáns megjelenéséről van szó. Az élővilágban számos más esetben is előfordul, hogy egyes szervezetek

mérgeket termelnek védekezésből, vagy hogy áldozataikat megbénítsák stb. A 2. táblázat (29. oldal) egyes toxinoknak a gerincesekre gyakorolt hatását hasonlítja össze. Mint azt a táblázat mutatja, a cianobakteriális toxinok (cianotoxinok) az igen veszélyes mérgek közé tartoznak. A veszélyességüket növeli, hogy nem ismerjük a vízvirágzásokat kiváltó közvetlen tényezőket, valamint a sejten belül a toxintermelés szabályozását. Nem rendelkezünk hatékony ellenszerekkel, gyógymódokkal a mérgezések kezelésére. Nem megoldott a felszíni vizeink minőségének, a toxicitásnak rendszeres, szakszerű ellenőrzése sem, bár a megbízható módszerek már rendelkezésre állnak. Ezért az eddigi esetekkel kapcsolatos károk és balesetek és különösen a toxinoknak rákos megbetegedésekkel való kapcsolata mindenképpen óvatosságra intenek, és felhívják a figyelmet arra, hogy e jelenséggel a tudományos kutatás szintjén is foglalkozni kell.

Munkánk egyik lényeges eleme az, hogy megvizsgáljuk, vajon a mikrocisztin a cianobaktériummal azonos élettérben előforduló szervezetekre hatással van-e, illetve hogy a *Microcystis aeruginosa* számára ökológiai szempontból hasznos-e a cianotoxin termelése.

2.4.1. A vírusok szerepe a cianobaktérium populációk méretének szabályozásában

Azokat a vírusokat, amelyeknek cianobaktérium a gazdaszervezete, cianofágoknak nevezzük (91). Minden eddig tanulmányozott cianofág megegyezik abban, hogy genomja egy darab kettős szálú DNS és felépítése a jellegzetes fej-farok alakú. Ezek alapján a bakteriofágokra alkalmazott rendszerbe, és azon belül három családba sorolhatóak (92). Ezek:

- I. **Myoviridae**: hosszú, összetett farkuk van, az ezt összetartó hüvelyt nyak választja el a fejtől,
- II. **Styloviridae**: hosszú farok, összetartó hüvely nélkül, valamint
- III. **Podoviridae**: ezeknek farka rövid.

A cianofágok fejének átmérője egy kivétellel 50 és 67 nm közé esik.

A fágreszecskék száma egy adott élőhelyen időben változik és vízvirágzásokat követően maximumot ér el (93-95). Ez az azt megelőző vírus koncentrációnak akár több ezerszerese is lehet (93). Ennek alapján feltételezhető, hogy a vírusok közrejátszanak a vízvirágzások lezajlásában. A kérdés megítélése azonban nem teljesen egyértelmű.

Egyes szerzők úgy vélik, hogy a természetes élővizekben, és különösen az édesvizekben, a fágok koncentrációja nem elegendő ahhoz, hogy azok szaporodni tudjanak és jelentős hatást fejtsenek ki a baktériumok, cianobaktériumok populációjára (96). Továbbá a cianofágok erősen gazdaspecifikusak, és az ezekkel együtt élő cianobaktériumokban az erős szelekciós nyomás hatására fágrezisztencia alakulhat ki (94). Ezek miatt a cianobaktériumok mortalitásában a protozoák mellett elhanyagolhatónak vélték a vírusok hatását.

Bergh és munkatársai szerint a vírusok koncentrációja helyes meghatározási módszer alkalmazása esetén, amikor a 60 nm alatti méreteket is figyelembe veszik, akár 3-7 nagyságrenddel több az addig közölteknél, és éppen egy édesvizű tóban (Plussee, Németország) találták a legnagyobb fágkoncentrációt (97). Így elképzelhető, hogy a cianofágok fontos szerepet tölthetnek be a mikrobiális plankton ökológiai kontrolljában. Ezt látszik megerősíteni az is, hogy vírushatás következtében a fitoplankton primer produkciója akár 78 %-kal csökkenhet (98).

A fentiek értelmében úgy véljük, hogy a fágok a gazdaszervezetek öködinamikájában fontos meghatározó szerepet tölthetnek be. Valószínű, hogy egy adott élőhelyen megjelenő vírus nem az össz-baktérium ill. össz-cianobaktérium populáció méretét, hanem azon belül a fajok megoszlását határozza meg döntően (99). A világszerte leginkább elterjedt "LPP-típusú" cianofágok gazdaszervezetei, a *Lyngbia*, *Phormidium* és *Plectonema* fajok sohasem szerepelnek vízvirágzásokban, és ezt a cianobaktérium—cianofág egyensúly kialakulásával magyarázzák (100).

Elméleti számításokkal is próbálkoztak annak megítélésére, hogy a bakteri-
ofágok milyen mértékben tudják befolyásolni a gazdaszervezetek populációjának

dinamikáját (99,101). Ehhez azonban ismerni kell számos paramétert, amelyek egy része nehezen meghatározható, esetleg időben változik, sőt egymásra is hat:

- a fág szenzitív gazda növekedési sebessége,
- a fág rezisztens gazda növekedési rátája,
- a fág rezisztenciát okozó mutációk gyakorisága,
- a rendelkezésre álló tápanyagok mennyisége (koncentrációja),
- az irreverzibilis fág adszorpció sebességi állandója,
- az adszorpciótól a lízisig eltelő látens szakasz, vagyis a fág ciklus hossza,
- a lizáló sejtből kiszabaduló fágok száma,
- két osztódás között egy sejt által felhasznált tápanyag mennyisége.

Az ilyen típusú modellezés jelentős elhanyagolásokkal is rendkívül komplex rendszert feltételez, és csak kvalitatív eredményeket szolgáltathat. Egy másik megközelítés szerint (102), ha ismerjük

- A fág ciklus hosszát,
- ezen belül azon időszak arányát, amikor a még nem lizált sejtben fág részecskék mutathatók ki elektronmikroszkóposan,
- a fág ciklus és a generációs idő arányát,

akkor hozzávetőlegesen meghatározható, hogy a gazdaszervezet mortalitásának mekkora részét okozza a fáginfekció.

Mindkét módszer alapján az a következtetés vonható le, hogy a vírusok szerepe nem elhanyagolható a gazda szervezetek populációjának dinamikájában, ezek befolyásolhatják az élővizek primer produkcióját és főként a fitoplanktonon belül a fajok megoszlását.

A tengerekben a cianofágok jelentős hatással vannak a táplálékláncre, ill. az anyagforgalomra. A fitoplankton az oldott szerves anyagokat építi be a szervezetébe. A protozooplankton a "kisméretű" szervezeteket fogyasztja. Ezek közé a heterotróf baktériumok, cianobaktériumok és eukarióta egysejtűek tartoznak. A cianofágok ezen egyirányú folyamatnak oldalsó elágazását illetve visszacsatolását eredményezik (95), többek között tápanyagot szolgáltatva a heterotróf baktériumoknak, amik azután szintén a zooplankton áldozatai lehetnek.

<u>Toxin</u>	<u>Eredet</u>	<u>Gyűjtőnév</u>	<u>LD₅₀</u> *
Botulinum toxin-a	<i>Clostridium botulinum</i>	baktérium	0.00003
Tetanus toxin	<i>Clostridium tetani</i>	baktérium	0.0001
Ricin	<i>Ricinus communis</i>	növény	0.02
Diftéria toxin	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	baktérium	0.3
Kokoi toxin	<i>Phyllobates bicolor</i>	nyílméreg béka	2.7
Tetrodotoxin	<i>Sphaeroides rubripes</i>	gömbhal	8
Saxitoxin	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	cianobaktérium	9
Kobratoxin	<i>Naja naja</i>	kobra	20
Nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>	cianobaktérium	30-50
Microcystin-LR	<i>Microcystis aeruginosa</i>	cianobaktérium	50-150
Anatoxin-a	<i>Anabaena flos-aquae</i>	cianobaktérium	200
Microcystin-RR	<i>Microcystis aeruginosa</i>	cianobaktérium	300-600
Kurare	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	nyílméreg növény	500
Sztrichnin	<i>Strychnos nux-vomica</i>	növény	500
Amatoxin	<i>Amanita phalloides</i>	gomba	600
Muscarin	<i>Amanita muscaria</i>	gomba	1100
Phallotoxin	<i>Amanita phalloides</i>	gomba	1800
Glenodin toxin	<i>Peridinium polonicum</i>	barázdásmoszat	2500

NaCN

10000

*Az LD₅₀ érték µg/kg testsúlyegységben, intraperitoniálisan injektálva egérbe.

2. táblázat Néhány biológiai eredetű toxin toxicitása

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vegyszerek

A szilárd fázisú extrakcióhoz használt C-18 Sep-Pak cartridge-eket a Waters (Division of Millipore) cégtől vásároltuk.

A HPLC-hez ioncserélt, majd háromszor desztillált és $0,45\ \mu\text{m}$ pórusú membránfilteren átszűrt vizet, valamint Carlo Erba-tól (Milánó) származó "HPLC grade" oldószereket használtunk. A DE-52 oszlop töltetet a Whatman-tól (Maidstone, Anglia) szereztük be.

A többi reagens a Reanaltól (Budapest) származott kivéve az extrakcióhoz használt 20 %-os étkecetet.

Radioaktív jelölések céljára a $\text{K}_3^{32}\text{PO}_4$ -ot, $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ -t és ^{35}S -metionint az Izintától (Budapest) szereztünk be.

3.2. Organizmusok

3.2.1. *Microcystis aeruginosa*

Az általunk tanulmányozott *Microcystis aeruginosa*-t Gorzó György a Közép-Dunántúli Vízügy Igazgatóság munkatársa gyűjtötte az 1991-es Velencei-tavi toxikus vízvirágzás során. Gyűjteményünkben (BGSD) a 243. sorszámot kapta. Összehasonlító vizsgálatokra Kenneth A. Beattie a Dundee egyetemről rendelkezésünkre bocsátott egy azonos nevű, PCC7820 törzsszámú izolátumot, amelyet a párizsi Pasteur Culture Collection-ben tartanak nyilván. A PCC 7820-ból izolált toxinok szerkezete ismert.

Szintén összehasonlító vizsgálatok célját szolgálta egy toxint nem termelő *Microcystis aeruginosa* törzs, amelyet Borbély György 1991-ben izolált a Kis-Balatonból.

3.2.2. Egyéb szervezetek

E. coli DH5- α baktériumtörzset (103) használtunk a toxicitási kísérletben.

Diploid *Nicotiana plumbaginifolia* magokat Dr. Medgyesi Pétertől, *Arabidopsis thaliana* C24 vad típusú magokat Horváth Évától kaptunk.

Kereskedelmi lucerna (*Medicago sativa*) és búza (*Triticum aestivum*) fajt használtunk.

Mustár (*Sinapis alba* var. Budakalászi sárga) magokat a Hermestől (Budapest) szereztünk be. Ez a kereskedelemben kapható fajta igen jó minőségű, gyakorlatilag 100 %-ban csíráképes, és a kezeletlen csíranövénykéek hossza csak kis szórást mutat néhány napos növesztés után.

Muslica (*Drosophila melanogaster*), papucsállatka (*Paramecium caudatum*) és a vízi növények, a békalencse (*Lemna minor*), gyékény (*Typha* sp.), vízi pestis (*Pistia stratiotes* L.), tócsagaz (*Ceratophyllum demersum* L.), süllőhínár (*Potamogeton perfoliatus*), rucaöröm (*Salvinia natans* L.) valamint *Chlamydomonas reinhardtii* fajokból vad típusokat használtunk.

Az egérteszteket (*Mus musculus*) BALB/c hímekkel végeztük.

3.3. A cianobaktérium tenyésztés körülményei

3.3.1. A cianobaktérium kultúra fenntartása

A törzseket 1 % agarral szilárdított Allen-féle (104) tápoldatból készített ferde csöveken és leszűrt tenyészetekben tartottuk fenn 20-24 °C-on, állandó 40-60 μ E megvilágítás mellett.

NaNO ₃	1,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,039 g/l
MgSO ₄	0,075 g/l
Na ₂ CO ₃	0,02 g/l
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,034 g/l
Na ₂ SiO ₃ × 9 H ₂ O	0,058 g/l
EDTA	0,001 g/l
citromsav	0,012 g/l
Fe(SO ₄) ₃ × 7 H ₂ O	0,006 g/l
Mikroelemek	1 ml/l
Mikroelemek (törzsoldat)	
H ₃ BO ₃	2,86 g/l
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	1,81 g/l
ZnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,222 g/l
MoO ₃	0,018 g/l
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,39 g/l
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,079 g/l

3. táblázat Az Allen-féle médium összetétele

3.3.2. A növekedés nyomon követése

A tenyészeteket Allen-féle tápoldatba oltottuk és megfelelő méretű üveg-edényben 100 μ E állandó megvilágítás mellett 4 % CO₂-tartalmú sterilre szűrt levegőt buborékolattunk át rajta. A nevelést 30 °C-on végeztük. A tenyészetek növekedését a 800 nm-en mért relatív fényintenzitás-csökkenés (turbiditás) alapján követtük nyomon. Mivel a sejtek igen gyakran kolóniákba tapadnak össze, az ilyen mérés szórása elég jelentős (5-10 %). A klorofill tartalom mérésével¹ kíséreltük meg a hibát csökkenteni, azonban ebben az esetben az extrakció kísérleti hibájával is számolni kell, úgyhogy

¹ A klorofill meghatározás:

A mintavételt követően a 1,5 ml-es mintákat szobahőmérsékleten Hettich asztali centrifugán 15.000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a csapadékhoz 200 μ l desztillált vizet adtunk. Az így előkészített mintákat 4×15 másodpercig szonikáltuk a sejtek feltárása végett. A mintákhoz 800 μ l 80 %-os vizes acetont oldatot adtunk, és 30-40 percig jégen állni hagytuk. Ezután szobahőmérsékleten asztali centrifugán 5 percen át 15.000 rpm-en lecentrifugáltuk a mintákat. A felülúszó fényelnyelését 663nm-en 80 %-os acetont oldattal szemben mértük kvarc küvettában.

Extinkciós koefficiens: $\epsilon = 82,04 \text{ cm}^2/\text{mg}$

(1 μ g klorofill-a = 0,08204 A₆₆₃)

összességében nem kaptunk lényegesen jobb eredményt. Ezért továbbra is a turbiditás mérését alkalmaztuk.

3.4. A toxin tisztítására és vizsgálatára használt módszerek

3.4.1. Az extrakció

A sejteket a tápoldatból centrifugálással gyűjtöttük össze (30 perc 10000 g), majd háromszoros térfogatra töltöttük fel a kívánt végkoncentrációkhoz számított mennyiségű elegyalkotókkal. Egy órán keresztül 4 °C-on homogenizátorral kevertettük (Homogenizer 302, Mechanika Precyzyjna, Lengyelország). A módszertől függően a sejteket előzőleg kétszer lefagyasztottuk -20 °C-on, illetve Tesla ultrahangos fürdőben végeztük a kevertetést.

3.4.2. A szilárd fázisú extrakció, és a cartridge használata

A nyers toxinkivonatot (5 % ecetsavas oldatban) fordított fázisú töltetet tartalmazó kis oszlopon (C-18 cartridge) tisztítottuk tovább. Az elválasztás elve a következő:

Az oszlop töltete szilikagél, aminek felszínéhez kovalensen kötött oktadekán lánc kapcsolódik. A töltet emiatt úgy tekinthető, mint egy nagy felületre szétoszlatott immobilizált apoláros szénhidrogén folyadék film. Az oszlopra felvitt minta minden komponense a poláros (vizes) és apoláros (oktadekán) folyadék fázis között oszlik meg. Ez a megoszlás a megoszlási állandóval jellemezhető, ami az adott komponensnek az egyes fázisokban kialakuló kémiai aktivitásainak, vagy jó közelítéssel koncentrációjának hányadosa.

$$d^A = \frac{c_1^A}{c_2^A},$$

ahol d^A az A anyag megoszlási állandója az 1-es és 2-es fázisok között, c_1^A és c_2^A az egyes fázisokban kialakuló koncentrációk. A szennyezőktől való elválasztás azon

alapszik, hogy az egyes komponensek megoszlási állandója különbözik egymástól, vagyis a

$$K_d^{AB} = \frac{d^A}{d^B}$$

elválasztási tényező 1-től többé-kevésbé eltérő érték.

Egymással elegyedő polárosabb és apolárosabb oldószerek (pl. MetOH-H₂O) különböző arányban keverve olyan elegyeket eredményeznek, amelyeknek átlagos polárossága a két tiszta komponens ilyen értéke közé esik és a komponensek arányától függ. Amennyiben az extrakció során az egyik fázis az állandó C-18 töltet, a mozgó fázis polárosságának változtatásával a megoszlási állandók változtathatók. Mivel az egyes komponensek megoszlási állandói a mozgó fázis polárosságával nem azonos mértékben változnak, az egyes komponensek közötti elválasztási tényező is változtatható pl. a vizes fázis metanol tartalmának változtatásával. A oszlopok geometriája és a töltet minősége nem teszi lehetővé, hogy 1-hez közeli megoszlási állandókkal dolgozzunk. Azonban az ionos és poláros anyagok jól elválaszthatók az apolárosaktól az 1-től távoli tartományokban. Ezen tartományokban az extrakció az adszorpció-deszorpció jelenséghez válik hasonlóvá. Vizes (5 % ecetsavas, <10 % MetOH) oldatból a toxin gyakorlatilag teljes mértékben a C-18-as fázisba megy át, míg tiszta metanollal, acetonitrillel, vagy egyéb apoláros oldószerezrel eluálható.

A oszlopokat a gyártó, valószínűleg a jobb eltarthatóság érdekében, úgy szállítja, hogy a töltetre valamilyen védő anyagot vittek fel. Ezt az utasítás szerint mintegy 1,5 ml 100 % metanollal lehet eltávolítani. Az átfolyó metanol UV-spektrumának követésével megállapítottuk, hogy ez nem elegendő, így a cartridge-okat, attól függően, hogy a toxin tisztításának mely szakaszában kívántuk felhasználni, 10-30 ml metanollal kezeltük, majd 50 ml vízzel átöblítettük.

A minták felvitele után 10 ml vízzel ismét öblítettük az oszlopot, majd 30 ml 10 %-os metanollal távolítottuk el a toxinnál polárosabb komponensek jelentős részét. A toxinfrakciót 30 ml 60 %-os metanollal eluáltuk. Amikor a már (pl.

oszlopkromatográfiásan) tisztított toxin koncentrációja volt a cél, a 10 %-os metanolos öblítést kihagytuk, és a toxint 100 %-os metanollal eluáltuk.

A használt oszlopok ismét felhasználhatóak voltak, 100 %-os metanolos reaktiválás után sem lényeges kapacitás-csökkenést, sem kereszt-szennyezést nem tapasztaltunk. Ennek ellenére ezeket csak preparatív célra használtuk a kromatográfiás lépéseket megelőzően.

Meg kell jegyezni, hogy a C-18 oszlopok használata azért is szerencsés, mert a segítségükkel biztonságosan meg tudtuk szabadítani a mintánkat a C-18-as fázishoz nagyon erősen, esetleg irreverzibilisen kötődő erősen poláros komponensektől (lipidek stb.), amelyek a későbbiek során a HPLC oszlopokat károsítanák.

3.4.3. A HPLC

A magasnyomású folyadékkromatográfiát is C-18-as töltetű oszlopokon végeztük. Az elválasztás alapja a fenti elmélettel azonos. A különbség mindössze annyi, hogy a rendszer megengedi az egységnyihez közeli megoszlási állandók alkalmazását. Így a mozgó- és álló fázis között a komponensek valódi megoszlása jön létre, és a módszer a megoszlásos kromatográfia tipikus esetévé válik. A gyakorlatilag nem megoszló poláros és ionos szennyeződések az áttörési csúcsban jelentkeznek, a polárosabb komponensek pedig a megoszlási állandójuk függvényében ehhez képest késnek. E késés számszerűen a retenciósfaktorral jellemezhető, ami az injektálástól az adott komponenshez tartozó kromatográfiás csúcs megjelenéséig eltelt idő és az áttörési csúcs megjelenéséhez szükséges idő hányadosa:

$$R_f^i = \frac{t_i}{t_0}$$

Az egyes komponenseknek az egymástól való elválaszthatósága a retenciósfaktoruk arányától függ. Ez egyrészt a fenti elvekkal azonos módon a mozgó fázis víz-metanol arányával változtatható. Finomabb és specifikusabb hatás érhető el, ha az elválasztandó anyagok poláros illetve ionos jellegét változtatjuk meg. Ilyenkor ugyanis az egyes konkrét molekularészleteknek megfelelő hatás érhető el, és így a nagyon

hasznló molekulák is elválaszthatók egymástól. Az ionos oldalláncok ionos jellege csökkenthető ionpár képzőkkel; mi e célra nátriumszulfátot alkalmaztunk. A savas hidrogének disszociációja a pH csökkentésével visszaszorítható. E célra erős, de nem korrozív és egyben UV-semleges trifluor-ecetsavat (TFA) használtunk.

A HPLC vizsgálatokhoz Jasco 790 UV-VIS Intelligent Spectrophotometerrel és Spectraphysics DP700 integrátorral felszerelt Gilson HPLC rendszert használtunk. A csúcsokat 240 nm-en detektáltuk.

3.4.3.1. Az analitikai HPLC

A rutin analíziseket 0,46x15 cm Zorbax C-18 (10 μ m) oszloppal végeztük, a mozgó fázis MetOH : 0,05M Na₂SO₄ : TFA = 55 : 45 : 0,1 volt 1 ml/perc áramlási sebesség mellett.

3.4.3.2. A preparatív HPLC

Preparatív célra VYDAC 218TP oszlopot (250 × 22,5 mm-es oszlop 10 μ m méretű C-18 töltettel) használtunk. 60 % MetOH + 0,1 % TFA elegyet 7 ml/perc, a fenti mozgó fázist 5 ml/perc áramlási sebességgel használtuk.

3.4.4. A DE-52 oszlopkromatográfia

A toxinok azon szennyezőit, amelyek a polárosság szempontjából ezekhez nagyon hasonlítanak, és így fordított fázison nem választhatók el, egy az előzőtől független elven alapuló kromatográfias módszerrel választhatjuk el. Ilyen az ioncserélő kromatográfia. A módszer nagy előnye a méret szerint elválasztó kromatográfiákkal (gél-szűrés) szemben, hogy alkalmasan választott körülmények között a C-18 CRTG használatánál leírtakhoz hasonlóan a mintának az oszlopra való felvitelét követően a tisztítandó komponens (egy ideig) gyakorlatilag mozdulatlan. Ennek két hasznos következménye van:

- a) A minta gyakorlatilag tetszőleges térfogatban vihető föl az oszlopra, és annak tetején koncentrálódik. Ez az elválasztás hatékonyságát nagyban növeli.

- b) A minta fölvitelét követően az oszlop az eredeti tiszta oldószerrel öblíthető, amivel a szennyező komponenseknek olykor jelentős részétől meg lehet szabadulni a finomabb elválasztás előtt.

A cianotoxin mintát 5mM Tris-HCl pH 7,5 pufferben oldottuk 2 mg/ml névleges koncentrációban. A fel nem oldódott maradékot centrifugálással távolítottuk el (2 perc 10000g). Az oldatot ezután a fenti pufferrel egyensúlyba hozott (2×10 cm-es) DE-52 oszlopra vittük, és az oszlopot legalább két oszlop-térfogat pufferrel öblítettük. Az elúciót ugyanezen pufferben 0-100 mM NaCl lineáris gradienssel végeztük 40 ml/h térfogati áramlási sebességgel. A frakciók toxintartalmát Shimadzu 160A Spektrofotométerrel 240 nm-en mért fényelnyelés alapján, NaCl koncentrációját RADELKIS Conductivity Meter type OK-102/1 segítségével mért vezetőképesség alapján követtük. A megfelelő frakciók toxintartalmát CRTG-on sómentesítettük, és Rotavaporral koncentráltuk. A liofilizált mintákat -20 °C-on tároltuk.

3.5. A toxicitási tesztek

A toxicitási teszteket cianobaktérium sejtsuszpenzióval illetve részlegesen tisztított toxinnal végeztük. A szilárd fázisú extrakció liofilizált termékéből 1mg/ml-es vizes törzsoldatot készítettünk, és ezt használtuk a tápoldatok elkészítéséhez.

3.5.1. A baktérium-, a cianobaktérium- és a zöldalgatesztek

A különböző egysejtűeket a nekik megfelelő körülmények között toxinnal ill. toxin nélkül neveltük. Növekedésüket fényszórás alapján követtük.

Eschericia coli baktérium tenyészeteket YTB tápoldatban rázatva neveltük, ill. 1,5 % agarral szilárdított (YTB) táptalajon Petri-csészékben tartottuk fenn.

Bacto-Trypton	10 g
Yeast-extract	1 g
NaCl	1 g
(Bacto Agar szilárd táptalajhoz	15 g)
Desztillált vízzel feltölteni	1000 ml

4.táblázat Az YTB médium összetétele

A cianobaktériumokat Allen-féle tápoldatban a duplázódási idejük legalább háromszorosán át növesztettük a *Microcystis aeruginosa*-val kapcsolatban leírtak szerint az adott organizmus számára az ideálishoz közeli hőmérsékleten. *Anabaena sp.* PCC 7120 nitrogén fixálásra képes cianobaktériumot kötött nitrogén mentes tápoldatban is neveltük. A *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgát 24 °C-on 10 ml-es rázatott tenyészetben neveltük négy napon keresztül. Ahol más koncentrációt nem tüntetünk fel, ezeket a tájékoztató jellegű kísérleteket 150 µg/ml toxinkoncentrációval végeztük.

A nevelési hőmérsékleteket az alábbi táblázat mutatja.

<i>Eshericia coli</i>	37 °C-on
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	24 °C-on
<i>Anabaena sp.</i> PCC 7120	20 °C-on
<i>Synechocystis sp.</i> -ek	24 °C-on
<i>Microcystis aeruginosa</i>	30 °C-on
<i>Synechococcus sp.</i>	39 °C-on

Egyes kísérleteket az *Eshericia colival* 32 °C-on végeztünk. Ilyenkor a generációs idő 120 perc körül volt.

3.5.2. Protozoa teszt

Papucsállatka (*Paramecium caudatum*) tenyészet 1 ml-es alikvotjaiban különböző mikrocisztin koncentrációkat állítottunk be. A tenyészeteket szoba-hőmérsékleten tartva adott időpontokban Bürker-kamra segítségével mikroszkóposan számoltuk a túlélő egyedeket.

3.5.3. A magasabbrendű növények nevelése

A magok csírázása és a csíranövénykéek fejlődésének kezdeti szakaszán az általunk kipróbált, magasabbrendű növényeknél alkalmazott MS-, RM-, Gibson- és Hoagland-, valamint a cianobaktériumok növekedése számára optimális Allen-féle táptalajok észrevehetően nem különböztek egymástól, vagyis egy adott növényfaj magvai ezen tápoldatok bármelyikéből készített táptalajon azonos módon csíráztak, és a magoncok fejlődésében sem lehetett különbségeket kimutatni. Így az egyszerűség kedvéért és a jobb összehasonlíthatóság érdekében e teszteket Allen-féle (cianobaktérium) táptalajon végeztük. (Meg kell jegyezni, hogy az általunk leginkább vizsgált mustár csíranövénykéek az első 8 napon még tápanyagok nélkül, desztillált vízzel készített táptalajon is kielégítően - bár a kontroll magoncoknál lassabban - fejlődtek.)

3.5.3.1. *A mustár és a lucerna*

A sterilizált (4 % H_2O_2 3·30 perc) magokat steril desztillált vízzel többször mostuk. Ezután 1 ml, 0,6 % agarral szilárdított, a cianotoxint megfelelő koncentrációban tartalmazó tápoldatra vetettünk 3 szem magot 12 ml-es "félkémcsőbe". A magokat 25 °C-on tartottuk négy-nyolc napon keresztül, napi 16 órás megvilágítással. Legalább három párhuzamos kísérletet végeztünk, és a kilenc csíranövény hosszából számítottunk várható értéket és szórást.

3.5.3.2. *A búza*

A kísérleteket a fentiekhez hasonlóan végeztük. Mivel a magok nagyobbak, így kémcsővenként csak két szemet vetettünk.

3.5.3.3. *Az Arabidopsis sp., a gyékény és a dohány*

A sterilizált magvakat egy éjszakán keresztül 0,5 mg/ml giberellinsav oldatban áztattuk, majd 20-20 magot a megfelelő mennyiségű cianotoxint tartalmazó Allen-féle tápoldatból és steril SiO_2 -ből készített talajra, vagy 0,6 % agarral szilárdított tápoldatra vetettük.



3.5.3.4. A békalencse

5 db három leveles növényt 2 ml, a megfelelő mennyiségű toxint, valamint 40 $\mu\text{g/ml}$ mikosztatint és 50 $\mu\text{g/ml}$ penicillint tartalmazó Allen-féle tápoldatra helyeztük, majd 24 °C-on tartottuk napi 16 órás 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ megvilágítás mellett. 4 párhuzamos kísérletet végeztünk. A növények növekedését tömegméréssel és klorofill tartalom meghatározása útján követtük.

3.5.4. A *Drosophyla melanogaster* teszt

Canton-S vad típusú *Drosophyla melanogaster*t petéztettünk, majd a 0-2 órás petékből 100-100 darabot kukoricadarás táptalajra helyeztünk. A kémcsöveket 25 °C-on tartottuk és a kikelt imágókat számoltuk.

3.5.5. Az egértesztek

A toxikusság mérésére a gyakorlatban leginkább az ún. egérteszt terjedt el. Ez a toxinmintának a kísérleti egerek (*Mus musculus*) intraperitoniális (hasüregébe történő) injektálását jelenti. A kapott túlélési adatok statisztikájából nyerhető az 50 %-os letális dózis (LD_{50}), ami a kísérleti állatok felének elpusztulásához szükséges toxin mennyiséget jelöli.

Az egérteszteket Codd és Carmichael szerint (105) végeztük. A szilárd mintákat fiziológiás sóoldatban (PBS)¹ vettük fel, majd a 18-22 g-os egereket intraperitoniálisan oltottuk be a vizsgálandó oldat 0,5 ml-ével. A halálos dózisokkal kezelt példányok már általában 2 órán belül elhullottak, de a túlélési értékeket csak 24 óra múltán regisztráltuk. Egy-egy koncentráció értéknél két egeret használtunk. Az adatokból Reed és Muench (106) szerint határoztuk meg az LD_{50} -értékeket.

E módszert többen adaptálták és átdolgozták, de mivel lényegileg nem változott az évek során, az eredeti műhöz nyúltunk vissza. Az 50 %-os halálos dózis (LD_{50}), mint statisztikai érték meghatározására ideális esetben statisztikailag reprezentatív (értsd:

¹ 8 g NaCl-ot, 0,2 g KCl-ot, 1,44 g Na_2HPO_4 -ot és 0,24 g KH_2PO_4 -ot oldunk 800 ml vízben, a pH-t 7,2-re állítjuk, majd 1 l-re töltjük fel

elsősorban nagy számú) mintából kellene kiindulnunk. Ez az egérteszteknél anyagi és morális megfontolásból általában nem teljesül. Az általunk alkalmazott módszer még akkor is viszonylag pontos eredményeket szolgáltat, ha az egyes koncentrációkhoz tartozó túlélési értékek a kis számú minta miatt jelentős hibával terheltek.

A számítás elve és menete röviden a következő. Első feltételezésünk, hogy az az egér, amely túlélte egy bizonyos toxinkoncentrációt, túlélte volna egy kisebb (és bármely kisebb) koncentrációt is. Ezért minden koncentráció értékhez összeadjuk az adott értéknél plusz a kisebb koncentrációknál életben maradt egyedek számát. Második feltételezés, hogy az az egér, amely nem élt túl egy bizonyos toxinkoncentrációt, elpusztult volna egy nagyobb (és bármely nagyobb) koncentrációtól is. Ezért minden koncentráció értékhez összeadjuk az adott értéknél plusz a nagyobb koncentrációknál elpusztult egyedek számát is. Az így kapott két adatsort a koncentráció függvényében ábrázolva egymást metsző görbéket kapunk. A metszésponthoz tartozó koncentráció az LD₅₀ közelítő értéke. A módszer természetesen tovább pontosítható. Azonban az irodalomban általában egy (ritkán két) jegy pontosságra adják meg az LD₅₀ értékeket, és ezt a pontosságot így is elértük, továbbá, véleményünk szerint, a kísérleti állatok viszonylag kis száma miatt a látszólag pontosabb eredmény nem lenne megbízhatóbb.

3.6. *Anyagvizsgálati módszerek*

3.6.1. A diódasoros analitikai HPLC

A toxinmintákat C-18 fordított fázisú magasnyomású kromatográfiával (RP-HPLC) vizsgáltuk. Waters 990 HPLC rendszeren a rutin analitikai HPLC-nél leírt oszloppal és oldószer eleggyel 0,5 ml/perc térfogati áramlási sebesség mellett kromatografáltuk a CRTG-ről eluált toxint.

3.6.2. Aminosav analízis

A peptidek aminosav tartalmának meghatározása következők szerint történt. A peptideket 6 M HCl oldatban 110 °C-on egy 18 óra alatt aminosavakra hidrolizáltuk. Az elválasztás előtt a primer aminosavakat o-ftálaldehiddel (OPA), a

szekunder aminosavakat 9-fluorenil-metoxi-karbonil-kloriddal (Fmoc-Cl) derivatizáltuk, majd HP Series M kromatográfon 200 · 4,6 mm Hypersil-ODS oszlopon (5 µm-es töltettel) 46 °C-on választottuk el. A mozgó fázis 0,03 M NaAc + 0,25 % THF + 0,1 mM NaN₃ (A) valamint acetonitril és 0,1 M NaAc 4:1 arányú elegyének (B) lineáris gradiense volt, ahol a B oldat 3 %-ról 40 %-ra nőtt 20 perc alatt, 1 ml/perc áramlási sebességgel. A kromatogramot HP 1046 A programozható fluoreszcenciás detektorral mértük, gerjesztés 230 nm hullámhosszúságú fénnel történt, az emissziót 455 nm-en mértük (OPA) ill. 16 perc után gerjesztés 266 nm-en, emisszió mérés 313 nm-en történt (Fmoc).

3.6.3. NMR

Számos izotóp magjának mechanikai spinje van és mivel ezek elektromos töltéssel is párosulnak, ez a mozgás mágneses momentumot hoz létre. A mag mágneses momentuma mágneses térben csak diszkrét értékeket vehet fel, és a rendezetlen állapotnak megfelelő energiaérték diszkrét energiaszintekre hasad fel. Az ezen felhasadt szintek közötti átmenetek a különbségnek megfelelő energiájú sugárzási energia elnyelésével járnak. A jelenség analitikai alkalmazhatósága azon alapszik, hogy állandó frekvencia mellett a rezonanciához tartozó térerőre illetve állandó térerő mellett az abszorpciós frekvenciára a mag közvetlen környezetének is van hatása. Mivel azonban e hatás nagyon csekély (10^{-8} - 10^{-9} arányú) abszolút módon nem mérhető. Azonban a különböző kémiai környezetekben levő protonok (¹H-NMR esetén) abszorpciójában megnyilvánuló különbségeket meghatározhatjuk, ha összehasonlító méréseket végzünk. Az eltérő kémiai környezetben levő vizsgált hidrogénatomnak az alkalmazott standard anyag (leggyakrabban TMS) kiválasztott protonjainak abszorpciójától különböző rezonanciafrekvenciája lesz. Ezt az eltérést, a **kémiai eltolódás** a különböző készülékeken mért adatok összehasonlíthatóságának érdekében relatív értéként szokás megadni:

$$\delta = \frac{\Delta\nu \cdot 10^6}{\nu_0} ,$$

ahol $\Delta\nu$ frekvenciaegységekben kifejezett különbség a minta és a referens abszorpció értéke között, ν_0 a készülék oszcillátor frekvenciája, δ dimenzió nélküli szám, a 10^6 -os faktorra utalva ppm-ként is emlegetik. A 36. és 37. ábrán (83. oldal) ilyen egységeket tüntettünk fel.

A különböző környezetekben levő ^1H atomok kémiai eltolódása tehát különbözik, és ennek alapján a molekula egyes szerkezeti elemei azonosíthatóak. Nagyobb molekuláknál, ahol sok különböző H-tartalmú csoport ($-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{}$, C_6H_5- stb.) található, a szomszédos csoportok is hatással vannak a kémiai eltolódásra, a molekula szerkezetének teljes felderítése csupán NMR spektrum alapján nagyon nehéz. Egyes szerkezeti elemek meglétére vagy hiányára nézve azonban bizonyító érvényű lehet az NMR vizsgálat.

A vizsgálatot Bruker 400 NMR készüléken végeztük. Az oldószer és belső standard CD_3OD volt (δ 3,30 ppm).

3.7. Radioaktív izotópos jelölések

3.7.1. A fehérje szintézis vizsgálata ^{35}S -jelöléssel

A kontroll és a toxinnal kezelt *Synechococcus* sp. tenyészetekből 1 ml-es mintákat vettünk (steril körülmények között), ezeket $2,4 \text{ MBq ml}^{-1}$ ^{35}S -metioninnal (Izinta, Budapest) jelöltük. A polipeptid-szintézis változásokat 0,5 órás pulzus-jelölésekkel mutattuk ki.

A radioaktívan jelölt mintákat jégre helyeztük, majd a sejteket Eppendorf centrifugával (3-5 perc) összegyűjtöttük. Az egydimenziós lineáris gradiens (10-18 %) SDS-poliakrilamid gélelektroforézis előtt a mintákat Laemmli (107) SDS-tartalmú dupla töménységű mintapufferében¹, 3 perces főzéssel tártuk fel. A gélekre egyenlő térfogatú, de különböző módon kezelt mintákból származó, radioaktívan jelölt fehérje preparátumot vittünk fel.

¹ 150 mM TRIS-HCl pH6,8, 4% SDS, 20% glicerín, 0,002% Brómfenolkék

3.7.2. Az *in vivo* foszforiláció

Exponenciális növekedési fázisban levő *Synechococcus* sp. tenyészetéhez 100 µg/ml toxint adtunk, majd adott időpontokban (kontrollként a toxin hozzáadása előtt) 1-1 ml-t 1 MBq $K_3^{32}PO_4$ -ot tartalmazó kémcsőben 15 percen keresztül jelöltünk. A sejteket centrifugálással (asztali centrifugában 12000 g, 4 perc) összegyűjtöttük, Laemmli-féle mintapufferben felfuszpendáltuk, és további felhasználásig $-70^\circ C$ -on tároltuk. Az összegyűjtött mintákat 10-18 %-os poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettük alá, és a géleket autoradiográfiásan vizsgáltuk.

3.7.3. Az *in vitro* foszforiláció

A cianobaktérium tenyészeteket 5'-ig 3000 g-vel centrifugáltuk, a kétszer desztillált vízzel mosott sejteket 100-szoros töménységben HEPES pufferben¹ felfuszpendáltuk, majd 8·15 másodperces ciklusban jégen szonikálással feltártuk. A sejtörmeléket 10000 g-s 15 perces centrifugálással eltávolítottuk. A 25 µl-es reakcióelegy a felülúszó 20 µl-ét tartalmazta, a reakciót jégen ATP hozzáadásával indítottuk. Ez a végkoncentrációra számolva 10 µM inaktív és $2 \cdot 10^5$ Bq γ - ^{32}P -jelölt ATP volt. 30 perc után a foszforilációt dupla tömény mintapuffer² hozzáadásával állítottuk le, majd a proteineket gélelektroforézissel választottuk el. A szárított gél autoradiográfiásan vizsgáltuk.

3.7.4. A poliakrilamid gélelektroforézis és a szárított gélek autoradiográfiás vizsgálata

A minták radioaktivitását 10 % triklórecetsavas kicsapással határoztuk meg; a proteineket poliakrilamid gélelektroforetikus módszerrel választottuk el. 10-18 % poliakrilamid gradiens gél alkalmaztunk. A módszer részletes leírását lásd Borbély és Surányi munkájában (108). Az elektroforézis után a géleket Coomassie kékkel

¹ 50 mM Hepes, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 µM DTT

² 150 mM TRIS-HCl pH6,8, 4% SDS, 20% glicerin, 0,002% Brómfenolkék

festettük¹, öblítettük², majd fluorográfiára előkészítettük úgy, hogy azokat 30 percig Enlighting R-ben (DuPont, USA) áztattuk. Az így kezelt géleket BioRad (Richmond, USA) gélszáritó berendezéssel vákuumban megszáritottuk és röntgenfilmre helyeztük. A röntgenfilmeket (Medifort RP, Forte) -70 °C-on exponáltuk néhány napig, majd azokat a Forte által megadott módon előhívtuk.

3.8. A vírusinfekciós kísérletek

3.8.1. A *Synechococcus sp.* - AS-1 rendszer

Synechococcus sp. PCC 6301 AS-1 cianofágok által kiváltott lízisét folyadék fázisban és agarral szilárdított lemezekon vizsgáltuk.

A cianofágok hatására folyadék fázisban az ép sejtek számának csökkenése figyelhető meg. Az exponenciális növekedési fázisban levő cianobaktérium tenyészetéhez kb. tízszeres multiplicitással (10^7 ml⁻¹ sejttenyészetéhez 10^8 ml⁻¹ vírus végkoncentrációban) adtuk a fágot, majd meghatározott időközönként mintát véve a sejtek számának változását 800 nm-en mért fényszórás változás alapján követtük.

Az egy lépéses cianofág növesztés során, agar tartalmú lemezen a lizált sejtekből kiszabaduló fágreszecskek, illetve az aktív centrumok száma határozható meg. A cianobaktérium tenyészetet 30 percen keresztül 39 °C-on együtt neveltük a 0,1 szeres multiplicitással adagolt faggal. Ezután a sejteket szobahőmérsékleten 5 perc alatt 3000 g-vel lecentrifugáltuk, és Allen tápoldatban fölveltük. Megfelelő időközönként 100 µl mintát vettünk, és hígítási sorokban meghatároztuk a plakk-képző egységek számát (PFU). Ehhez a külön nevelt, centrifugálással összegyűjtött *Synechococcus sp.* sejtekből kb. 10^9 ml⁻¹ sejtszuszpenziót készítettünk, majd ezt 42 °C-on tartott, 1 % alacsony olvadáspontú agart tartalmazó Allen tápoldattal 1:1 arányban elegyítettük, hozzáadtuk a cianofágokat tartalmazó mintát, és petri csészében 1,5 % agarral szilárdított tápoldatra öntöttük ("top agar"). Hét-tíz nap múlva a plakkok számolhatók voltak.

¹ 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 4,5% etanol, 10% ecetsav vizes oldatában 1 órán keresztül

² 20% etanol, 7% ecetsav többszört cserélve a gélen

3.8.2. Az *E. coli* - λ rendszer

E rendszerben a fágciklust csak a plakkszámlálás útján követtük. Ehhez a fentihez hasonlóan jártunk el. A kb. 10^{-5} szeres multiplicitással alkalmazott fágot tartalmazó baktérium tenyészetéhez adtuk a 2-szeres töménységű agart, és így készítettük a felső agar réteget. A plakkokat 6-12 óra múlva számoltuk.

4. A kísérleti eredmények

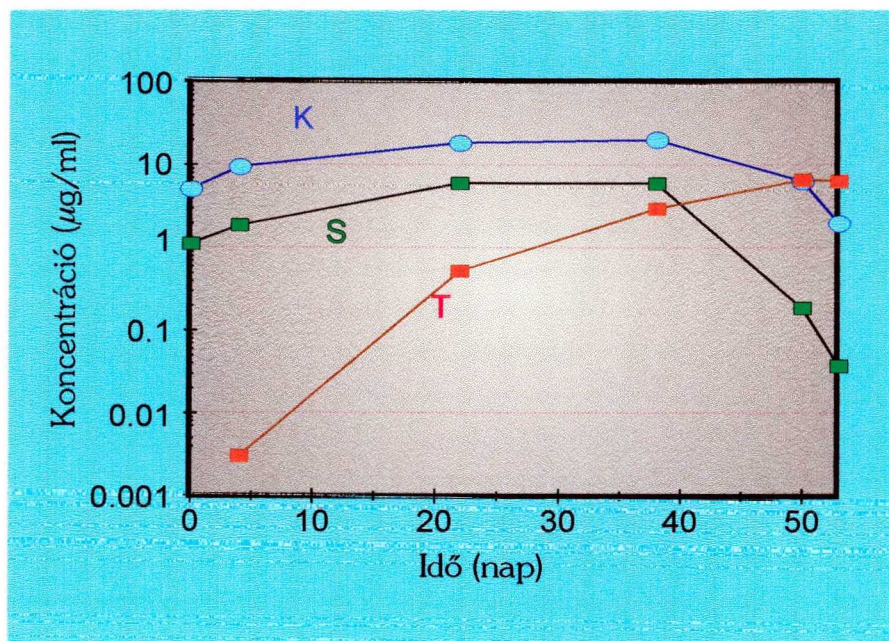
4.1. A cianotoxin megoszlása a sejtek és a tápfolyadék között

1979-ben Ausztráliában egy (*Cylindrospermopsis* sp.) vízvirágzás káros hatásait meg akarták előzni, ezért rézszulfáttal kezelték az adott víztározót (109). Az egyszerre elpusztuló algákból kiszabaduló toxin hatására a környéken 148 ember (főképp gyermekek) betegedett meg (110,111). A mérgezést nyilván az okozta, hogy a toxin, amelynek nagy része eredetileg a sejtekben volt, a lízis hatására egyszerre ürült a tározó vizébe.

Hasonló esetek megelőzésére, valamint a toxin tisztítási eljárás és a toxicitás vizsgálat optimalizálása érdekében, valamint ökológiai szempontból is fontos tudni, hogy endotoxinnal, vagy exotoxinnal van-e dolgunk. Ezért nyomon követtük a toxin megoszlását a *Microcystis aeruginosa* sejtek és a tápfolyadék között a sejtek kis koncentrációjától az előregedett tenyészet pusztulásáig, ahogyan az a természetes élőhelyen a vízvirágzások során történhet.

9l $OD_{800}=0,05$ -os (meglehetősen híg) tenyészetet indítottunk. Két-három naponta mintát vettünk, és meghatároztuk az elkülönített sejtek, valamint a felülúszó toxintartalmát.

A sejtek összes toxintartalma a sejtek mennyiségével nőtt, majd egy maximumot elérve lecsökkent (8. ábra). A toxin a médiumban lényegében nem jelent meg, amíg a sejtek az exponenciális növekedés szakaszában voltak. A tenyészet előregedésével a toxin mennyisége megnőtt a tápoldatban, majd a sejtek elhalásakor ért el magas koncentrációt.



8. ábra A cianotoxin megoszlása a *Microcystis aeruginosa* sejtek és a tápoldat között

Kék színnel a klorofill tartalmat (K), zölddel a sejtek (S), narancs-sárgával a tápközeg (T) mikrocisztin tartalmát tüntettük fel, mindegyiket a tápközeg térfogatára vonatkoztatott koncentrációban.

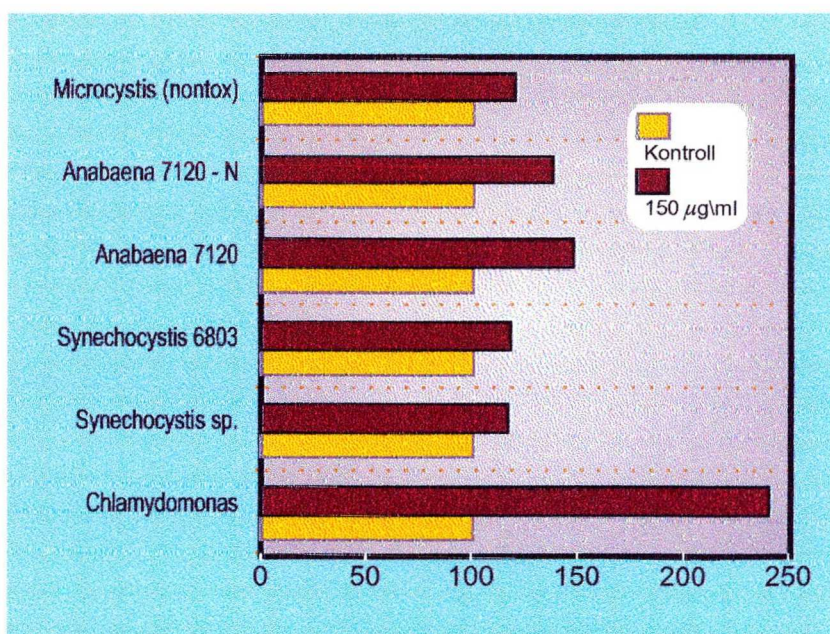
4.2. A toxin hatása más szervezetek növekedésére

4.2.1. Az egysejtűek

Megvizsgáltuk az izolált cianotoxin hatását egyes olyan egysejtűekre, amelyek az édesvízi ökoszisztémákban lényeges szerepet játszó rendszertani csoportokat reprezentálnak. A *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga, az *E. coli*, mint heterotróf baktérium, egy toxint nem termelő *Microcystis aeruginosa*, két *Synechococcus* sp.

izolátum, valamint az *Anabaena* PCC 7120 cianobaktériumok növekedését és *Paramecium caudatum* (papucsállatka, protozoa) túlélését vizsgáltuk a toxin jelenlétében. Az *Anabaena* PCC 7120 nitrogén fixálására képes fonalas faj. Ezzel kötött nitrogént tartalmazó és nitrogén mentes (légköri nitrogén fixálásra készítő) tápoldatban is elvégeztük a vizsgálatot. A nitrogén fixálására specializálódott sejtekben ugyanis a vegetatív sejtektől jelentősen eltérő biokémiai folyamatok zajlanak le. A kötött nitrogént nem tartalmazó közegben elvégzett vizsgálat a toxinnak e folyamatokra gyakorolt esetleges hatását is jelzi.

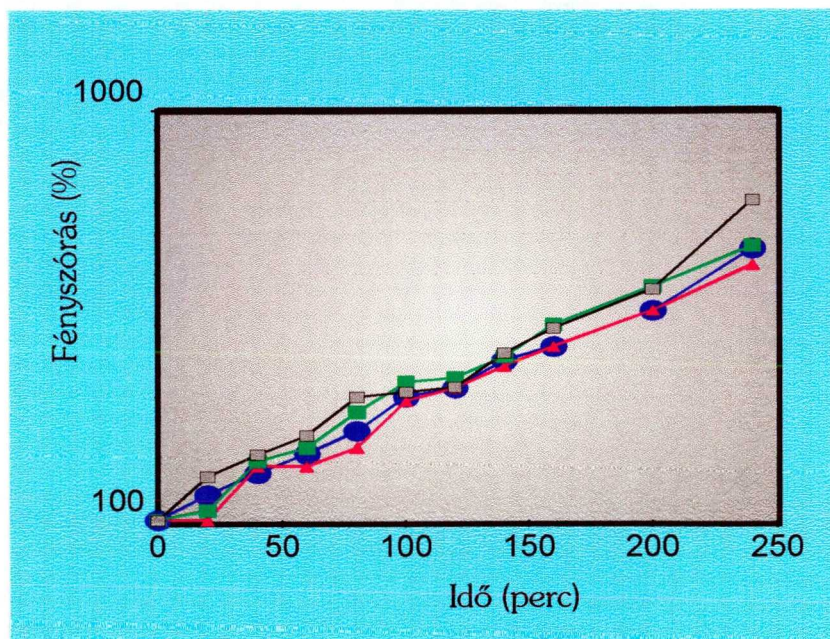
A három kettőződési időn át nevelt tenyészeteknél a 800 nm-en mérhető turbiditás alapján meghatároztuk az átlagos növekedési rátát. A kontroll tenyészetekhez, mint 100 %-hoz viszonyított értékeket a 9. ábrán láthatjuk.



9. ábra A cianotoxinok hatása néhány egysejtű növekedésére

4.2.1.1. Az *E. coli* baktérium növekedése cianotoxin jelenlétében

Escherichia coli tenyészetet különböző toxinkoncentrációkkal kezeltünk. A tenyészet növekedését 600 nm-en mért fényszórás alapján követve a . ábrán látható növekedési görbéket kaptuk. A kísérlet szerint a mikrocisztin legalább 100 µg/ml koncentrációig semmiféle növekedés gátlást nem eredményez *E. coli* tenyészetben.



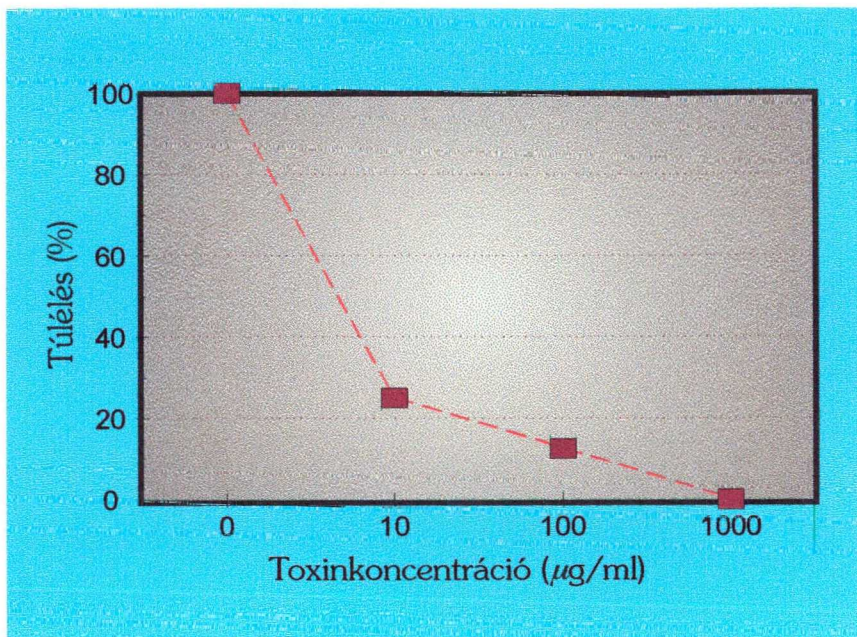
10. ábra Az *E. coli* baktérium növekedése különböző mikrocisztin koncentrációk mellett

Az ábrán a következő mikrocisztin koncentrációkhoz tartozó növekedési görbéket tüntettük fel: kontroll (kék körök), 1 µg/ml (piros háromszögek), 10 µg/ml (zöld) és 100 µg/ml (szürke téglalapok).

4.2.1.2. A mikrocisztin hatása a *P. caudatum* életképességére

A tenyészetet különböző toxinkoncentrációkkal kezeltük. A túlélő egyedek száma már egy órával a mikrocisztin törzsoldat hozzáadása után jelentősen csökkent a

vizsgált koncentráció tartományban. A 11. ábrán a 26 óra után regisztrált adatokat mutatjuk be.



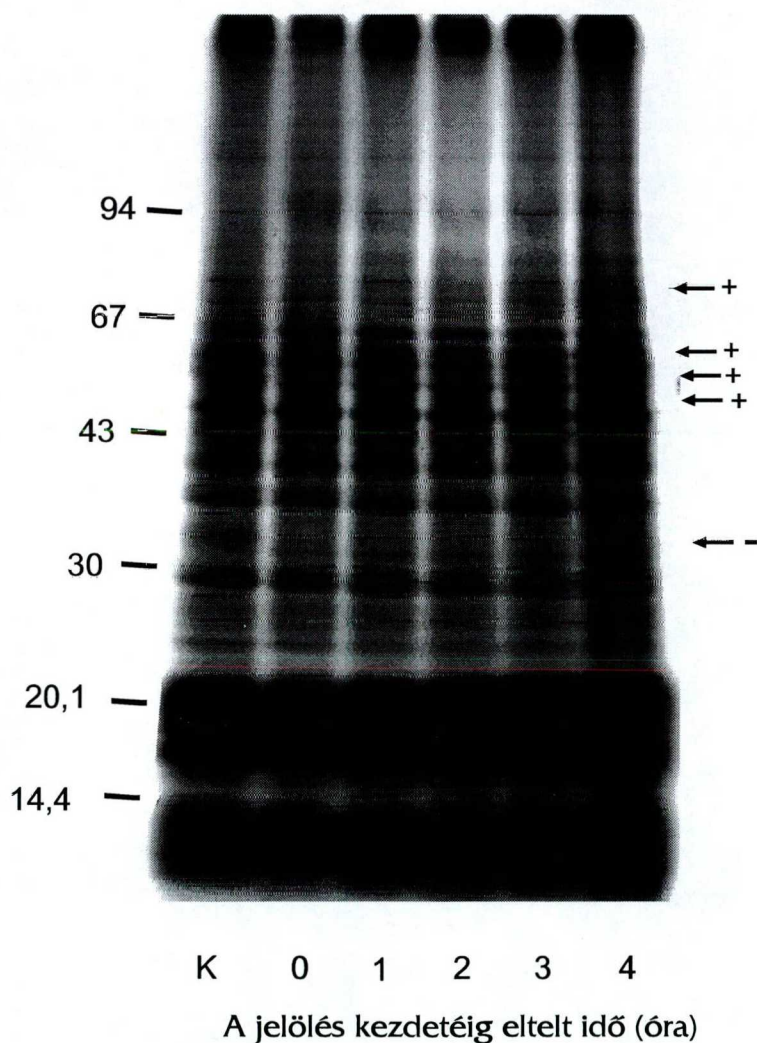
11. ábra A *Paramecium caudatum* életképessége mikrocisztin jelenlétében

A túlélő egyedek száma a kontroll tenyészethez viszonyítva egynapos kezelés után.

4.2.1.3. A *Synechococcus* sp. protein szintézisére és protein foszforilációjára gyakorolt hatás

Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy az állati sejtek tenyészeinek cianotoxinokkal történő kezelése azok növekedésének gátlását eredményezi. A növekedés gátlása rendszerint együtt jár a makromolekulák szintézisének gátlásával is. Az előbbiekből felvetődik, hogy a cianotoxinok hogyan befolyásolhatják maguknak a cianobaktériumoknak a protein szintézisét. 100 µg/ml toxinkivonattal kezelt

Synechococcus sp. PCC 6301 tenyészetek 30 perces, ^{35}S -metioninnal történő pulzus jelölése alapján azt tapasztaltuk, hogy a *de novo* protein szintézis eltér a kontroll tenyészetek fehérje mintázatától (12. ábra). A nyilak az eltűnő (-), illetve újonnan keletkező (+) polipeptideket mutatják.



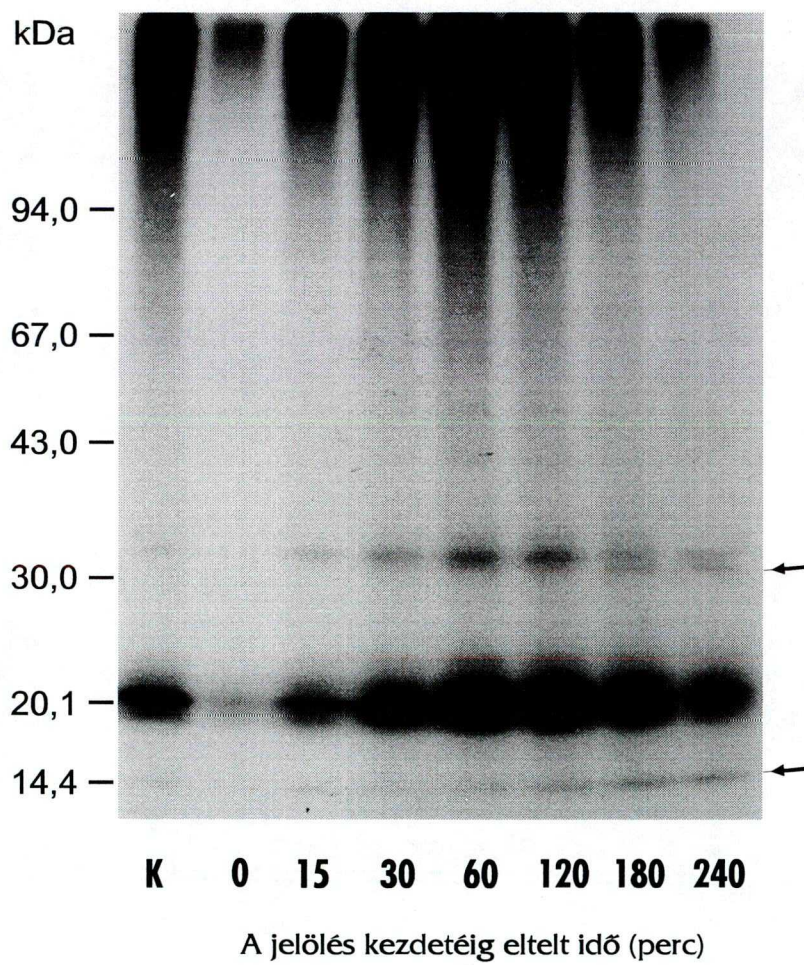
12. ábra A *Synechococcus* sp. protein szintézise

A bevezetőben említettük, hogy a mikrocisztin egyes eukarióta proteinfoszfataáz enzimeket gátol. Fölmerül a kérdés, hogy a cianotoxin *Synechococcus* sp. protein

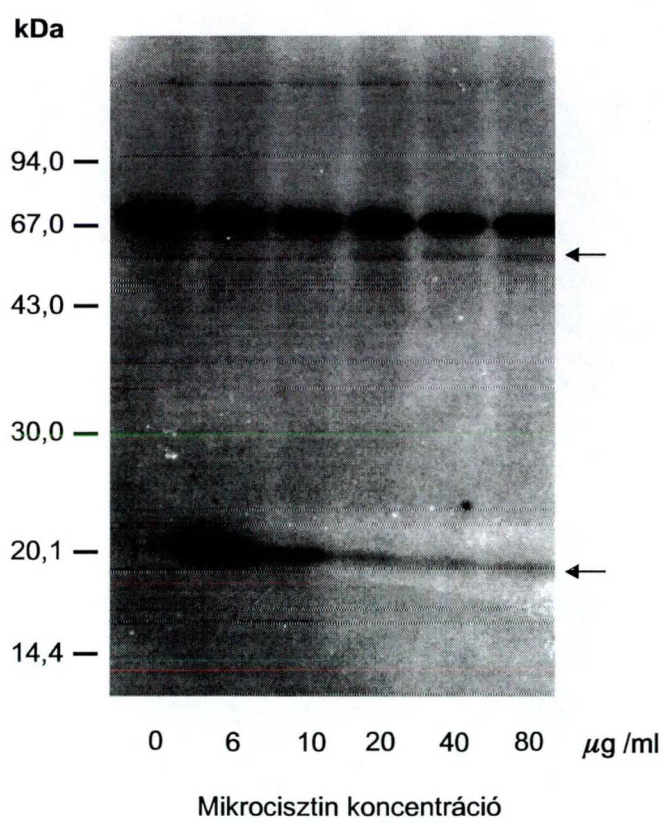
szintézisére gyakorolt hatása párosul-e az egyes proteinek foszforiláltsági szintjének megváltozásával. Ez esetben ugyanis valószínűsíthető, hogy a mikrocisztin egyes prokairóta proteinfozfatáz enzimek aktivitását is módosítja, és így részt vesz a *Microcystis aeruginosa* sejt egyes folyamatainak szabályozásában is.

Megvizsgáltuk a toxin hatását a *Synechococcus* sp. proteinfozfforilációjára *in vivo*. 100 µg/ml nyers toxinkivonattal kezelt cianobaktériumokat a toxin hozzáadása után különböző időpontokban 15 perces pulzusjelölésnek vetettük alá ^{32}P -jelölt kálium-ortofoszfáttal (13. ábra).

Megfigyelhető, hogy az általános foszforilációs aktivitás a kontroll tenyészethez viszonyítva igen alacsony szintről mintegy másfél óra után elért maximumig növekszik, majd csökken. Ezen kívül egyes proteinek foszforilációja külön is változik. Ezek közül a legszembetűnőbbeket nyíllal jelöltük. A fenti *in vivo* kísérletben a proteinfozfforiláción kívül számos folyamat eredményeképpen keletkező foszfortartalmú vegyületek (polifoszfátok, intermedierek stb.) elválasztását és kimutatását végeztük. Az eredmény valószínűsíti proteinfozfforiláció változását. A specifikusabb hatás kimutatása érdekében megvizsgáltuk a *Synechococcus* sp. foszforilációját *in vitro* különböző toxinkoncentrációk mellett, γ - ^{32}P -jelölt ATP segítségével. Az tapasztaltuk, hogy 6 µg/ml toxinkoncentráció hatására egy 20 kDa körüli protein foszforiláltsági szintje jelentősen megnövekedett (14. ábra). Nagyobb mikrocisztin koncentrációk hatására egy 59 kDa-hoz közeli molekulatömegű protein foszforilációja is megnövekszik. Ugyanakkor az előbbi polipeptid foszforiláltságában vagy mennyiségében (a kináz aktivitásának csökkenése, a fehérje harmadlagos szerkezetének megváltozása stb. miatt) csökkenés látszik. Ezeket a folyamatokat nem vizsgáltuk, azt azonban megállapíthatjuk, hogy a *Synechococcus* sp. protein foszforilációját a mikrocisztin a koncentrációtól függő módon befolyásolja.



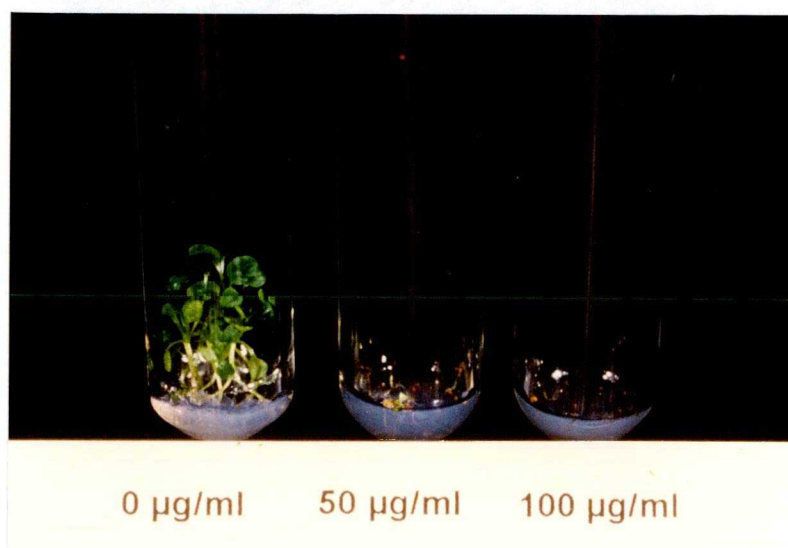
13. ábra A *Synechococcus* sp. protein foszforilációja *in vivo*



14. ábra A mikrocisztin hatása a *Synechococcus sp.* protein foszforilációjára *in vitro*

4.2.2. A cianotoxinok hatása a magasabbrendű növényekre

A cianotoxinoknak a magasabb rendű növényekre gyakorolt hatását először *Arabidopsis* sp. csíranövényeken vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy a toxin koncentráció-függő módon gátolja az *Arabidopsis* sp. növekedését; az 50 %-os növekedésgátlást 50 és 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ közötti koncentrációnál kapjuk. A csíranövények növekedése lassú volt, és a növényhosszak viszonylag nagy szórást mutattak. Emiatt más kísérleti objektumot választottunk.



15. ábra A különböző toxinkoncentrációkkal kezelt *A. thaliana* magoncok

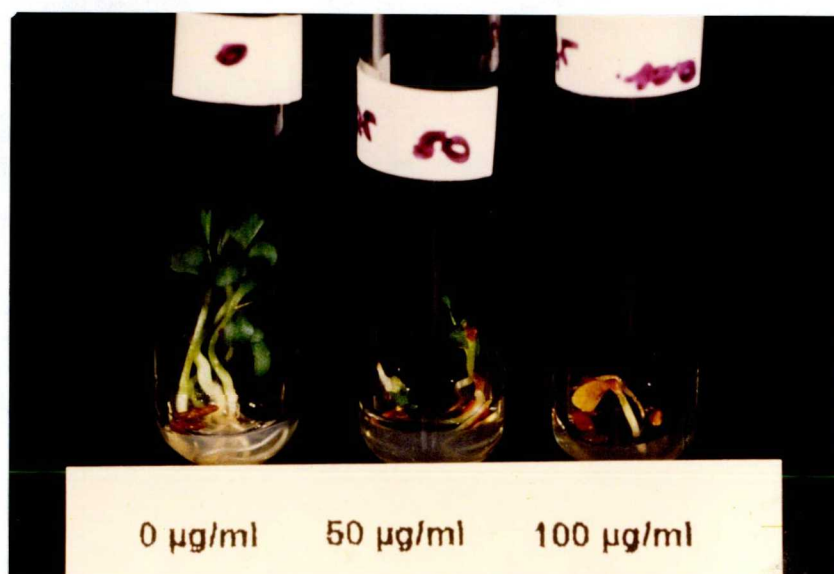
4.2.2.1. A *Medicago sativa* csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében

A lucerna (*Medicago sativa*) jelentős, termesztett kultúrnövény és gyakran tanulmányozott, kedvelt kísérleti objektum. Az ezzel járó technikai jellegű előnyök reményében a további vizsgálatokat ezzel a fajjal végeztük. A lucerna magja sokkal



nagyobb méretű, mint az *A. thaliana* magok, így jobban kezelhetőek, és minőségük egyenletesebb.

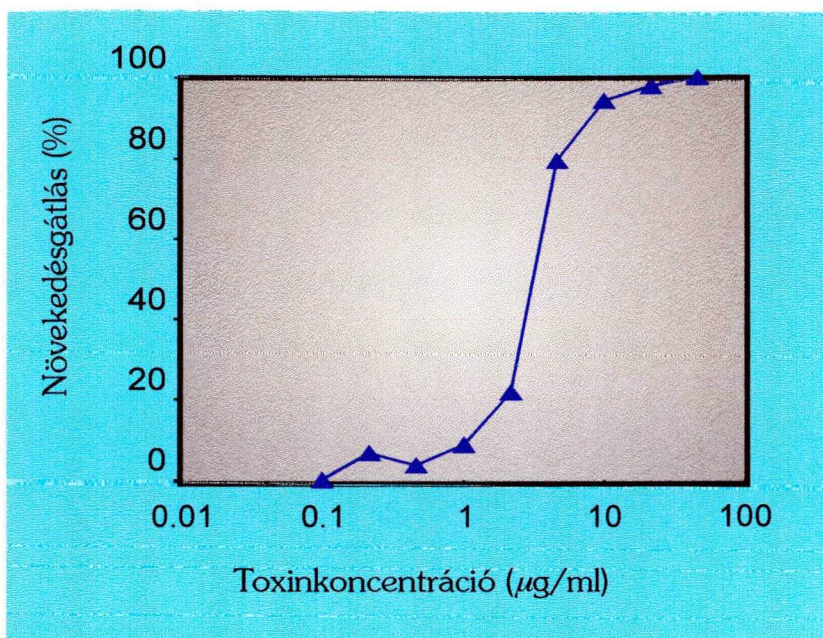
A mikrocisztin a *Medicago sativa* növekedését is gátolja. 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnál a csíranövények elhalnak, 50 $\mu\text{g/ml}$ -nél fejlődésük lassú és morfológiailag rendellenes.



16. ábra A toxin hatása a lucerna növekedésére

4.2.2.2. *A Sinapis alba* csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében

A később (4.4.1. fejezetben) részletezendő okokból a cianotoxinok hatását leginkább a mustár (*Sinapis alba*) csíranövényein vizsgáltuk. Az általunk megvizsgált fajok közül ez bizonyult a legérzékenyebbnek, ugyanakkor a kontroll növények hossza csak 1-2 % szórást mutatott. Az 50 %-os növekedés gátlást előidéző koncentráció (IC_{50}) 3 $\mu\text{g/ml}$ körül van (17. ábra). Többszörös ismétléssel, szűkebb koncentráció tartományok vizsgálata alapján az IC_{50} 2,7 $\mu\text{g/ml}$ -nek adódott. A két fő komponens (α és β) toxicitása azonosnak mutatkozott. Ezt követően a minták toxicitását a mustár magokra ill. a csíranövények növekedésére gyakorolt hatás alapján értékeltük.



17. ábra A toxin β komponensének hatása a mustár csíranövények növekedésére

A cianotoxinoknak a csíranövények növekedésére gyakorolt gátló hatása a fentiek alapján nem kétséges. Felmerült azonban a kérdés, hogy a mikrocisztin az egyszikű növények növekedését is gátolja-e, és az, hogy a fénynek van-e szerepe a gátló hatás kialakulásában. Ezen kérdések megválaszolására búza csíranövényeket neveltünk cianotoxinok jelenlétében fényen és sötétben.

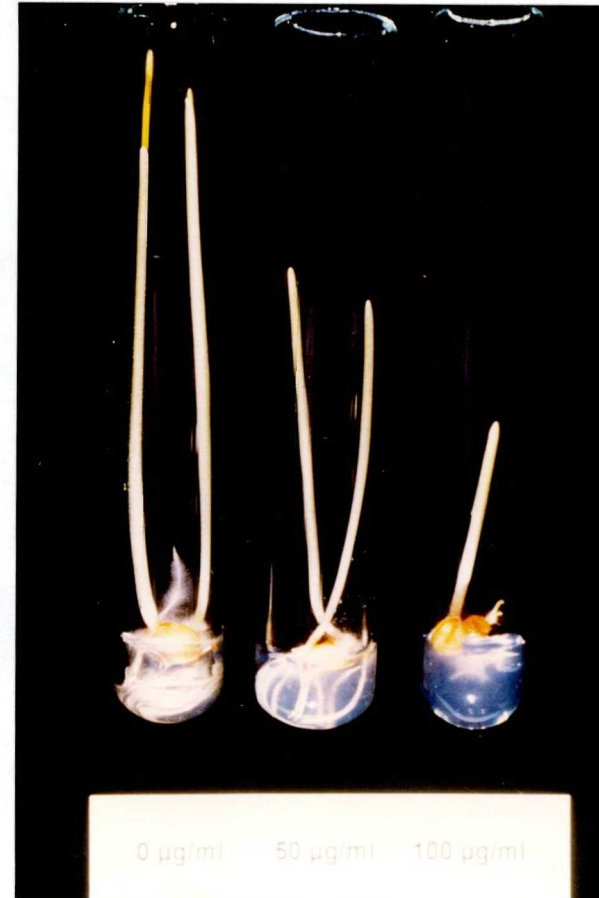
4.2.2.3. A *Triticum aestivum* csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében

A búza (*Triticum aestivum*) szemtermése nagyobb a lucerna- és mustár magnál, ezért 1 ml tápoldatra csak 2 szemet vetettünk. Amint azt a 18. ábra mutatja, a mikrocisztin növekedés gátló hatása mind fényben, mind pedig sötétben nevelt csíranövényeken jelentkezik, közel azonos mértékben.

a.)



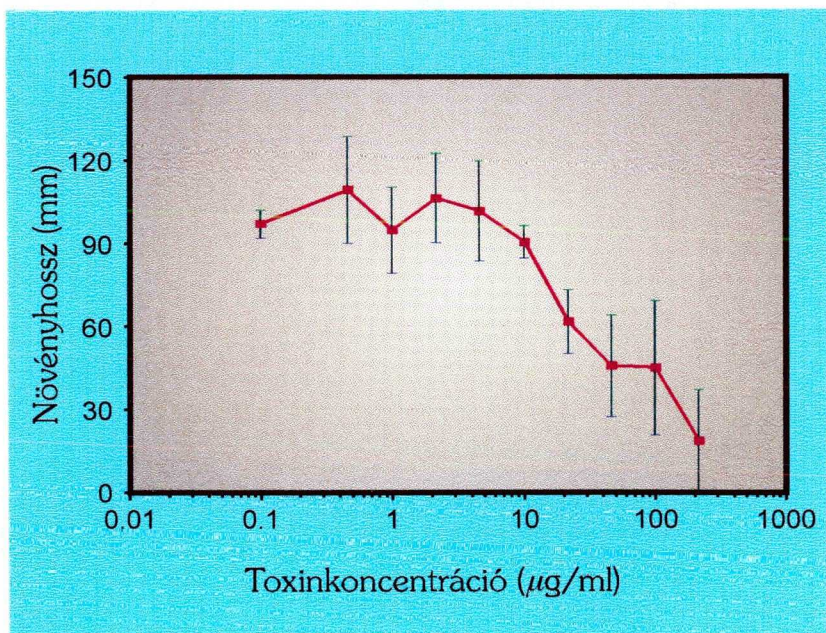
b.)



18. ábra A mikrocisztin hatása fényben
(a) ill. sötétben (b) nevelt búza
magoncok növekedésére

Az egyes növényfajok mikrocisztin érzékenysége jelentősen különbözik. Az összehasonlítás érdekében a 19. ábra az IC_{50} meghatározását mutatja búzával. Érdeemes megfigyelni, hogy

- a búza csíranövények mikrocisztin érzékenysége hozzávetőleg egy nagyságrenddel kisebb ($IC_{50} \geq 30 \mu\text{g/ml}$), mint a mustáré ($IC_{50} = 2,7 \mu\text{g/ml}$), és
- a búza koncentráció-érzékenysége is kisebb a mustárénál. Míg a mustárnál a növekedés gátlás mintegy 90 %-a a toxin koncentrációjának egy nagyságrendnyi változására esik, addig a búzánál ilyen koncentráció arányra (az IC_{50} környezetében) a változásnak csak mintegy fele esik.

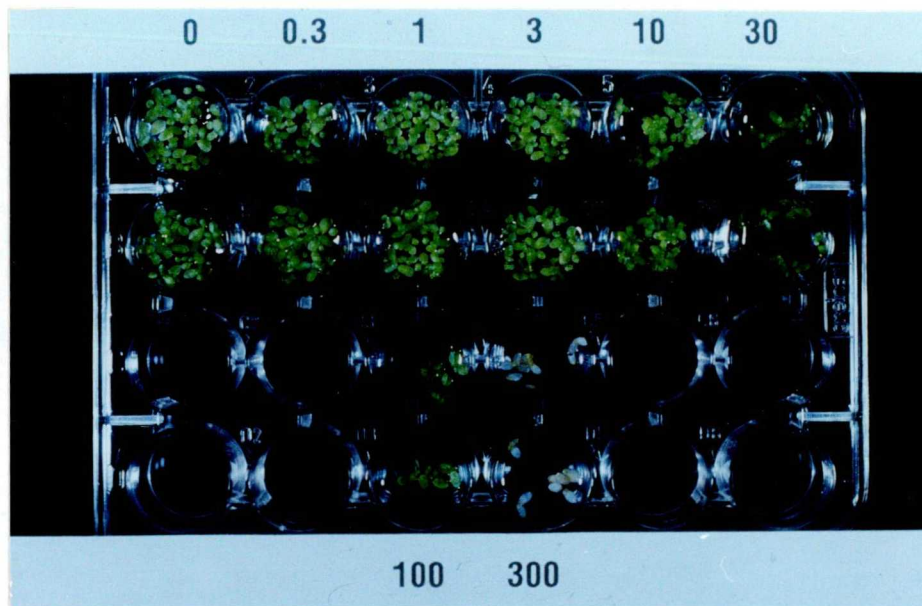


19. ábra Az IC_{50} meghatározása búza csíranövényekkel

4.2.2.4. A *Lemna minor* növekedése cianotoxinok jelenlétében

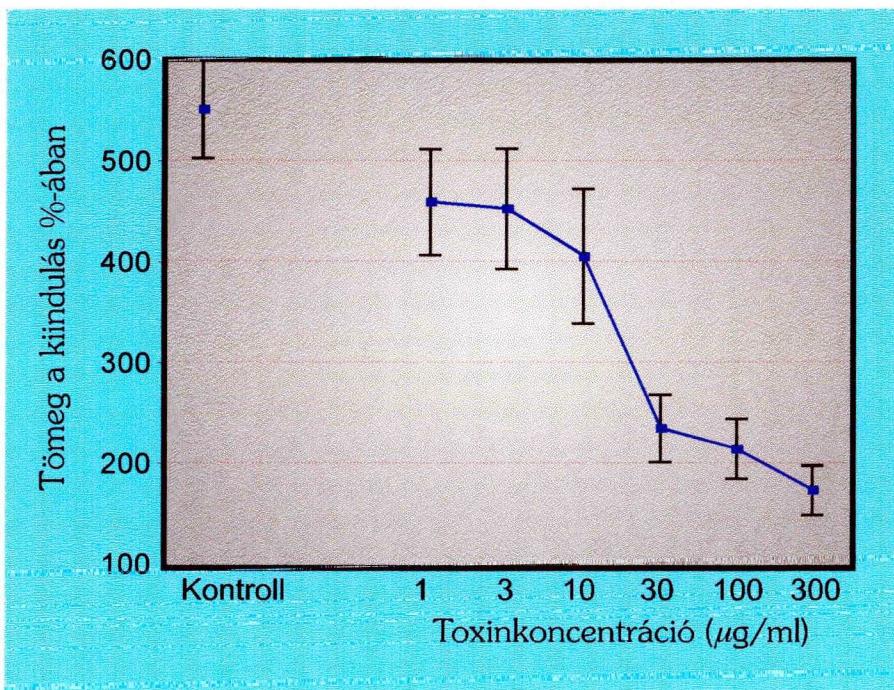
Az eddig említett növényfajok mint modellek szerepelhetnek a *Microcystis aeruginosa* és a növények kölcsönhatásának tanulmányozásához. A probléma ökológiai megközelítése érdekében a mikrocisztin hatását a vízi életközösségekben

előforduló növényekkel is megvizsgáltuk. Ezúttal is mind egyszikű, mind pedig kétszikű növényt választottunk modellként. A kísérleti objektumok kiválasztása során több fajjal próbálkoztunk (mint pl. süllőhínár, vízi pestis, nád stb.), de az előkísérletek során komoly technikai nehézségekkel találkoztunk. A magok gyűjtésével, sterilizálásával és csíráztatásával kapcsolatban is nehézségek mutatkoztak, a növények ill. a magok mérete is problémát okozott. Végül a békalencsét (*Lemna minor*) választottuk kétszikű modellnövénynek. A növényeket olyan tápoldatokban tartva, amelyek a mikrocisztint különböző koncentrációban tartalmazzák megfigyelhetjük a toxinnak a békalencse növekedésére gyakorolt gátló hatását (20. ábra). Az 50 %-os gátlás 20 $\mu\text{g/ml}$ körüli értéknél jelentkezik (21. ábra).



20. ábra A mikrocisztin hatása a békalencse növekedésére

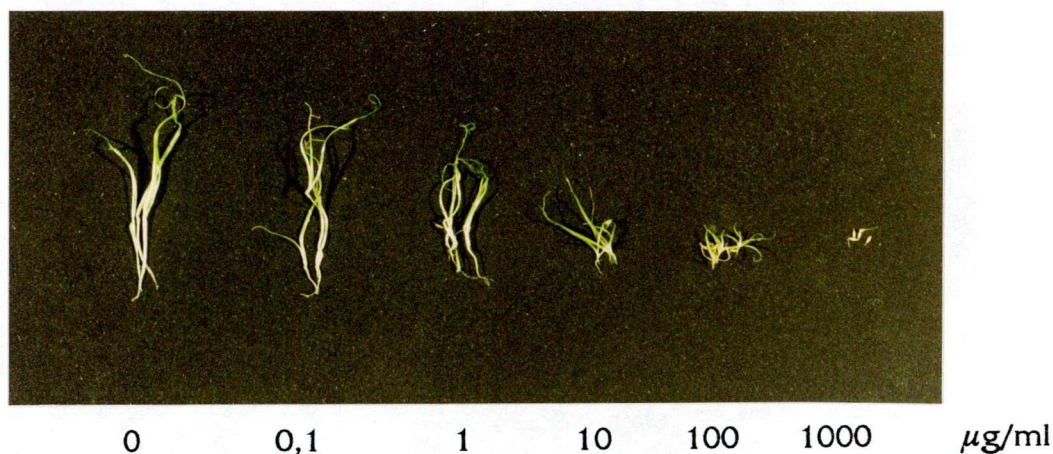
Az alkalmazott toxinkoncentrációt $\mu\text{g/ml}$ egységekben tüntettük fel.



21. ábra Az IC₅₀ meghatározása békalencsével

4.2.2.5. A *Typha sp.* csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében

A vízi ökoszisztémákban előforduló egyszikű modellnövényünk a gyékény (*Typha sp.*) volt. A cianotoxinok növekedés gátló hatása itt is kifejezett és egyértelmű (22. ábra).

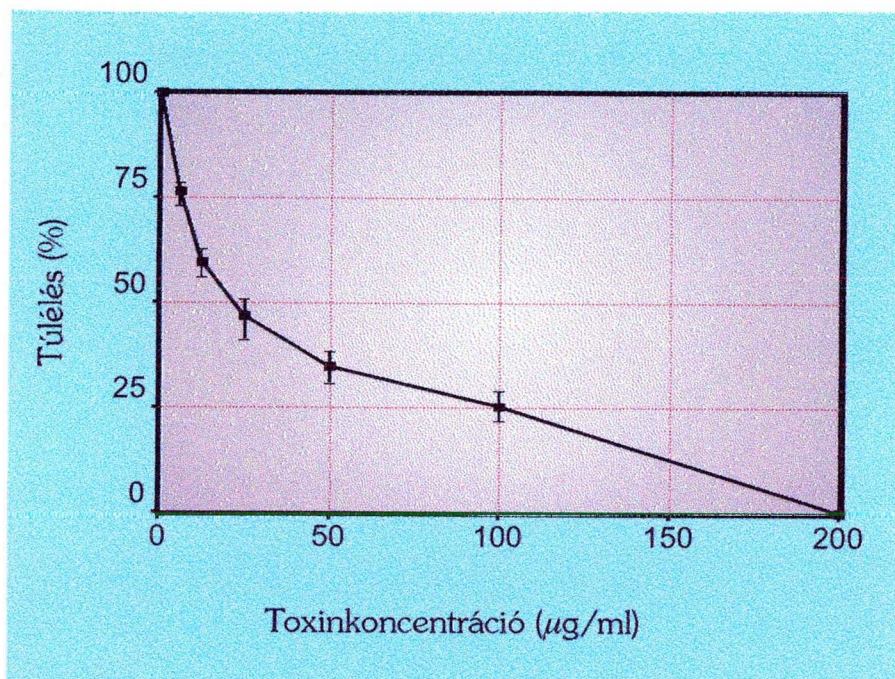


22. ábra A mikrocisztin hatása a gyékény csíranövények növekedésére

A csíranövények alatt az alkalmazott mikrocisztin koncentrációkat tüntettük fel

4.2.3. A mikrocisztin hatása a *Drosophyla melanogaster* lárvákra

Egyes rovarok (legyek, szúnyogok, szitakötők stb.) életciklusuk egy részét (vagy egészét) vízben, a tavak sekély, parti részeiben, pl. a nádasokban töltik. Vízirágzások során az ilyen helyeken halmozódik fel nagy mennyiségben a *Microcystis aeruginosa*, így ezek a rovarok (rovarlárvák), amelyek egy része a planktonnal táplálkozik, a mikrocisztin viszonylag nagy koncentrációjának van kitéve. Felvetődik a kérdés, hogy milyen hatást gyakorolnak a cianotoxinok ezen szervezetek növekedésére. Modellként a muslica (*Drosophyla melanogaster*) lárváit választottuk, megvizsgáltuk a toxin hatását e lárvák életképességére. Különböző toxinkoncentrációjú tápon keltetve a muslica petéket, a lárvák kikelését követő harmadik napon a következő eredményeket kaptuk: növekvő toxinkoncentrációk mellett a lárvák életképessége csökken (23. ábra), és 200 µg/ml felett egyetlen lárva sem maradt életben. Az ábráról leolvasható, hogy az 50 %-os letális koncentráció (LC₅₀) 22 µg/ml körül van.

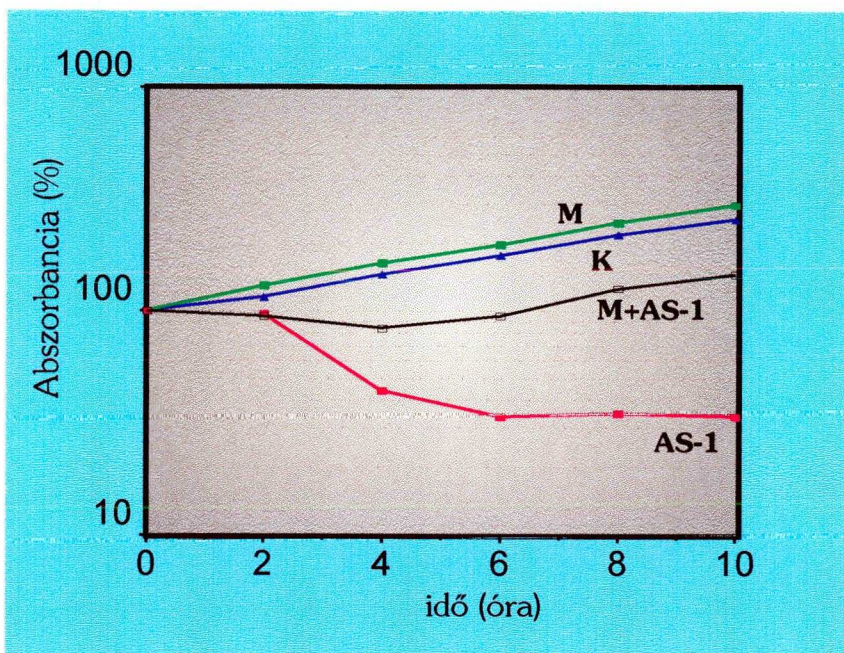


23. ábra A toxin hatása a *Drosophyla melanogaster* lárvák életképességére

4.3. A toxin hatása a vírusok szaporodására

4.3.1. A toxin hatása a cianobaktérium – cianofág rendszerre

Az AS-1 fágok hatására a *Synechococcus* sp. sejtek lizálnak, ami a tenyészet turbiditásának mérésével könnyen követhető. Toxin hozzáadása a cianobaktérium kultúrához a kontroll sejtek növekedését nem befolyásolja jelentősen. Toxin tartalmú tenyészetben a cianofágok nem lizálják a sejteket, ezek néhány órás stagnálás után ismét növekedni kezdenek (24. ábra).

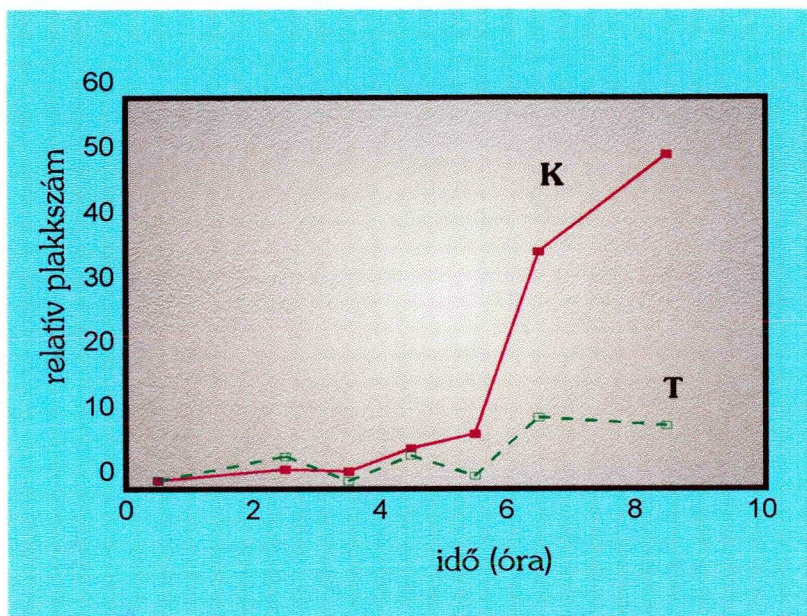


24. ábra A *Synechococcus sp.* lízisének gátlása

A jelölések: **K**: kontroll tenyészet, **M**: 250 $\mu\text{g/ml}$ mikrocisztin, **AS-1**: cianofág

Ha a jelenséget plakkszámolás útján követjük, az eredmény a következő: a kontroll sejtek fertőzése után kb. öt órával a cianofágok első generációjának kiszabadulásával a tápoldatban növekszik a plakképző egységek száma, majd több fágciklus lezajlása után ez nagyságrendekkel meghaladja a kiindulási értéket. Ezzel szemben a mikrocisztint tartalmazó tápoldatban a plakkszám nem változik jelentősen (25. ábra).

Mindkét módszerrel szembetűnő és egyértelmű a mikrocisztin gátló hatása az AS-1 fágok szaporodására.



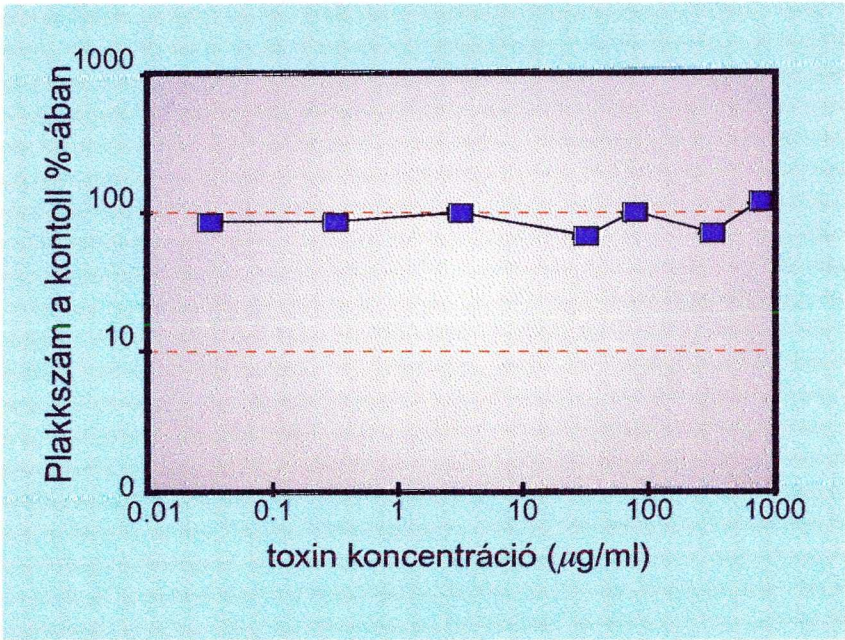
25. ábra A mikrocisztin hatása az AS-1 fágok fejlődésére

A kontroll (K) és 250 $\mu\text{g/ml}$ toxint tartalmazó tápoldatban (T) fertőzött *Synechococcus sp.* tenyészetek plakkképző egységeinek számát határoztuk meg.

4.3.2. A toxin hatása az *E. coli* baktérium – λ fág rendszerre

A fentiek alapján egyértelmű, hogy a mikrocisztin az AS-1 cianofágok ciklusát gátolja. Ökológiai szempontból igen lényeges kérdés, hogy ez a hatás mennyire specifikus, csak a cianobaktériumok vírusaira korlátozódik-e, vagy más baktériumokat is megvédi a bakteriofágok támadásától. E kérdés megválaszolására a fentihez hasonló kísérletet végeztünk *E. coli* – λ fág rendszerben. Különböző mikrocisztin koncentrációk mellett λ faggal fertőztük a baktériumtenyészeteket, majd lemezre szélesztve

meghatároztuk a képződött plakkok számát. Amennyiben a cianotoxin a λ fágok szaporodását is gátolja, az ehhez minimálisan szükséges koncentráció fölött a plakkok száma jelentősen, legalább egy nagyságrenddel elmarad a kontrolltenyészethez képest. Ez azonban még 1 mg/ml koncentrációnál sem volt megfigyelhető. Eszerint a mikrocisztinnak a cianofágok szaporodására kifejtett gátló hatása specifikus.



26. ábra A mikrocisztin hatása a λ fágok fejlődésére

4.4. A mustárteszt kidolgozása

4.4.1. A mustár kiválasztása

A toxikus hatás vizsgálatára több növényfaj kipróbálása után a mustár bizonyult a legmegfelelőbbnek. Itt a következő szempontokat tartottuk szem előtt:

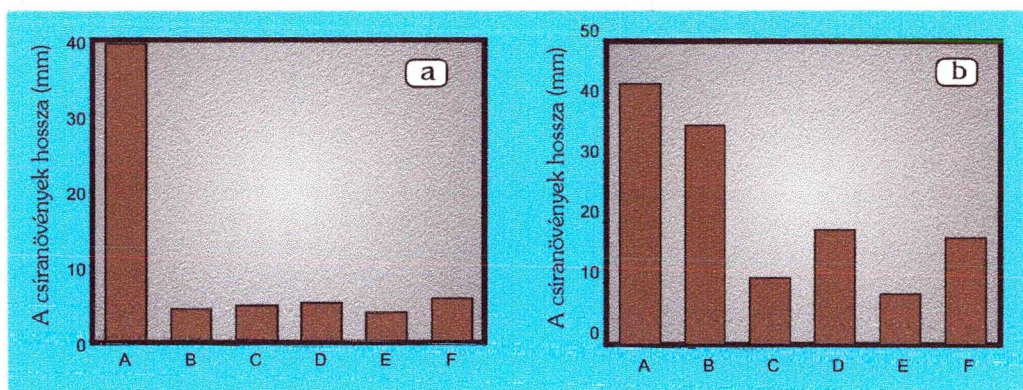
- Állandó minőségű, jól csírázó magokat egyszerű legyen beszerezni. Emiatt szinte kizárólag a kultúrnövények jöhetnek számításba.
- A magoncok a vetéstől számított legrövidebb időn belül ériék el a mag méretének kb. 50-szeresét, amikor a csíranövény hossza már jól mérhető.
- A magok mérete megfelelő legyen, mert a túl nagy magvak viszonylag nagy térfogatú táptalajt igényelnek, és emiatt az érzékenység nem ideális. A túl kicsiny magvak pedig nagyon érzékenyek az egyéb környezeti tényezőkre is, emiatt a nagy szórás következtében a kísérleti eredmények nem értékelhetők ki elég pontosan, ráadásul a kis magvak nehezen kezelhetők.
- A magok felszíne lehetőleg sima legyen, mert a rücskös, vagy szőrös magokat nehezebb sterilizálni.

4.4.2. A toxin hőstabilitása

A magokat a teszt során a toxinmintát tartalmazó, agarral szilárdított tápoldatra vetjük. Ennek előállítása csak melegen lehetséges, ezért a toxinmintát mindenképpen egy (az alkalmazott módszertől függő) hőhatás éri a teszt előkészítése során. Amennyiben ez a hőhatás a toxint ill. a toxikus hatást befolyásolja, a módszer nem használható. Meg kell jegyezni, hogy az a tény, hogy a tisztított toxin termikusan stabil, még önmagában nem elegendő, ha a minta teljes sejteket, tenyészetet, esetleg vízmintát stb. tartalmaz, ahol a toxin számos más ágenssel fizikai ill. kémiai kapcsolatba kerülhet a hő hatására.

Megvizsgáltuk ezért a hő hatását a tisztított mikrocisztin és *Microcystis aeruginosa* sejtek toxicitására. Ehhez a mintákat 70 és 100 °C-on tartottuk 5 ill. 60 percig. A toxicitás vizsgálatára a mustártesztet (ld. 4.3. fejezet) alkalmaztuk.

A 10 $\mu\text{g/ml}$ tisztított toxint tartalmazó táptalajra vetett magokból nem fejlődött növény, függetlenül attól hogy a toxin kapott-e előzőleg hőkezelést (27. ábra A). Vagyis a kezelt minták toxicitása nem tér el jelentősen a kezeletlenétől, és ez még az egy órán keresztül 100 $^{\circ}\text{C}$ -on tartott mintára is vonatkozik. A teljes sejtek toxikus hatása ötperces hőkezelés hatására jelentősen megnövekedett, 100 $^{\circ}\text{C}$ -on kissé nagyobb mértékben, mint 70 $^{\circ}\text{C}$ -on. A további hőkezelés a toxicitást csökkentette (27. ábra B).



27. ábra A mikrocisztin termostabilitása

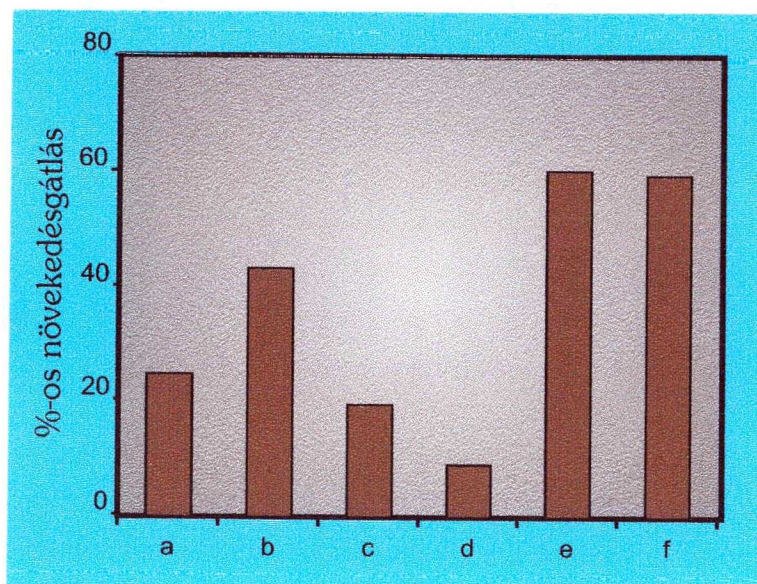
Az egyes oszlopok jelölése a következő: A: mikrocisztin nélkül nevelt kontroll; B: hőkezelés nélkül toxinnal (a) illetve *Microcystis aeruginosa* tenyésztettel (b); C: 70 $^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig, D: 70 $^{\circ}\text{C}$ -on 60 percig, E: 100 $^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig, F: 100 $^{\circ}\text{C}$ -on 60 percig kezelt mintákkal kiegészített táptalajon csíráztatott *Sinapis alba*

4.4.3. A fagyasztás és a szonikálás összehasonlítása a cianotoxinok kivonása során

Meriluoto és munkatársai úgy találták (112), hogy az ultrahangos kezelés nem károsítja a mikrocisztin molekulákat, és felvetették, hogy toxinnak a sejtől való kijuttatása elősegíthető ultrahangos kezeléssel. Ezt a módszert alkalmaztuk a kutatásaink első szakaszában

A teszt során a táptalajból felszívott toxinnak a csíranövény növekedésére gyakorolt hatását vizsgáljuk. Amikor a vizsgálandó mintánk teljes és ép sejteket tartalmaz, mint pl. vízminták és laboratóriumi sejtenyészetek vizsgálatakor, gondoskodnunk kell róla, hogy a toxin a sejtekből kiszabadulva a közegbe jusson. A sejtek feltárását eredetileg ultrahangos kezeléssel végeztük. A kezelés időtartamának változtatása a toxicitásban nehezen reprodukálható változásokat eredményezett. Emiatt a sejtek feltárására más módszert kerestünk, megvizsgáltuk a fagyasztás hatását az extrakció hatékonyságára, minthogy ezt a módszert a sejtek feltárására más esetekben jó eredménnyel használtuk. A fagyasztás során ugyanis a növekedő jégkristályok megrongálják a sejt falát és membránjait.

A szonikálás és a fagyasztás, mint alternatív megoldás összehasonlítására azonos mennyiségű (250 μ l) sejtuszpenziót e két módszerrel kezeltünk, majd a sejtek eltávolítása (centrifugálás) után vizsgáltuk a felülúszó toxicitását mustárra. Amint azt a 28. ábra mutatja, az ultrahangos kezelés nem növelte jelentősen a toxicitást, vagyis az oldatban a gyökerek számára hozzáférhető toxinmennyiséget, sőt, egy hosszabb ultrahangos kezelés után csökkent az effektív toxintartalom. A sejtek lefagyasztásának hatására azonban jelentősen megnövekedett a felülúszó toxintartalma. A cianotoxinok mennyiségének az ultrahangos kezelés során bekövetkező csökkenését valószínűleg a toxin tapadása okozhatja az Eppendorf-cső falához, esetleg valamilyen fizikai-kémiai folyamat, ami a nyers kivonatban a kezelés során az egyéb sejtalkotókkal lejátszódik, tisztított toxinnal nem következhet be (112).



28. ábra Az ultrahangos kezelés és a fagyasztás hatásának összehasonlítása

Az egyes oszlopok jelölése a következő: a: kezeletlen kontroll sejteket; b: 1 perc szonikálással, c: 5 perc szonikálással, d: 60 perc szonikálással, e: -70°C -ra lefagyasztott, f: -70°C -ra $2\times$ lefagyasztott, majd 1 perc szonikálással előkezelt sejteket tartalmazó táptalajon nevelt növények növekedésének relatív gátlása

A lassú fagyasztás (hűtőszekrényben, -20°C -on), ahol viszonylag nagyobb kristályok képződnek, elvileg előnyösebb lehet a sok apró, és nem növekvő kristálygóc kialakulásával járó gyors fagyasztásnál (folyékony nitrogénben), de mivel más esetben ez utóbbi is kielégítő eredményt adott, ezt a különbséget nem vizsgáltuk.

Vízminták vizsgálata során, amikor a minta baktériumokat, gombákat és ezek szaporító képleteit is tartalmazhatja, a lefagyasztás ezeket nem pusztítja el teljes egészében. A mustár magoncok fejlődését az ilyen fertőzés nagyban befolyásolhatja. Amennyiben a fagyasztást követően a mintákat 5 percen át 100 °C-on tartjuk, a fertőző ágensek szerepe csökken. Ráadásul a fagyasztást követő forralás a már sérült sejtfal szerkezet további denaturálódásához vezet, így a toxinok könnyebben (adott idő alatt nagyobb arányban) kiszabadulhatnak a sejtekből.

A fentiek miatt a mustár-tesztben a sejtek feltárását úgy végeztük, hogy a mintát kétszer lefagyasztottuk, 5 percre 100 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd ezután elegyítettük az agaróz tartalmú, felmelegített tápoldattal, és annak megszilárdulása után vetettük el a sterilizált magokat.

A cianotoxin preparálásnál a fentiekhez képest mintegy 3 nagyságrenddel nagyobb térfogatú mintát, ill. 4,5 nagyságrenddel több sejtet szonikálunk azonos berendezésben (jellemzően 1-1,5 l sejtuszpenziót a 250-500 µl-es mintákkal szemben). Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a fagyasztás ilyen méreteken is megfelelő módszer az extrakció hatékonyságának növelésére, 400 g vizes sejtüledéket kettéosztottunk, és az egyik felét kétszer lefagyasztottuk, majd 4 °C-on 3·1 órán keresztül extraháltuk a 3.4.1. fejezetben leírtak szerint. A sejtek másik felét lefagyasztás nélkül szonikáló fürdőben kevertettük a késes homogenizátorral. Az extraktumokat három-három, sorba kötött C-18 CRTG-on tisztítottuk, majd HPLC-n analizáltuk. A kromatogramokat integrálva azt tapasztaltuk, hogy a kísérleti hibán túl a két módszerrel kapott anyagmennyiségek nem különböztek egymástól. Eszerint a fagyasztás itt sem adott rosszabb eredményt, mint a szonikálás.

A sejtek lefagyasztása térfogattól és a laboratóriumok felszereltségétől függetlenül egyszerű, viszonylag jól reprodukálható, így ez a módszer sokkal kényelmesebbnek, megbízhatóbbnak tekinthető, és éppen olyan hatékony, mint az ultrahangos kezelés. Az előbbieket miatt a tisztítási eljárásban ezt a lépést alkalmaztuk.

4.4.4. A táptalaj térfogata

A teszt érzékenységét a legalacsonyabb még kimutatható koncentráció szerint és a legkisebb még kimutatható toxinmennyiség alapján is értékelhetjük. A táptalaj térfogata adott koncentráció mellett az utóbbi értéket befolyásolja. Az ideális térfogatot 1,4 cm belső átmérőjű kémcsőben 1 ml-nek találtuk. Ennél kisebb térfogatú táptalajnál előfordul, hogy a csíranövények gyökere a táptalajt megemeli. Ez 0,5 ml alatt a növényhosszak szórásának megnövekedését eredményezi.

Három csíranövényre számolva tehát minimum 0,5 ml táptalajt kellett alkalmazni a pontos meghatározás érdekében, ez $2,7 \mu\text{g/ml}$ koncentrációnál egyenként $0,45 \mu\text{g}$ toxin.

4.5. A toxin tisztítása

Az irodalomban számos módszer található a mikrocisztinek izolálására és tisztítására. Ezek kulcslépéseinek összehasonlításával illetve optimalizálásával megkíséreltük a lehető legegyszerűbb és leghatékonyabb eljárást kidolgozni.

4.5.1. Az extrahálószerrek összehasonlítása

A szakirodalomban található mikrocisztin tisztítási eljárások első lépése többnyire egy extrakció, amelyben a toxint egy többé-kevésbé szelektív oldószerbe viszik át, és így megszabadulnak a sejtalkotók igen jelentős részétől, amit az adott oldószer nem old (ha liofilizált sejtekből indulnak ki), illetve kicsap (folyadék fázisból kiindulva). Extrahálószerként leggyakrabban 20 % MetOH - 5 % ButOH (113) és 5 % ecetsav (114) használatos, de alkalmaznak még acetonnitrit, tiszta vizet (115,116) és Na_2CO_3 oldatot (38), 2M ecetsavat és híg sósavat (117) is.

A vizes extraktum a fehérjék és nukleinsavak jelentős részét is tartalmazza. Olyan mértékű tisztulást, amit szerves oldószerekkel kapunk, egy további lépés (pl. ammóniumszulfátos precipitáció) beiktatása nélkül nem tudunk elérni. Ezért ezt a módszert elvetettük.

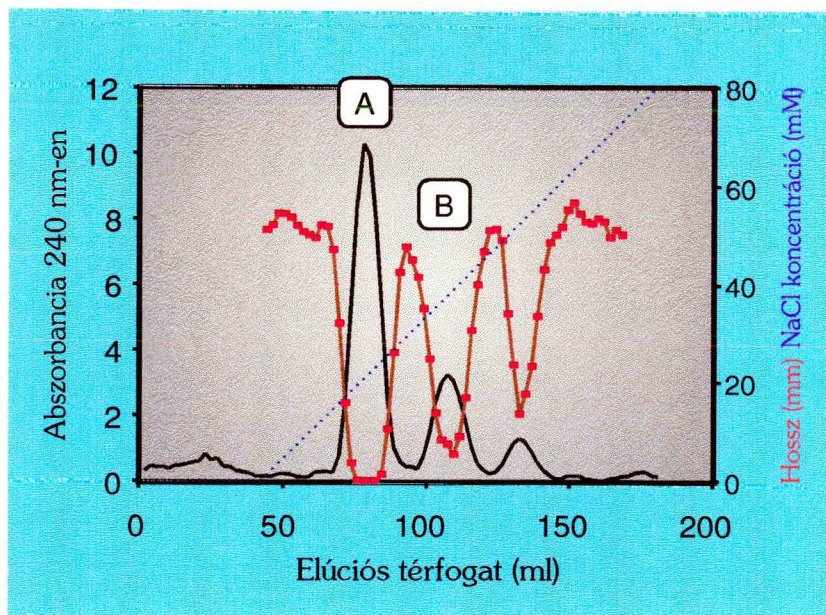
Az extrakció a kivonási eljárás első lépése. Az eljárás ezen fázisában viszonylag nagy anyagmennyiségekkel kell dolgozni. Ez több liter extrahálószer felhasználását jelentheti. Tekintettel arra, hogy az alkoholos és ecetsavas oldószer eleggyel kielégítő eredményeket értünk el, a drága acetonitriles extrakciót nem alkalmaztuk e célra; ezt inkább a minták gyors analízisekor használtuk.

A fentiek miatt az alkoholos és az ecetsavas extrakciót hasonlítottuk össze. Mindkettő igen szelektívnek bizonyult a cianotoxinoknak a makromolekuláktól való elválasztásában. A metanolos-butanolos extraháló elegy viszonylag nagy mennyiségű pigmentet is kivon a sejtekből, de ettől a következő lépésben sikerült megszabadulni. Azonban az elegyből nehéz volt a sejteket eltávolítani, mivel nagyon rosszul ülepedett még 10 000 g centrifugálás során is. Szűrés pedig a ragacsos nyálkaburok miatt nem jöhet szóba. Ezzel szemben az ecetsavas extrakciónál a fenti probléma nem jelentkezett, könnyű kezelhetőség mellett jó szelektivitást tapasztaltunk igen olcsó extraháló szerrel, így a későbbiek során ezt a módszert alkalmaztuk.

Az ecetsavas extraktumból a cianotoxinokat C-18 szilárdfázisú extrakcióval nyertük ki. Az irodalomban közölt (114) módszer lényeges változtatására nem volt szükség. E lépés után a preparátum 90-92 %-ban tartalmazott toxikus komponenseket. Ezen komponenseket DE-52 oszlopkromatográfiával választottuk el egymástól és a szennyező komponensektől.

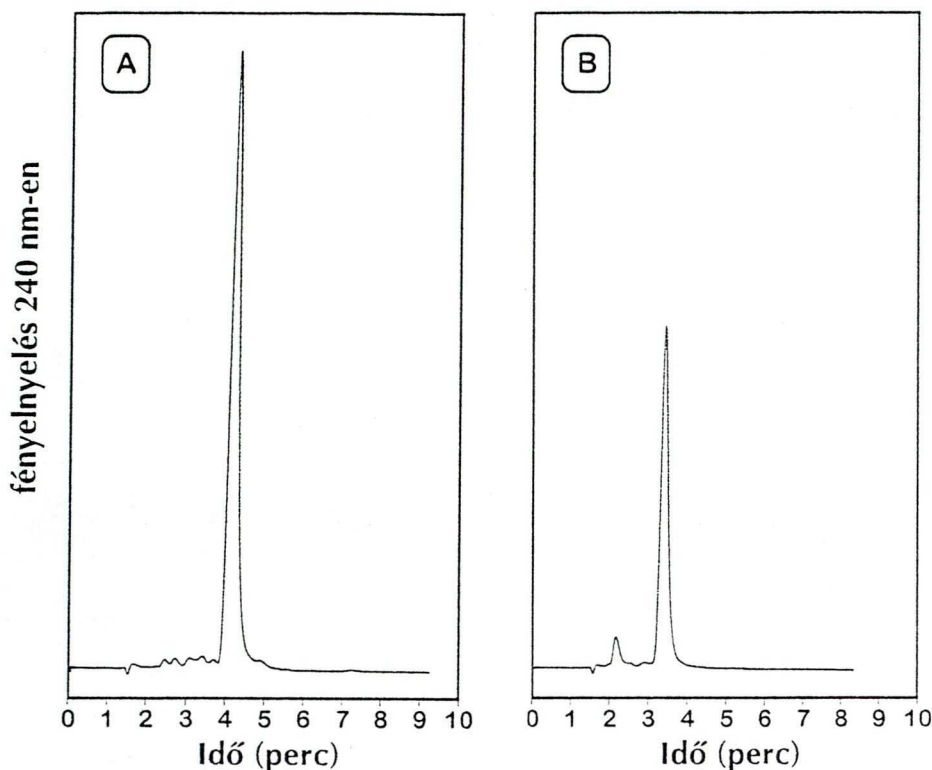
4.5.2. A DE-52 oszlopkromatográfia

A gyenge anioncserélő DE-52 oszlop egy kíméletes sógrádienssel igen jól (alapvonalon) elválasztotta a két toxint egymástól és a szennyező anyagoktól. A két komponens tisztaságát HPLC-vel ellenőriztük. A kromatogramok integrálása alapján becsült tisztaság 93-95 % (α) és 95-98 % (β) volt. A frakciók toxicitását mustárteszttel vizsgáltuk. Ehhez minden frakcióból azonos térfogatú alikvotot a mustármagok táptalajába kevertünk az agarral való szilárdítás előtt. A frakció táptalajba keverendő részének térfogatát úgy határoztuk meg, hogy 240 nm-en a legnagyobb abszorbanciájú frakcióból (ez a β komponens csúcsa) a táptalaj 1 ml-ébe kb. 0,5



29. ábra A toxínpreparátum DE-52 kromatogramja

A jelöletlen vonal a kromatogram frakcióinak abszorbanciája, négy-szögekkel az adott frakció részletét tartalmazó táptalajon nevelt csíranövények hosszát jelöltük. A betűvel jelölt csúcsok HPLC kromatogramja a következő ábrán látható

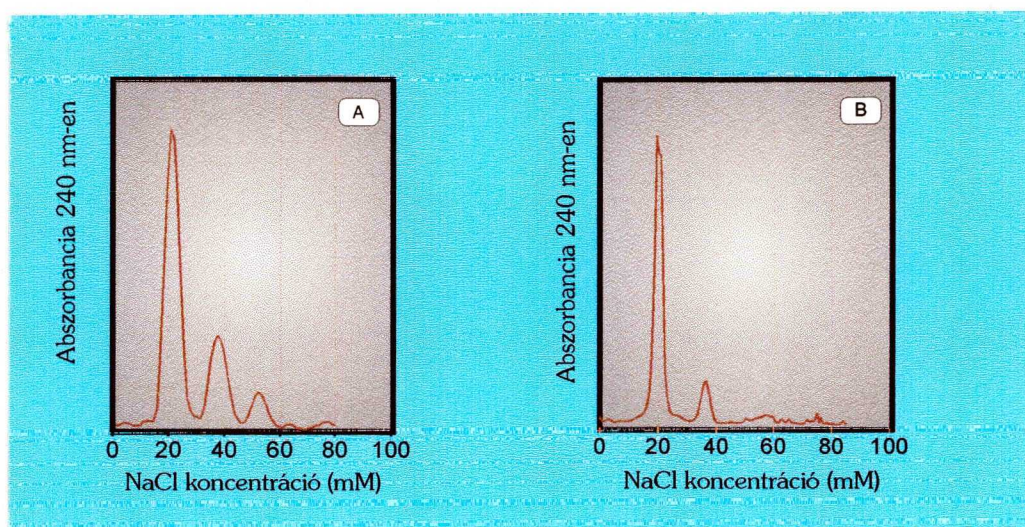


30. ábra A DE-52 oszloppal elválasztott toxinkponensek HPLC kromatogramja

abszorbancia egység jusson. Ez körülbelül $73 \mu\text{g/ml}$ -nek felel meg (ld. a 4.5.2.1. fejezetet), így várhatóan a nagy csúcs felszálló oldalán már a félérték elérése előtt ill. a leszálló ágban az után is teljes növekedésgátlást kapunk. A kisebb csúcsoknál is jól látható, kifejezett toxikus hatást figyelhetünk meg.

A 29. ábrán egy jellemző DE-52 kromatogram látható. Feltüntettük a frakciók sótartalmát és a mustártesztek eredményét is. Szembeötlő a növekedésgátlási- és abszorbancia csúcsok egybeesése. A megjelölt csúcsokból preparált toxinok HPLC kromatogramját a 30. ábrán tüntettük fel.

Az egyes komponensek elúciójához szükséges sókoncentrációk pontosabban olvashatók le, ha a DE-52 kromatogramot a sókoncentráció függvényében ábrázoljuk.



31. ábra A két toxinpreparátum összehasonlítása

Az A ábrán a BDS 243, a B-n a PCC 7820 jelű izolátumból tisztított mikrocisztin DE-52 kromatogramját tüntettük fel.

Ilyen ábrázolásmódban jól kitűnik a BGSD 243 (az általunk vizsgált *Microcystis aeruginosa* izolátum) β komponensének és a PCC 7820 fő toxinjának (MC-LR, ld. (117)) azonos viselkedése (31. ábra).

4.5.2.1. A preparatív HPLC

A DE-52 kromatográfiával tisztított minták toxintartalma a HPLC kromatogramok szerint 93-95 % (α) és 95-98 % (β) volt. Így általában nem volt szükség további tisztításra. Az anyagszerkezeti vizsgálatok és néhány kísérlet számára igyekeztünk lehetőleg még tisztább preparátumot előállítani. Preparatív HPLC fel-

használásával mintegy 40 %-os kitermelés mellett 98,9 %-ig (α) ill. 99,75 %-ig (β) sikerült eljutnunk.

A tisztított cianotoxin-oldatok koncentrációját legegyszerűbben 240 nm-en mért fényelnyelésük alapján ellenőrizhetjük, illetve számíthatjuk. Az ehhez szükséges extinkciós koefficienset (ε) mindkét főkomponensre tisztított és liofilizált preparátumból kiindulva határoztuk meg. Mindkét komponensre:

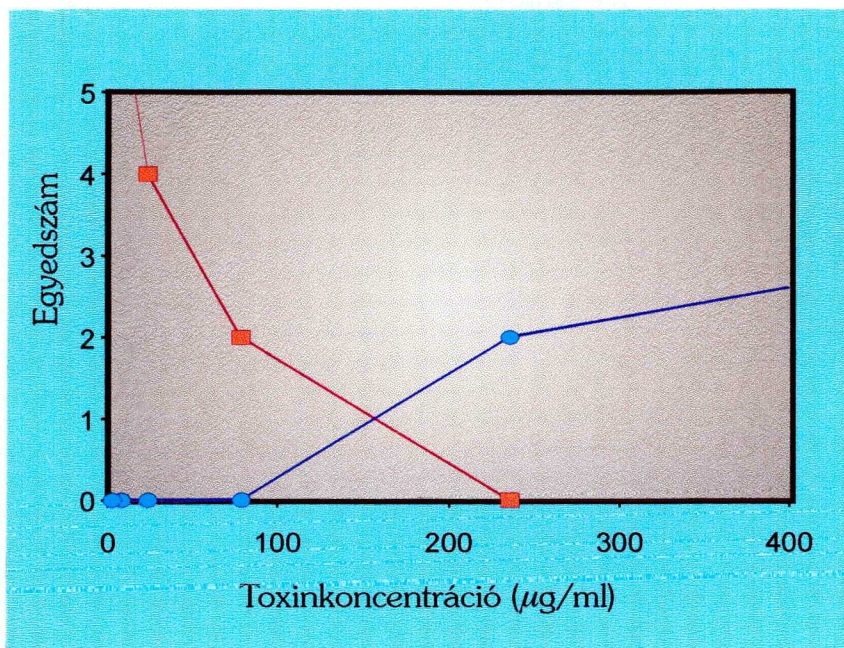
$$\varepsilon = 13,75 \text{ cm}^2/\text{mg} \pm 1 \% \quad \text{adódott.}$$

4.6. A toxin azonosítása

A toxin azonosításának alapvető része a toxicitás meghatározása. E tulajdonság ugyanis a tisztított komponensnek mind minőségi, mind mennyiségi szempontból fontos jellemzője. Az egérteszt eredményének bemutatása után a következőkben áttekintjük azokat az analitikai és anyagvizsgálati módszereket, amelyeket a cianotoxinok szerkezetének meghatározására és részben a tisztítás során a toxinkomponensek nyomon követésére használtunk. Felhívjuk a figyelmet ezen módszerek teljesítőképességének, felhasználhatóságának határaitra is, ezek miatt szükséges ugyanis, hogy több, egymástól alapvetően különböző módszer együttes alkalmazásával határozzuk meg a kérdéses cianotoxinok szerkezetét.

4.6.1. Az egérteszt

A toxicitás meghatározására hagyományosan az egérteszt a legelterjedtebb. Meghatároztuk a toxinpreparátumunk két fő összetevőjének toxicitását egértesztben (32. ábra). A két fő komponens toxicitása (egérre) nagyon hasonló, mintegy 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 20 g-os egérrel számolva ez kb. 3 $\mu\text{g}/\text{egér}$. A mintát 0,5 ml-es térfogatban injektáltuk az egerekbe, így az LD_{50} értékhez tartozó toxinkoncentráció (LC_{50}) 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



32. ábra A mikrocisztin toxicitása az egéresztben

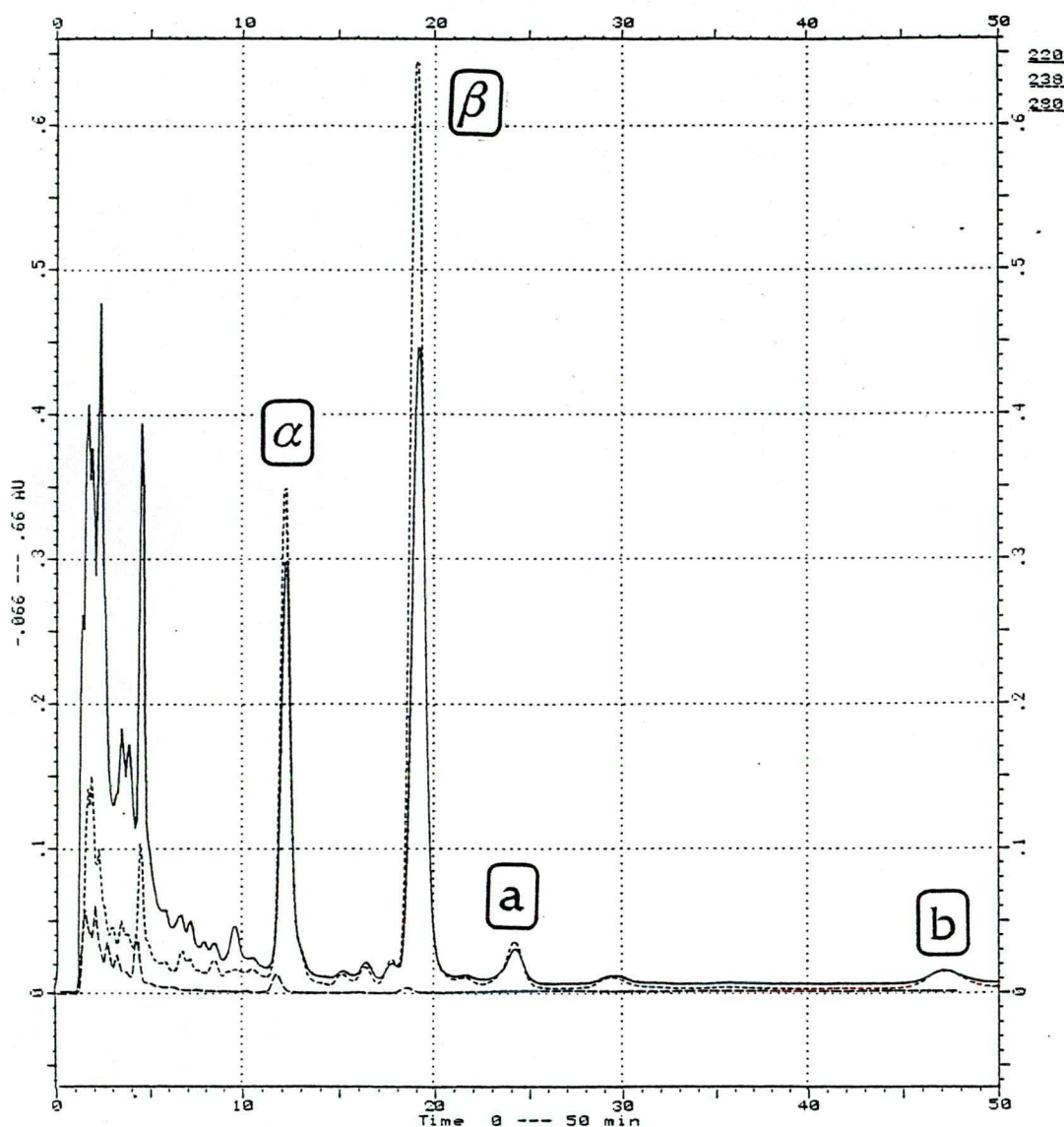
Kék színnel az elpusztult, pirossal a túlélő egyedeket jelöltük

4.6.2. HPLC

Az egyes anyagok abszorpciós csúcsai az UV tartományban viszonylag laposak, átfedőek, így a molekulák szerkezetére vonatkozóan más spektroszkópai módszerekhez viszonyítva kevés információt hordoznak. Azonban a spektrum alakja elfogadható indikáció lehet bizonyos molekulaszervezeti jellegzetességek meglétére illetve hiányára. Különösen hatékony lehet a módszer, ha egy kromatográfiás elválasztás során a komponenseket csoportokba kívánjuk sorolni UV spektrumuk vizsgálata alapján. Ilyen lehetőséget kínál a diódasoros detektorral felszerelt HPLC rendszer.

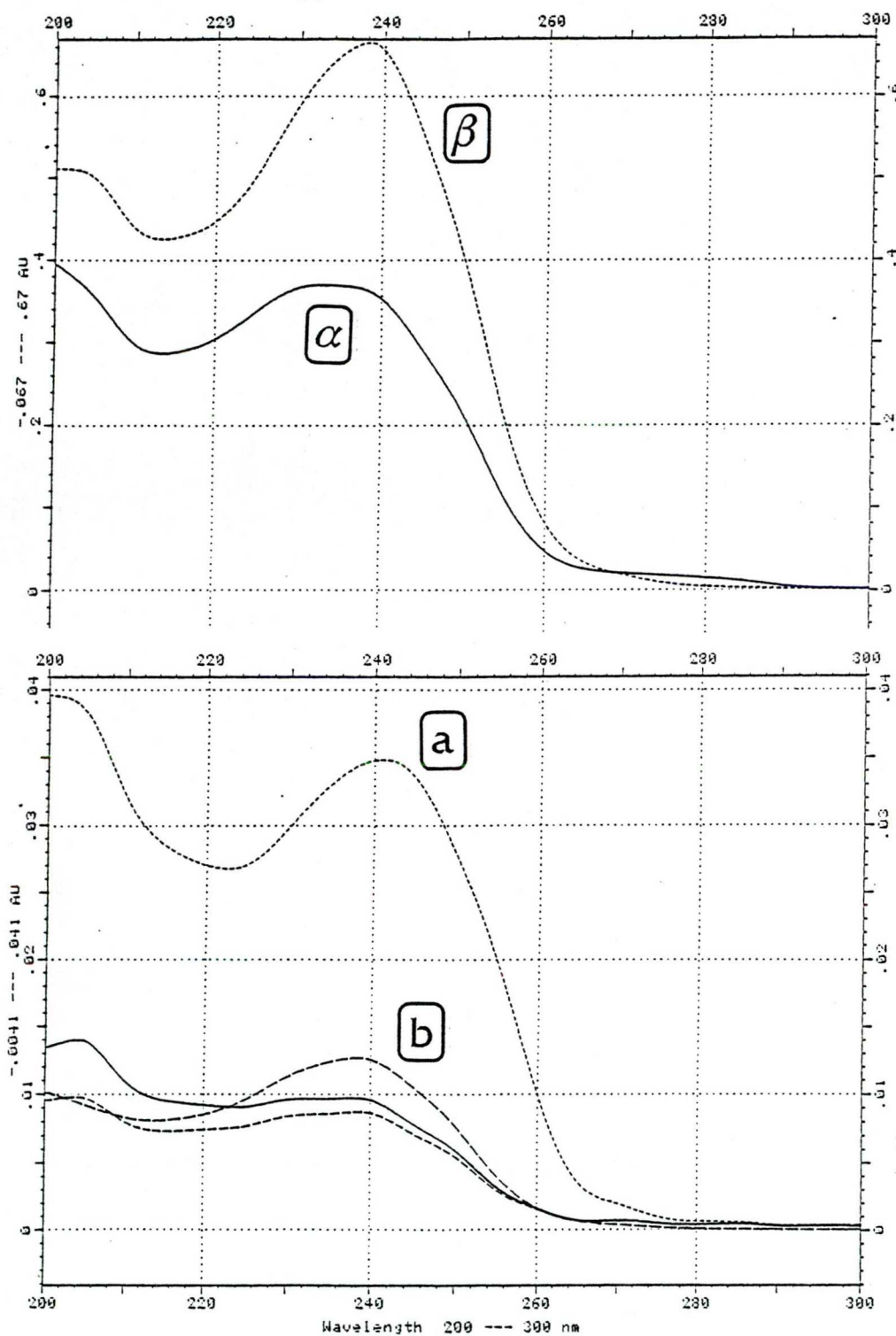
A 33. ábra a toxinpreparátum HPLC kromatogramja. A jelölt csúcsok UV spektrumát 200-tól 300 nm-ig tüntettük fel. Ezek közül csak a két legnagyobb

mennyiségben megjelenő komponenst tanulmányoztuk. Ezeket a HPLC kromatogramban elfoglalt sorrendjük nyomán α -val és β -val jelöltük.



33. ábra A toxinpreparátum HPLC kromatogramja

A jelölt csúcsok UV spektruma a 34. ábrán látható

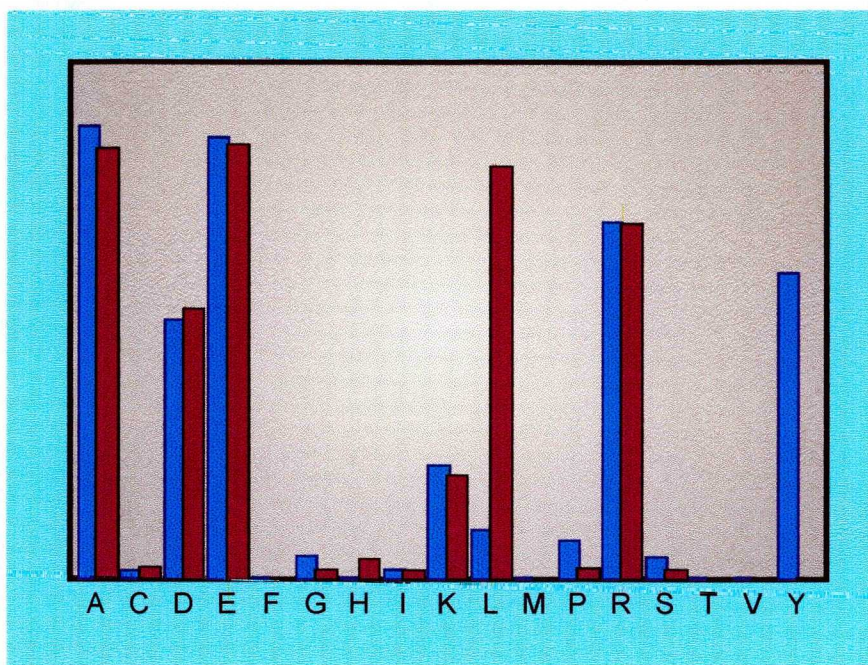


34. ábra A toxinpreparátum összetevőinek UV spektruma

4.6.3. Az aminosav analízis

A különböző mikrocisztin változatok a szokásostól eltérő aminosavakat is tartalmaznak, így egy rutin aminosav analízis segítségével a pontos aminosav összetételt nem tudhatjuk meg. E vizsgálat során ugyanis a peptidkötések elhidrolizálása után a hidrolizátum kromatográfiás szétválasztását követően a retenciós értékekből következtetünk a molekulát eredetileg felépítő aminosavakra, és a kalibrált görbe alatti területekből az aminosavak mennyiségi arányára. A módszer feltételezi, hogy az adott peptid (polipeptid) minden aminosav-összetevője ismert, és rendelkezni kell a megfelelő retenciós időekkel és terület-kalibrációkkal. Ha e feltétel nem teljesül, mert a szóban forgó peptid "nem szokványos" aminosavakat (pl. Dha, Mdha, MeAsp, ADDA) tartalmaz, akkor nem kizárt, hogy egy csúcsot nem azzal az aminosavval azonosítunk, amelyiktől az valójában származik. Az is előfordulhat, hogy egy "különleges" aminosav nem a vizsgált retenciós tartományban eluálódik az oszlopról. Emiatt a az aminosavak aránya sem feltétlenül kapható meg a kromatogram integrálásával. Így pl. a mai korszerű módszerek hiányában Bishop és mtsai. a hidrolizátum mólarányai alapján dekapeptidnek vélték a mikrocisztint (17).

A mikrocisztinek vizsgálatánál az aminosav analízis mégis alkalmas arra, hogy egy aminosav összetételt valószínűsítsen, elsősorban a változó aminosavak azonosításával, hiszen ezek általában szokványos, nem módosított aminosavak. A 35. ábrán a toxinpreparátum fő komponenseinek analízise szerint az α (kék színnel) és β (vörös színnel) komponens aminosav tartalmát tüntettük fel. Mindkét komponens tartalmaz arginint (R), a β komponens leucint (L) és az α tirozint (Y) is. Ezek együtt a mikrocisztin-LR és -YR szerkezetet valószínűsítik.

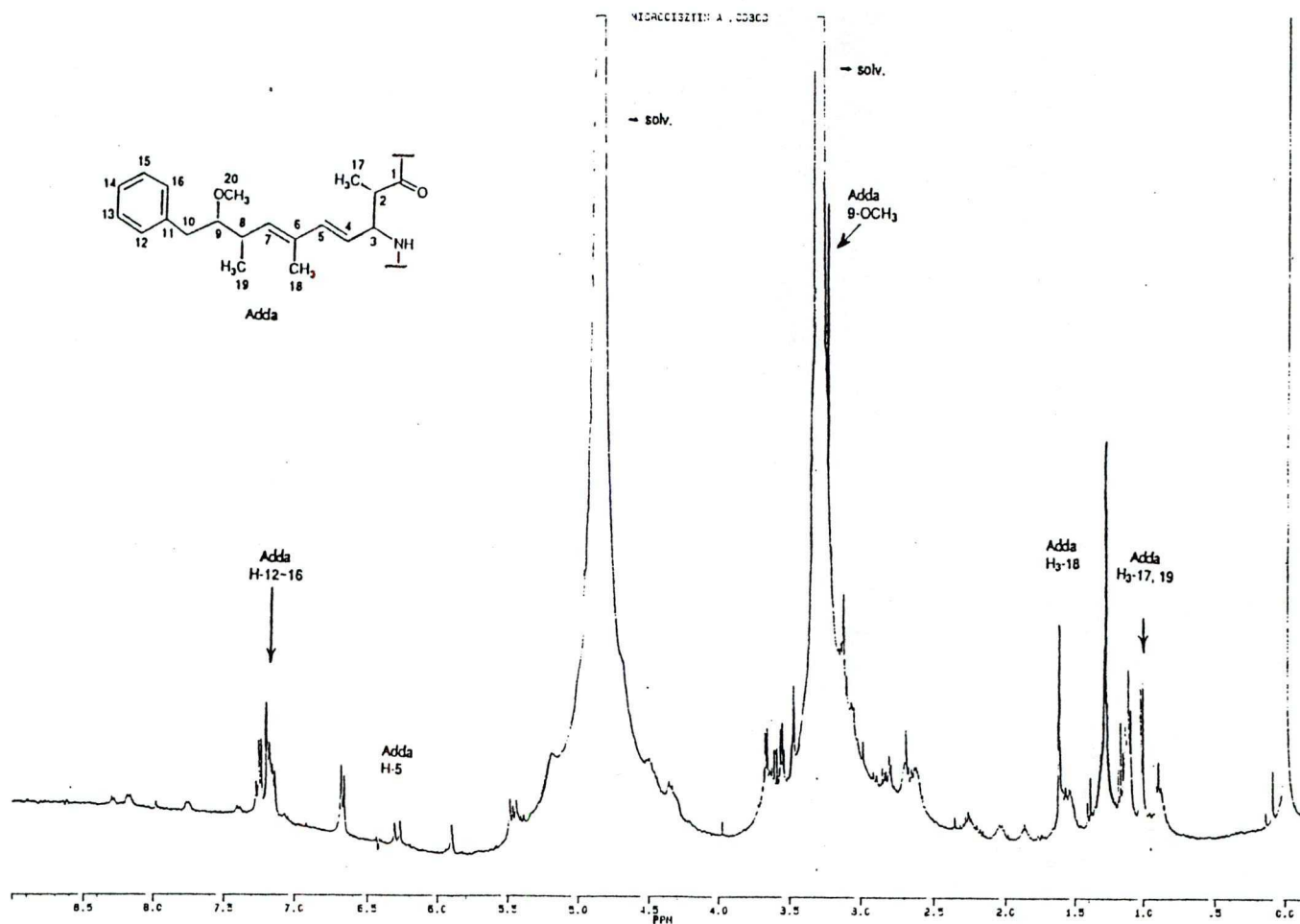


35. ábra A fő toxinkomponensek aminosav analízise

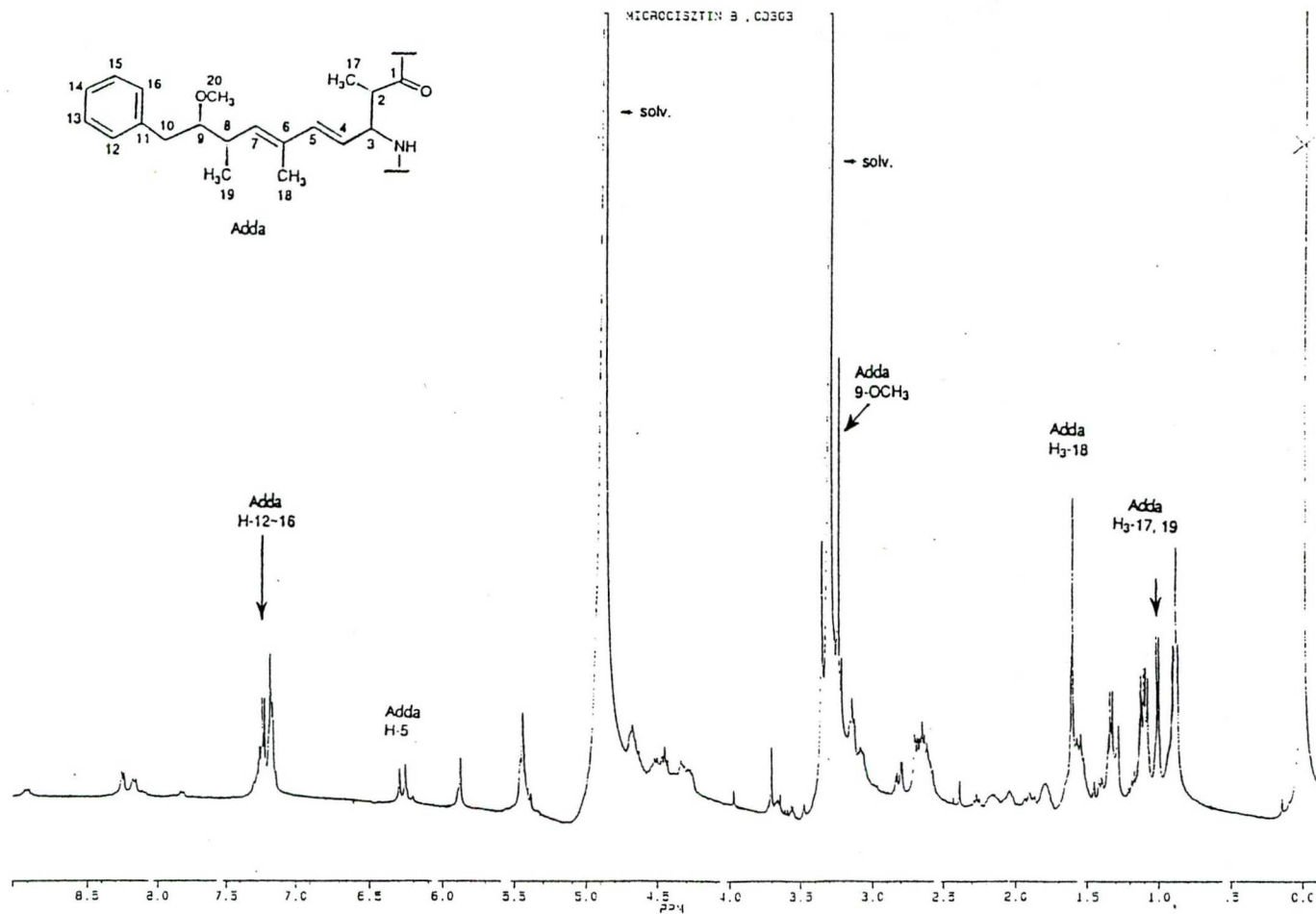
4.6.4. Az NMR vizsgálatok

Mint azt a 3.6.3. fejezetben említettük, nagyobb molekuláknál, ahol sok különböző H-tartalmú csoport található, a molekula szerkezetének teljes felderítése csupán NMR spektrum alapján nagyon nehéz. Egyes szerkezeti elemek meglétére vagy hiányára nézve azonban bizonyító érvényű lehet az NMR vizsgálat. A 36. és 37. ábrán az α és β komponensek NMR spektrumát tüntettük fel. Az ábrákon nyíllal jelölt csúcsok, különös tekintettel az együttes megjelenésükre, az irodalmi analógiák (118) alapján az ADDA komponens olyan hidrogénatomjaival azonosíthatóak, amelyek az aminosav analízis szerinti aminosavakban nem találhatók meg. Ezek a növekvő kémiai eltolódások sorrendjében a következők:

- kettős kötéstől β helyzetben levő metil,
 - a konjugált dién szerkezeten belüli, kettős kötéstől α helyzetben levő metil,
 - metoxi,
 - a konjugált dién szerkezet belső hidrogénje, és
 - a fenil csoport (az aminosavak között nincs fenil-alanin).
- Ezek együttesen a ADDA jelenlétét valószínűsítik a molekulákban.



36. ábra Az α jelű toxinkomponens NMR spektruma



37. ábra A β jelű toxinkomponens NMR spektruma

5. Az eredmények megvitatása

5.1. A toxin komponensek azonosítása

A *Microcystis aeruginosa*-ból izolált toxikus komponensek azonosítását több, egymástól különböző, egymást kiegészítő módszerrel végeztük. Az irodalmi adatok ismeretében maga az izolálás módja is bizonyos fokú indikáció a toxicitásért felelős anyag kémiai sajátosságaira vonatkozólag. Az extrakciót 5 %-os ecetsavban végeztük. Ebben nem oldódnak a lipidek és egyéb hidrofób molekulák, valamint a proteinek nagy része sem. Emiatt azon kívül, hogy a módszer a cianotoxin tisztítása szempontjából megfelelően hatékony, a toxint a kismolekulájú hidrophil anyagok közé sorolhattuk. A toxikus frakció fordított (C-18) fázisú oszlophoz kötődik és metanolban, acetonitrilben jól oldódik. Ez a tény arra utal, hogy a molekulák hidrofób oldalláncot is tartalmaznak. Az irodalmi analógiák szerint egy a *Microcystis aeruginosa*-ból ilyen módon izolált, egértesztben toxikus kismolekulájú amfipatikus anyag valószínűleg a mikrocisztin nevű cianotoxin, illetve a mikrocisztin változatok elegye.

A fehérjék UV spektrumának a 280 nm-en maximuma van. Ezt a híg fehérje- és peptid oldatok koncentrációjának meghatározásánál, valamint a nukleinsav preparátumok tisztaságának becslésénél is felhasználják. Ez az abszorpciós csúcs az aromás gyűrűt tartalmazó aminosavak kémiai szerkezetének következménye, és a moláris extinkciós koefficiens (ϵ) értéke az adott fehérje aminosav összetételétől függ. A mikrocisztin-LR nem tartalmaz ilyen aminosavat, ezért nincs is elnyelési maximuma 280 nm-en.

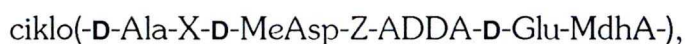
A mikrocisztin molekulák (5. ábra, 12. oldal) állandó alkotórésze az ADDA, az ebben szereplő konjugált dién szerkezetnek erős elnyelése van 238-240 nm-en. Ennek megfelelően a mikrocisztinek UV spektrumuk alapján jól elkülönülnek a peptidek és fehérjék többségétől.

A toxinpreparátum diódasoros UV-detektálással nyert HPLC kromatogramja, illetve a kromatográfiás csúcsok UV spektruma valószínűsítette, hogy a vizsgált

Microcystis aeruginosa izolátum többféle, a mikrocisztinhez hasonló szerkezetű komponenst termel, különböző mennyiségben. A két fő komponenstől nagyságrendekkel elmaradó koncentrációban kapott analógokat (esetleg prekursorok vagy bomlási termékek is lehetnek) nem vizsgáltuk.

A kromatográfiás elválasztás két fő komponense egyértelműen toxikusnak bizonyult. Ezzel igazoltuk, hogy ezek csakugyan cianotoxinok. Minthogy számos mikrocisztin változat ismert, e komponensek szerkezetének feltárására más laboratóriumokkal együttműködésben analitikai és szerkezetvizsgálati módszereket alkalmaztunk.

A kiválasztott komponensek rutin aminosav analízise szerint a négy egymáshoz legközelebbi koncentrációban jelentkező aminosav az alanin (A), a glutaminsav (E), az arginin (R) és az α jelű komponensben a tirozin (Y) illetve β jelűben a leucin (L). Az idáig vizsgált mikrocisztinek leggyakoribb szerkezete a következő:



ahol X és Z változó L-aminosavak, a MdhA N-metildehidroalanin, a MeAsp pedig D-eritro- β -aszparaginsav. Tekintettel arra, hogy a 82. oldalon tárgyaltak értelmében a MeAsp, ADDA és MdhA komponensekre nem várunk korrekt jelet, a fenti analízis eredménye a mikrocisztin-YR (α) és mikrocisztin-LR (β) szerkezetet valószínűsíti.

A feltételezett toxinok aminosav analízise szerint az α komponens tirozinjának hidroxifenil és a β komponens argininjének amin csoportjait leszámítva az egyes aminosavak meglehetősen hasonlóak az NMR spektroszkópia szempontjából (hasonló $\text{-CH}_2\text{-}$, -CH_3 csoportok több aminosavban stb.).

Amint a 4.6.4. fejezetben megmutattuk, az NMR vizsgálat ADDA jelenlétét valószínűsíti a molekulákban, ami, tekintettel arra, hogy ezt az aminosavat eddig sehol másutt nem figyelték meg, a toxinpreparátumainkat egyértelműen a cianobakteriális hepatotoxinok közé sorolja.

A fentiek egybevetésével igazoltuk, hogy az általunk vizsgált *Microcystis aeruginosa* által termelt toxinok a mikrocisztin-LR és a mikrocisztin-YR.

5.2. A toxin tisztítás optimalizálása

A cianotoxin tisztítás hatékonyságát a kitermelési adatok tükrében lehet könnyen megítélni. Ehhez a tisztítás egyes fázisaiban a minta toxintartalmának ismerete szükséges. Az első lépések során azonban nem könnyű meghatározni ezen értékeket. A toxin kimutatásának ugyanis alapvetően két módja lehetséges:

- 1) biológiai (toxicitási teszt)
- 2) kémiai (analitikai, pl. HPLC).

Az első esetben számolnunk kell azzal, hogy egyrészt a toxin nem teljes egészében "hasznosul", mert nem szabadul ki 100 %-ban a sejtekből, amint arra a 28. ábra A-B-E oszlopainak összevetéséből következtethetünk. Itt a kezeletlen sejtek csak viszonylag csekély növekedésgátlást okoztak (B oszlop). Nem biztos ugyanakkor az sem, hogy az általunk optimálisnak tartott fagyasztás hatására (E oszlop) a cianotoxinok 100 %-ban kiszabadulnak a sejtéből. Előfordulhat továbbá az is, hogy a közegbe kijutott toxin detoxikálódik; a minta biológiailag aktív (agonista, vagy antagonistá hatású) komponenseket is tartalmazhat kontrollálatlan, változó mennyiségben és minőségben. Emiatt az irodalomban az egyetlen olyan esetben, amikor egyidejűleg vizsgálták meg cianobaktériumok és kivonataik toxicitását, az eredmények összevetése csak kvalitatív szinten sikerült (119).

Az analitikai meghatározás esetén a fentiekhez hasonló gondokkal szintén számolnunk kell, és technikai jellegű problémák is fellépnek, mint pl. az, hogy a tisztításnak a C-18 CRTG-os lépést megelőző részén a minta alakos elemeket és nagyon apoláros, a C-18-as töltethez irreverzibilisen kötődő komponenseket tartalmazhat, és emiatt HPLC-vel nem vizsgálható.

A fentiek értelmében a nyers minták toxintartalma pontosan nem határozható meg minden kétséget kizáró módon. Ezen fenntartásokkal a tisztítás menetét a biológiai aktivitás, jelen esetben a mustárra (IC_{50}), illetve az egérre (LD_{50}) vonatkozó

toxicitás alapján követhetjük nyomon (. táblázat). A toxintartalom meghatározásához föltételeztük, hogy az egyéb sejtalkotóknak a mikrocisztin toxictására gyakorolt, valamint a kísérleti objektumokon kifejtett élettani hatása elhanyagolható. Ebben az esetben a tiszta toxin toxicitásának ismeretében becsülhető, hogy az adott preparátumban a toxin milyen mértékben "hígult fel" a nem toxikus összetevőktől. Ennek alapján pedig a preparátum tömegéből számolható annak toxintartalma. A friss sejtek mikrocisztin tartalmát 100 %-nak véve adódnak a kitermelési adatok.

MUSTÁRTESZT	Tömeg, g	IC ₅₀ μg/ml	Toxin mg	Kitermelés %	becsült tisztaság, %
Friss sejtek	148	3000	133,20	100,00	0,1
C-18	0,0581	3	52,29	39,26	90-92
DE-52	0,0081	2,7	8,10	6,08	91-94 (α), 95-98 (β)

EGÉRTESZT	Tömeg, g	LD ₅₀ μg/kg	Toxin mg	Kitermelés %	becsült tisztaság, %
Friss sejtek	148	240000	92,50	100,00	0,1
C-18	0,0581	160	54,47	58,89	90-92
DE-52	0,0081	150	8,10	8,76	91-94 (α), 95-98 (β)

5. táblázat A toxin tisztítása

A szakirodalomban több módszer található a mikrocisztinek kivonására. Egyetlen cikk sem közöl adatot az egyes lépések, vagy akár az egész tisztítás után a preparátumok kitermelésére, vagy tisztaságára vonatkozóan, így e módszerek összehasonlítása és értékelése pusztán az irodalmi adatok alapján nem lehetséges. A cianotoxin kivonási módszerek összehasonlításával kiválasztottuk a legmegfelelőbbet, és meghatároztuk az optimális paramétereket. A C-18 oszlopon tisztított minta Sephadex G-25 kromatográfiája (113) nem eredményezett lényeges tisztulást (az eredményt nem mutattuk be), a helyette alkalmazott ioncserélő kromatográfia azonban olyan tiszta toxinpreparátumot adott, hogy a további tisztítás fölöslegesnek bizonyult. Így a

mikrocisztin kivonási és -tisztítási módszert három egyszerű, olcsó és jelentős műszerezettséget nem igénylő ("low tech") lépésre egyszerűsítettük.

5.3. *A mustárteszt kidolgozása*

Az *Arabidopsis* sp. a molekuláris biológiai vizsgálatok kedvelt kísérleti növénye. Ennek egyik oka az, hogy gyorsan nő abban az értelemben, hogy a generációs ideje, a magvetéstől a magok újabb generációjának betakarításáig eltelt idő a többi magasabb rendű növényekéhez képest viszonylag rövid. E közkedveltség következtében a növekedési körülmények, módszerek jól ismertek. A kísérleteink számára egységes genetikai háttérű vetőmagot is könnyen be lehet szerezni. A magok kis mérete miatt igen szerény toxin felhasználással kellett számolnunk, ami egyrészt gazdaságos, másrészt az esetleges toxicitási tesztnél kis mennyiségű cianotoxin kimutatását (nagyobb érzékenységet) tesz lehetővé. Ráadásul a kisebb magvak általában érzékenyebbek a külső káros behatásokkal szemben, mint a nagyobbak. Mindezek miatt a toxinnak a magasabb rendű növényekre gyakorolt hatását először *Arabidopsis* sp. csíranövényeken próbáltuk ki.

Bár magok kicsiny mérete elvileg előnyös lenne, azonban ez a gyakorlatban nem mutatkozott meg. A legfőbb problémát az okozta, hogy a kis méret miatt nem könnyű egységes minőségű, csírázóképes magvakat választani a kísérletekhez, és a nyilvánvalóan hibásakat ill. csíráképteleneket eldobni. Emiatt a kontroll tenyészetnél nagy volt az egyedek között a különbség, és a kísérletek a nagy szórás miatt nehezen értékelhetőek. Egy másik jelentős hátránya az *Arabidopsis* sp.-nek, hogy magvetést követően még hetekkel később sem kapunk értékelhető hosszúságú magoncokat. A növények növekedése e tekintetben a várakozással ellentétben viszonylag lassúnak bizonyult.

A toxinnak több más növényfajra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. Ezek eredményét a 6. táblázatban foglaltuk össze.

A kísérleti objektum	LD ₅₀ ill. IC ₅₀	Egy minta minimális térfogata	kimutatási határ
<i>Mus musculus</i>	160 µg/kg	0,5 ml	3 µg
<i>Drosophyla melanogaster</i>	20 µg/ml	5 ml	100 µg
<i>Typha sp.</i>	10 µg/ml	1 ml	10 µg
<i>Arabidopsis thaliana</i>	50 µg/ml	1 ml	50 µg
<i>Triticum aestivum</i>	30 µg/ml	1 ml	30 µg
<i>Lemna minor</i>	20 µg/ml	1 ml	20 µg
<i>Sinapis alba</i>	3 µg/ml	1 ml	3 µg

6. táblázat A mikrocisztin toxicitása egyes szervezetekre

A mustárral (*Sinapis alba*) az egérteszt érzékenységet el tudtuk érni. Az egérteszthez 0,5 ml-ben feloldott 3 µg cianotoxin 6 µg/ml koncentrációt eredményez a mustártesztnél alkalmazott 3 µg/ml-rel szemben. Az érzékenységek összehasonlításánál azt is figyelembe vehetjük, hogy míg az egértesztben 3 µg toxin egy egyed 50 %-os letális dózisához szükséges, addig a mustárteszt esetén azonos anyagmennyiség 3 egyed 50 %-os növekedésgátlásához elegendő. 1-1 mustármag csíráztatásához 0,5 ml tápoldat elegendő, és a legkisebb kimutatható toxinkoncentráció ez esetben 1,5 µg/ml. Mindkét módon számolva a mustárteszt mintegy kétszer érzékenyebbnek bizonyul az egértesztnél.

A két módszer összehasonlításakor figyelembe kell venni azok időigényét is. Az egerek injektálását követően néhány óra múlva a teszt eredménye már értékelhető, míg a mustártesztnél a magvetés után csak néhány nappal később. Azonban az egérteszt jól kontrollált körülmények között beltenyésztett kísérleti egerek "előállítását" és fenntartását igényli, ami szükségessé teszi, hogy a teszt elvégzésére hetekkel-hónapokkal korábban előkészüljenek. Ezzel szemben a fémzárolt mustármagvakkal a mustárteszt bármikor elkezdhető, és szobahőmérsékleten szinte tetszőleges (természetesen egyenletes) fényviszonyok között 4-8 nap alatt elvégezhető.

A fentiek figyelembevételével a mustárteszt az egértesztnél gyorsabb és egyszerűbb azokban a laboratóriumokban, ahol nem folyik rutinszerűen egérteszt és



nem áll rendelkezésre mindig korlátlan számú kísérleti egér; a két teszt érzékenysége közel azonos.

5.4. A toxin hatása vízi élőlényekre, feltételezett szerepe a vízi ökoszisztémákban

Ismerünk a *Microcystis aeruginosa* fajból olyan izolátumokat, amelyek nem termelnek toxint. Mind a mai napig nem tisztázott, hogy mi a toxin szerepe a sejt életében, mi a célja a toxintermelésnek. A jelenség egyik lehetséges magyarázata az, hogy a toxintermelés egy "véletlenül" kialakult, "fölösleges" tulajdonság. Ugyanis azok a fajok, — ill. ezen adott fajból azok az izolátumok, — amelyek nem termelnek toxinokat, másként kompetíciós hátrányban lennének a toxintermelőkkel szemben, így ez utóbbiak idővel kiszorították volna őket.

Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy a tanulmányozott faj viszonylag jelentős mennyiségű toxint termel (ez az . táblázat adatai szerint a friss sejttömeg durván 0,08 %-a, ami a szárazanyag kb. 2,5 %-ának felel meg). Ehhez természetesen megfelelő mennyiségű tápanyagot és energiát használ föl. Ez önmagában olyan hátrányt jelenthet a sejtnek, hogy valószínűleg a toxintermelőknek kellett volna hátrányba kerülniük, amennyiben e hátrányt nem ellensúlyozza egy a toxin termelésével kapcsolatos előny. Mi abból a munkahipotézisből indultunk ki, hogy a toxin termelésének szerepe lehet a *Microcystis aeruginosa* életében; a belső biokémiai folyamatokban, a környezetében élő szervezetekkel való kapcsolatában, esetleg mindkettőben.

A környezetében élő szervezetekkel való kapcsolatban alapvetően háromféle "előny" képzelhető el:

1. A cianotoxinok táplálékért (tápanyagokért) versengő ellenfelei (a kompetitorok, **táplálékkonkurenszek**) számára mérgező (azok életfolyamatait lassítja), így azokat kiszorítja. Minden fotoszintetizáló szervezet versenyez az táplálékért, nevezetesen az ásványi sókért, esetleg fényért, oxigénért. Így a

cianobaktériumok a többi fotoszintetizáló baktériumnak, valamint a vízi növényeknek táplálékkonkurensai.

2. A mikrocisztin mérgező vagy kellemetlen azon organizmusok számára, amelyeknek a táplálkozása kisebb vagy nagyobb mértékben cianobaktériumokra épül (a **predátorok**). Itt elsősorban a szűrővel táplálkozó planktonalkotók fontosak, de ide tartoznak pl. a kagylók, szivacsok stb. és a protozoák is. Külön csoportként említést érdemelnek a heterotróf mikroorganizmusok, baktériumok, gombák. Ezek cianobaktericid hatása nem ismert, de az autotrófok által előállított szerves anyagot használják testük felépítésére és energiaforrásként.
3. A mikrocisztin az esetlegesen a cianobaktériumokat fertőző vírusokkal (a **cianofágokkal**) szemben "rezisztenciát" eredményez.

5.4.1. A táplálékkonkurensok

Mint fentebb láttuk, a cianobaktériumoknak növekedésükhöz levegőn kívül csak fényre és néhány ásványi sóra van szükségük. Így minden fotoszintetizáló élőlénynek (egymásnak, a növényeknek, és a többi fotoszintetizáló baktériumoknak) táplálékkonkurensai.

A fenti első föltevés helyességét ellenőrzendő, egymástól rendszertanilag igen távoli egysejtűek növekedését vizsgáltuk mikrocisztin jelenlétében. Megállapítható, hogy ezek növekedését a cianotoxin nem gátolja. Az obligát fotoautotróf szervezetek föltehetően nem tudják fölvenni az oldatból a peptidet. A zöldalga a toxin jelenlétében még a kontrollnál is jobban fejlődik. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy e szervezet képes fölvenni a mikrocisztint, sőt, valószínűleg lebontani is, és mixotróf körülmények között növekedése gyorsabb az autotróf körülmények között megfigyelhetőnél.

A cianobaktériumok további konkurensának tekinthetjük a vízi- ill. vízparti növényeket, mint az adott élettérben élő fotoautotróf (esetleg mixotróf) szervezeteket. Közülük a sás és a békalencse növekedésének, (valamint a szárazföldi növények azonos

viselkedésének) alapján elmondhatjuk, hogy a toxin ezek növekedését gátolja. A növekedés gátlásához szükséges koncentráció értéke fajoként különböző.

Mint a bevezetőben említettük, vízvirágzások során, a nyári meleg, kánikulai napokban a *Microcystis aeruginosa* a víz felszínén gyűlik össze, és a felgyülemlett sejtömeget a szél a nádasba behordhatja. Az ott elhaló nagy mennyiségű sejtől egyszerre kiszabaduló toxin koncentrációja helyenként meghaladhatja a 10 µg/ml-es nagyságrendet. Ez a koncentráció ugyan nem elegendő a növényzet azonnali kipusztításához, de elhúzódó hatása jelentős lehet. A partra sodort sejtek toxintartalma pedig talajba kerül, és a magok kikelését gátolhatja. E két hatás együtt közrejátszhat a tavak flórájának pusztulásában, ezért ezt a jelenséget célszerű figyelembe venni a toxikus cianobaktériumok ökológiai szerepének megítélése során.

5.4.2. A predátorok

Kimutattuk a mikrocisztin toxikus hatását *D. melanogaster* lárvákra és meghatároztuk, hogy a tisztított toxinra vonatkozó 50 %-os letális dózis (LC₅₀) 20 µg/ml. Szúnyoglárvákkal hasonló eredményeket kaptak (119), azonban a kísérleti körülmények egészen mások voltak, ezért az adatokat számszerűen nem lehet összehasonlítani.

A papucsállatkákkal végzett kísérleteinkben egynapos kezelés után 10 µg/ml alatti LC₅₀ értékek adódtak. Amennyiben ennek alapján a hasonló szervezetek viselkedésére következtethetünk, a mikrocisztin protozoákra gyakorolt toxicitása igen erőteljes. Ilyen koncentrációk ugyanis kialakulhatnak a vízvirágzások során, jelentősen befolyásolva a protozoák populációjának méretét, és különböző érzékenységgű fajok esetén a populáció diverzitását is.

A szűrő zooplankton egyik fő táplálékát jelentik a cianobaktériumok. Ennek megfelelően ez utóbbiak mennyisége és faji megoszlása igen bonyolult kapcsolatban van az előbbieket mennyiségével ill. minőségével. E kapcsolatot részben a kerekeshéjúakkal (120), de elsősorban a *Daphnia* fajokkal kapcsolatban (121-124) tanulmányozták. A zooplankton résztvevőinek táplálkozási, tartózkodási és egyéb

szokásai különböznek, és a cianotoxinokkal szemben eltérő lehet ezek fiziológiai érzékenysége is (125). A cianobaktériumok a zooplanktonon belül a fajok közötti kompetíciót is befolyásolhatják. Természetes vizekben a vízvirágzásokkal olykor a *Daphnia* populáció csökkenése párosul (126-128). Emiatt többen vizsgálták a cianobaktériumok és különösen a *Microcystis aeruginosa* ill. a mikrocisztin (129) hatását a *Daphnia* fajokra, azok populációjának dinamikájára mind a természetes élőhelyeken, mind laboratóriumi körülmények között (130-132). Ezek az egymással részben ellentmondó eredmények azt mutatják, hogy a *Microcystis aeruginosa* *Daphniákra* gyakorolt hatását több tényező befolyásolhatja, ilyenek pl.:

- a *Daphnia* faj,
- a *Daphnia* fajok szájszerveinek felépítése, mérete,
- az egyes *Daphnia* fajokon belül az egyedek kora,
- a *Microcystis aeruginosa* mennyisége,
- a *Microcystis aeruginosa* sejtek állapota, kora,
- az egyéb (nem toxikus) táplálék mennyisége,
- a víz hőmérséklet.

A Balaton szűrő zooplanktonjának az *Eudiaptomus gracilis* mellett a *Daphnia* fajok a legfontosabb tagjai. Közülük legjelentősebb a *Daphnia cucullata* Sars, mivel e faj tagjai gyakran a nyári rákplankton 40-60 %-át alkotják. A Balatonon a rákplankton szűrési aktivitását napi 8-10 %-ra becsülték vízvirágzásoktól mentes években (121). Ez az érték az erősen eutróf tavakban ennek akár 8-szorosára is növekedhet (133). Emiatt nem becsülhetjük le a szűrő rákoknak a cianobaktériumok populációjára gyakorolt hatását. Ez a kétoldalú kapcsolat a *Daphniára* (122,123) és kerekeshéregre (120) kimutatott toxicitással, valamint a protozoákkal kapcsolatos eredményeinkkel összhangban valószínűsíti azt a feltevést, hogy a mikrocisztin termelésének egyik, esetleg fő "célja" a részben cianobaktériumokkal táplálkozó szervezetek (predátorok) elleni védekezés.

Meg kell jegyezni, hogy a rendelkezésre álló adatok szerint a mikrocisztin a kagylókra nem gyakorol toxikus hatást. Ezek a mikrocisztint nem metabolizálják, hanem nagy mennyiségben képesek felhalmozni a szervezetükben, elsősorban a

hepatopankreász szövetekben (134). A mikrocisztin halakra gyakorolt hatása kétséges (21).

5.4.3. A heterotróf baktériumok

A mikroorganizmusoknak az elemek körforgásában óriási szerepe van. Mind a heterotrófok, mind az autotrófok versenyben vannak egymással egy adott élőhely elemkészletéért. A heterotrófok a szén csak szerves vegyületek formájában képesek felvenni, amelyeket az autotrófok építenek fel. Felmerül a kérdés, hogy milyen kölcsönhatások vannak e két csoport között. A szerves szénhez a heterotróf szervezet úgy juthat, hogy

- elpusztítja az autotrófot,
- a más okból elpusztult autotróf bomlástermékeit hasznosítja,
- vagy az autotróf által kibocsájtott felvehető szerves anyagokat hasznosítja.

A *Microcystis aeruginosa* a nyálkaburkába tapadt baktériumokkal él együtt, így nem föltételezhető, hogy a mikrocisztin általános bakteriosztatikus, vagy baktericid hatású anyag lenne. Egyes speciális baktériumokra vonatkozó toxicitása természetesen nem kizárt. Az irodalomban ezzel kapcsolatban nem található információ.

A cianobaktériumok populációjának méretére, mint láttuk, sok tényezőnek van hatása, ezt a fizikai, kémiai paramétereken kívül a vízi életösszeg többi résztvevői is jelentősen befolyásolják. Ezek közé sorolhatóak és további alapvető tényezőt jelenthetnek a cianobaktériumok parazitái, az azokat támadó vírusok.

5.4.4. A cianofágok

Orosz kutatók megemlékeznek egy olyan esetről amikor *Microcystis* sp. okozta vízvirágzás lezajlásában cianofágok játszottak szerepet (135,136). A cianobaktériumok nomenklatúrájában jelentős bizonytalanság mutatkozik, emiatt kíváncsi, hogy az izolátumok törzsgyűjteményekbe kerüljenek, ahol akár évekkel később is ellenőrizhető, hogy csakugyan az adott rendszertani egységbe tartoznak-e. (Pl. a *Microcystis aeruginosa*-t *Anacystis cyanea*-ként (38), a *Synechococcus* PCC 6301-et *Anacystis*

*nidulans*ként, a *Nostoc* sp. PCC 7413-at *Cylindrospermum licheniforme*-ként tartották számon stb. (57).) Mivel az idézett kutatócsoport sem a cianobaktériumot, sem pedig a cianofágot nem izolálta, valamint tekintettel arra, hogy az idézett munkákon kívül nem fordul elő irodalmi adat, amely szerint a *Microcystis aeruginosa* fajt támadó cianofágot találtak volna, az erre vonatkozó fenti megfigyelést fenntartásokkal kell kezelni.

Kutatócsoportunknak nem áll rendelkezésére — és a nemzetközi szakirodalom tanúsága szerint egyetlen más laboratóriumnak sem — olyan cianofág izolátum, amelynek a *Microcystis aeruginosa* (akár egy toxint nem termelő törzs) a gazdaszervezete lenne. Tekintettel arra, hogy a fágprobléma a felszíni vizekben nagy jelentőséggel bír, úgy határoztunk, hogy a rendelkezésünkre álló *Synechococcus* sp. PCC 6301 — AS-1 cianofág rendszert modellnek tekintve megvizsgáljuk a mikrocisztin és a cianofág szaporodás esetleges kölcsönhatását. A kísérletek szerint a mikrocisztin az AS-1 cianofág szaporodását gátolja, azonban az *E. coli* baktérium λ -fágjának szaporodására nincsen hatással, tehát e gátlás bizonyos mértékig specifikus. Az alkalmazott cianobaktérium faj nem toxintermelő, és a hazai vízvirágzásokban nem fordul elő jelentős mennyiségben. A 2.4.1. fejezetben említettük, hogy a leggyakoribb cianofágok gazdaszervezetei általában nem vesznek részt vízvirágzásokban. Ezek a megfigyelések összevetve azzal, hogy a vízvirágzásokban leggyakrabban domináló *Microcystis aeruginosa* fajnak nincs ismert fágja, a cianofágok ökológiai jelentőségére vonatkozó irodalmi áttekintést szem előtt tartva a következő elképzelést támasztják alá:

A cianofágok szerepe a cianobaktérium populációk méretének szabályozásában nem elhanyagolható. Eutróf tavakban a cianobaktériumok növekedését tápanyag-hiány nem limitálja. Meleg nyári napokon a fölmelegedett vízben generációs idejük nagymértékben lecsökken. A zooplankton e növekedési ütemet időben nem követi, ráadásul táplálkozásában bizonyos szelekcióra képes, és lehetőség szerint előnyben részesíti a cianotoxint nem termelő fajokat (128,132). Ilyenkor a cianofágok válhatnak a cianobaktériumok növekedésének fő szabályozó, limitáló tényezőjévé. Azok a fajok azonban, amelyek rendelkeznek a toxintermelés képességével, ki tudják védeni a

cianofágok támadását is. Ekkor e fajok növekedése "korlátlan" válik ameddig újabb limitáló tényező nem lép fel. Ez magának a nagymérvű szaporodásnak eredményeként következik be, hiszen a nagy sejttömeg felélheti a tó valamelyik tápanyag forrását, illetve az elszaporodó planktonikus, de még inkább a felszínen összetömörülő sejtek fény-, O_2 -, CO_2 -hiányt okozhatnak. Ilyenkor, mivel a cianobaktériumokkal táplálkozó szervezetek nincsenek jelen megfelelő mennyiségben, a sejtek előregednek, elhalnak, lizálódnak, és tartalmuk, a szárazanyag mintegy 2–3 százalékát kitevő toxinnal együtt a vízbe ürül.

A mikrocisztin különböző szervezetre kifejtett hatásának mechanizmusát egyelőre nem vizsgáltuk. Az irodalomból ismert, hogy a magasabbrendű szervezeteknél cianotoxin fiziológiás hatásának kiváltásában kulcsszerepe van az 1- és 2A típusú proteinfoszfátázok gátlásának. Kimutattuk, hogy a mikrocisztin a cianobakteriális proteinfoszforilációt is befolyásolja. Ennek szerepe lehet a sejtek biokémiai folyamatainak szabályozásában, sőt, a cianofág-rezisztencia kialakulásában is, mivel a fágfertőzött cianobaktérium sejtek foszforilációja toxin jelenlétében különbözik az azonos módon fertőzött kontrollsejtektől (a kísérletet nem mutattuk be). Valószínű tehát, hogy a mikrocisztinnek a különböző, egymástól igen nagy evolúciós távolságra levő szervezetre gyakorolt hatásukat azonos módon, egyes proteinek foszforilációs szintjének (és ennek következtében biokémiai folyamatok sebességének) megváltoztatása útján fejtik ki.

Itt kell megjegyeznünk, hogy a különböző szervezetek egyes életfolyamatainak biokémiai szintű tanulmányozásához elengedhetetlen a proteinfoszforiláció vizsgálata. A mikrocisztin általunk kidolgozott előállítási és tisztítási módszere lehetőséget ad az igen drága proteinfoszfátáz inhibitorok mellett, vagy azok helyett egy újabb, egyszerűen és olcsón előállított ilyen funkciójú reagens alkalmazására.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy egy magyarországi toxikus vízvirágzásból származó *Microcystis aeruginosa* izolátumból elsőként kivontuk, tisztítottuk és azonosítottuk a toxint. A toxintisztítás módszerét egyszerűsítettük; kidolgoztunk egy új,

hatékony, olcsó és humánus toxicitási tesztet az általánosan elfogadott egérteszt kiváltására. Megvizsgáltuk a cianotoxin hatását más szervezetekre, és meghatároztuk, hogy ökológiai szempontból milyen előnyöket nyújthat a *Microcystis aeruginosa* számára a toxin termelése.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Kenneth Beattie-nek a rendelkezésünkre bocsátott cianobaktérium törzsekért, Dr. Kiss Péternek a lucerna kezelésével kapcsolatos útmutatásáért, Dr. Janáky Tamásnak az NMR-vizsgálatban, Máthé Endrének a *Drosophyla*-tesztben, Hiripi Lászlónak a foszforilációs kísérletekben nyújtott segítségéért.

Külön köszönet illeti Dr. Borbély Györgyöt, szakvezetőmet, aki lehetővé tette számomra e dolgozat elkészítését, és a munka során hasznos tanácsokkal, útmutatásokkal, ötletekkel segített.

Köszönöm kollégámnak, Surányi Gyulának hasznos segítségét és tanácsait, Horváth Gábornak a kézirat lektorálásában nyújtott segítségét. Köszönet illeti az asszisztenseket, Bárdosi Erzsébetet, Fleit Gabriellát és mindenekelőtt Gercsó Andrásnét pontos, lelkiismeretes munkájukért.

7. Az idézett irodalom

1. Vörös, L. (1980): A Balaton fitoplanktonjának tömege, összetétele és diverzitása 1976-ban. *Bot. Közlem.* **67.** 25-33. oldal.
2. Collins, M. (1978): Algal toxins. *Microbiological Reviews.* **42(4).** 725-746. oldal.
3. Elder, G.H., P.R. Hunter és G.A. Codd (1993): Hazardous freshwater cyanobacteria (blue-green algae). *Lancet.* **341.** 1519-1520. oldal.
4. Felföldi, L. (1981): A vizek környezettana, általános hidrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó. (Budapest).
5. Griffiths, B.M. (1939): Early references to water-blooms in British lakes. *Proc. Linnean Soc.* **151.** 12-19. oldal.
6. Törökné Kozma, A. és G. Mayer (1988): Toxikus cianobaktériumok hazai felszíni vizeinkben. *Hidrobiológiai Közöny.* **68.** 49-54. oldal.
7. Törökné Kozma, A., K. Schiefer, G. Mayer, G. Dura és Z. Deák (1986): Természetes vizeinkben előforduló algaprodukciónak állatkísérletes vizsgálata. *Egészségtud.* **30.** 301-308. oldal.
8. Codd, G.A. és K.A. Beattie (1991): Cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins: Awareness and action in the United Kingdom. *PHLS Microbiology Digest.* **8.** 82-86. oldal.
9. Lawton, L.A. és G.A. Codd (1991): Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins and their Significance in UK and the European Waters. *J. Inst. Wat. Environ. Management.* **5.** 460-465. oldal.
10. Olson, T.A. (1960): Water poisoning - A study of poisonous algae blooms in Minnesota. *Am. J. Public Health.* **50.** 883-884. oldal.
11. Codd, G.A. és S.G. Bell (1985): Eutrophication and toxic cyanobacteria in freshwaters. *Wat. Pollut. Control.* **34.** 225-232. oldal.

12. Zehnder, A. és P.R. Gorham (1960): Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin. *Can. J. Microbiol.* **6.** 645-659. oldal.
13. Hughes, E.O., P.R. Gorham és A. Zehnder (1958): Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **4.** 225-236. oldal.
14. Galanos, C., O. Lüderitz, E.T. Rietschel és O. Westphal (1977) *Int. Rev. Biochem.* **14.** 239-334. oldal.
15. Raziuddin, S., H.W. Siegelman és T.G. Tornabene (1983): Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **137.** 333-336. oldal.
16. Peary, J. és P. Gorham (1966): Influence of light and temperature on growth and toxin production by *Anabaena flos-aquae*. *J. Phycol.* **2(suppl.).** 3
17. Bishop, C.T., E.F.L.J. Anet és P.R. Gorham (1959): Isolation and identification of the fast death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37.** 453-471. oldal.
18. Harada, K., H. Nagai, Y. Kimura és társai (1993): Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria. *Tetrahedron.* **49.** 9251-9260. oldal.
19. Sawyer, P.J., J.H. Gentile és J.J. Sasner, Jr. (1968): Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Can. J. Microbiol.* **14.** 1199-1204. oldal.
20. Gentile, J.H. és T.E. Maloney (1969): Toxicity and environmental requirements of a strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Can. J. Microbiol.* **15.** 165-173. oldal.
21. (1990): Toxic Blue-green algae. National Rivers Authority. (szerk.) National Rivers Authority. (London).
22. Ohtani, I., R.E. Moore és M.T.C. Runnegar (1992): Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* **114.** 7941-7942. oldal.
23. Namikoshi, M., B.W. Choi, F.R. Sun, K.L. Rinehart, W.R. Evans és W.W. Carmichael (1993): Chemical Characterization and Toxicity of Dihydro Derivatives of Nodularin and Microcystin-LR, Potent Cyanobacterial Cyclic Peptide Hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* **6(2).** 151-158. oldal.
24. Krishnamurthy, T., L. Szafraniec, D.F. Hunt és társai (1989): Structural characterization of toxic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **86.** 770-774. oldal.
25. Honkanen, R.E., J. Zwiller, R.E. Moore és társai (1990): Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **265.** 19401-19404. oldal.
26. Runnegar, M.T.C., S. Kong és N. Berndt (1993): Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **265.** G224-G230. oldal.
27. Honkanen, R.E., M. Dukelow, J. Zwiller, R.E. Moore, B.S. Khatri és A.L. Boynton (1991): Cyanobacterial Nodularin Is a Potent Inhibitor of Type-1 and Type-2A Protein Phosphatases. *Mol Pharmacol.* **40.** 577-583. oldal.
28. Oxenrider, K.A., M.E. Rasche, M.V. Thorsteinsson és P.J. Kennelly (1993): Inhibition of an archaeal protein phosphatase activity by okadaic acid, microcystin-LR, or calyculin A. *FEBS Lett.* **331.** 291-295. oldal.
29. Quinn, R.J., C. Taylor, M. Suganuma és H. Fujiki (1993): The conserved acid binding domain model of inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: Molecular modelling aspects. *BioMed. Chem. Lett.* **3.** 1029-1034. oldal.
30. Li, M. és Z. Damuni (1994): Okadaic acid and microcystin-LR directly inhibit the methylation of protein phosphatase 2A by its specific methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202.** 1023-1030. oldal.
31. Rudolph-Böhner, S., D.F. Mierke és L. Moroder (1994): Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. *FEBS Lett.* **349.** 319-323. oldal.

32. Konst, H., P.D. McKercher, P.R. Gorham, A. Robertson és J. Hoowell (1965): Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory animals. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **29**. 221-228. oldal.
33. Nishiwaki, R., T. Ohta, E. Sueoka és társai (1994): Two significant aspects of microcystin-LR: Specific binding and liver specificity. *Cancer Lett.* **83**. 283-289. oldal.
34. Mellgren, G., O.K. Vintermyr, R. Boe és S.O. Doskeland (1993): Hepatocyte DNA Replication Is Abolished by Inhibitors Selecting Protein Phosphatase-2A Rather Than Phosphatase-1. *Exp Cell Res.* **205**(2). 293-301. oldal.
35. Hermansky, S.J., S.J. Stohs, R.S. Markin és W.J. Murray (1990): Hepatic lipid peroxidation, sulfhydryl status, and toxicity of the blue-green algal toxin microcystin-LR in mice. *J. Toxicol. Environ. Health.* **31**. 71-91. oldal.
36. Hermansky, S.J. és S.J. Stohs (1991): Effect of Microcystin-LR (MCLR) on Hepatic Microsomal Membrane Fluidity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **72**. 213-222. oldal.
37. Hooser, S.B., V.R. Beasley, E.J. Basgall, W.W. Carmichael és W.M. Haschek (1990): Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Vet. Pathol.* **27**. 9-15. oldal.
38. Ellenman, T.C., I.R. Falconer, A.R.B. Jackson és M.T.C. Runnegar (1978): Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom. *Aust. J. Biol. Sci.* **31**. 209-218. oldal.
39. Ashworth, C.T. és M.F. Mason (1946): Observations on the pathological changes produced by a toxic substance present in blue-green algae (*microcystis aeruginosa*). *Am. J. Pathol.* **22**. 369-383. oldal.
40. Nishiwaki-Matsushima, R., T. Ohta, S. Nishiwaki és társai (1992): Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*
41. Carmichael, W.W. (1994): The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* **270**. 78-86. oldal.
42. Schopf, J.W. (1994): Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**. 6735-6742. oldal.
43. Borbely, G. (1988): Miért cianobaktériumok a "kékalgák"? - gondolatok Felföldy Lajos "hozzászólása és általános morgolódása" kapcsán. *Hidrológiai Közöny.* **68**(4). 241-242. oldal.
44. Stanier, R.Y. (1977): The position of the cyanobacteria in the world of phototrophs. *Carlsberg Res. Commun.* **42**. 77-98. oldal.
45. Dickerson, R.E. (1980): Evolution and gene transfer in purple photosynthetic bacteria. *Nature.* **283**. 210-212. oldal.
46. Giovannoni, S.J., S. Turner, G.J. Olsen, S. Barns, D.J. Lane és N.R. Pace (1988): Evolutionary relationships among Cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**. 3584-3592. oldal.
47. Bonen, L. és W.F. Doolittle (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**. 2310-2314. oldal.
48. Stringham, E.G., D. Jones és E.P.M. Candido (1992): Expression of the Polyubiquitin-Encoding Gene (ubq-1) in Transgenic *Caenorhabditis-Elegans*. *Gene.* **113**. 165-173. oldal.
49. Stanier, R.Y. és G. Cohen-Bazire (1977): Phototrophic procariotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**. 225-274. oldal.
50. Borbely, G. és A. Simoncsits (1981): 3'-terminal conserved loops of 16S rRNAs from the cyanobacterium *Synechococcus* AN PCC 6301 and maize chloroplast differ only in two bases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**. 846-852. oldal.
51. Fogg, G.E., W.D.P. Stewart, P. Fay és A.E. Walsby (1973): The blue-green algae. Academic Press. (New York).
52. Dixon, R., R.R. Eady, G. Espin és társai (1980) *Nature.* **286**. 128-132. oldal.
53. Glazer, A.N. (1977) *Mol. Cell. Biochem.* **18**. 125-139. oldal.
54. Proteau, P.J., W.H. Gerwick, F. Garcia-Pichel és R. Castenholz (1993): The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia.* **49**. 825-829. oldal.
55. Matsunaga, T., J.G. Burgess, N. Yamada, K. Komatsu, S. Yoshida és Y. Wachi (1993): An ultraviolet (UV-A) absorbing biopterin glucoside from the marine planktonic cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**. 250-253. oldal.

56. Wolk, C.P. (1973) *Bacteriol. Rev.* **37**. 32-101. oldal.
57. Rippka, R., J. De Ruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman és R.Y. Stanier (1979): Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**. 1-61. oldal.
58. Krogmann, D.W. (1973): Photosynthetic reactions and components of thylakoids. 80-98. oldal. N.G. Carr és B.A. Whitton.(szerk.) *The biology of Blue-Green Algae*. Blackwell. (Oxford).
59. Pelroy, R.A. és J.A. Bassham (1972) *Arch. Microbiol.* **86**. 25-38. oldal.
60. Pelroy, R.A. és J.A. Bassham (1973) *J. Bacteriol.* **115**. 937-942. oldal.
61. Pelroy, R.A. és J.A. Bassham (1973) *J. Bacteriol.* **115**. 943-948. oldal.
62. Smith, A.J. (1975) *Biochem. Soc. Trans. Absrt. Comm.* , 55th Meeting *Biochem. Soc.* **3**. 345-352. oldal.
63. Lehman, M. és G. Wöber (1976) *Arch. Microbiol.* **111**. 93-97. oldal.
64. Palfi, Z., G. Suranyi és G. Borbely (1991): Alterations in the Accumulation of Adenylylated Nucleotides in Heavy-Metal-Ion-Stressed and Heat-Stressed *Synechococcus* Sp Strain PCC-6301, a Cyanobacterium, in Light and Dark. *Biochem. J.* **276**. 487-491. oldal.
65. Atkinson, D.E. (1971) 1-21. oldal. H.J. Vogel.(szerk.) *Metabolic Pathways*. Academic Press. (New York).
66. Bornfeld, T. és U. Weis (1981) *Biochim. Physiol. Pflanzen.* **176**. 71-82. oldal.
67. Roger, P.A. és I. Watanabe (1986): Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage and limiting factors. *Fertilizer Research.* **9**. 39-77. oldal.
68. Obreht, Z., N.W. Kerby, M. Gantar és P. Rowell (1993): Effects of root-associated N₂-fixing cyanobacteria on the growth and nitrogen content of wheat (*Triticum vulgare* L.) seedlings. *Biol. Fertil. Soils.* **15**. 68-72. oldal.
69. Milicia, F. és F. Favilli (1992): *Azolla* symbiotic system's application as biofertilizer for green garden crops. *Symbiosis.* **14**. 495-500. oldal.
70. Duggan, J.X. és L.E. Anderson (1975) *Planta.* **122**. 293-397. oldal.
71. Hayashi, F., M.R. Ishida és T. Kikuchi (1969) *Ann. Repts. Res. Reactor Inst. Kyoto Univ.* **2**. 56-66. oldal.
72. Carr, N.G. (1973): Metabolic control and autotrophic physiology. 39-65. oldal. N.G. Carr és B.A. Whitton.(szerk.) *The Biology of Blue-Green Algae*. Blackwell Sci. Publications.
73. Sobczyk, A., A. Bely, N. Tandeau de Marsac és J. Houmard (1994): A phosphorylated DNA-binding protein is specific for the red-light signal during complementary chromatic adaptation in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* **13**. 875-885. oldal.
74. Mohamed, A. és C. Jansson (1989) *Plant Mol. Biol.* **13**. 693-700. oldal.
75. Grossman, A.R., M.R. Schaefer, G.G. Chiang és J.L. Collier (1993): Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **175**. 575-582. oldal.
76. Herdman, M., B.M. Faulkner és N.G. Carr (1970) *Arch. Microbiol.* **73**. 238-249. oldal.
77. Singer, R.A. és W.F. Doolittle (1974) *J. Bacteriol.* **118**. 351-357. oldal.
78. Stanier, R.Y. (1973): Autotrophy and heterotrophy in unicellular blue-green algae. 501-518. oldal. N.G. Carr és B.A. Whitton.(szerk.) *The Biology of Blue-Green Algae*. Blackwell Sci. Publications.
79. Ingram, L.O., J.A. Calder, C. Van Baalen, F.E. Plucker és P.L. Parker (1973) *J. Bacteriol.* **114**. 695-700. oldal.
80. Rippka, R. (1972) *Arch. Microbiol.* **87**. 93-98. oldal.
81. Van Baalen, C., D.S. Hoare és E. Brandt (1971) *J. Bacteriol.* **105**. 685-689. oldal.
82. Pearce, J. és N.G. Carr (1969) *J. Gen. Microbiol.* **54**. 451-462. oldal.
83. Biacs, P.A. és H.G. Daood (1994): High-performance liquid chromatography with photodiode-array detection of carotenoids and carotinoid esters in fruits and veges. *J. Plant Physiol.* **143**. 520-525. oldal.
84. Ibelings, B.W. és L.R. Mur (1992): Microprofiles of Photosynthesis and Oxygen Concentration in *Microcystis* Sp Scums. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**. 195-203. oldal.

85. Moezelaar, R. és L.J. Stal (1994): Fermentation in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Arch. Microbiol.* **162**. 63-69. oldal.
86. Okino, T., H. Matsuda, M. Murakami és K. Yamaguchi (1993): Microginin, an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* **15**;34(3). 501-504. oldal.
87. Choi, B.W., M. Namikoshi, F. Sun és társai (1993): Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. *Tetrahedron Lett.* **34**. 7881-7884. oldal.
88. Okino, T., M. Murakami, R. Haraguchi, H. Munekata, H. Matsuda és K. Yamaguchi (1993): Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* **34**. 8131-8134. oldal.
89. Martin, C., L. Oberer, T. Ino, W.A. König, M. Busch és J. Weckesser (1993): Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. *The Journal of Antibiotics.* **46**. 1550-1556. oldal.
90. Jungmann, D. (1992): Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active than two microcystins. *Limnol. Oceanogr.* **37**. 1777-1783. oldal.
91. Padan, E. és M. Shilo (1969): Short trichome mutant of *Plectonema boryanum*. *J. Bacteriol.* **97**. 975-976. oldal.
92. Safferman, R.S., R.E. Cannon, P.R. Desjardins és társai (1983): Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria. *Intervirology.* **19**. 61-66. oldal.
93. Padan, E. és M. Shilo (1969): Distribution of cyanophages in natural habitats. *Verh. Int. Verein. Limnol.* **17**. 747-751. oldal.
94. Waterbury, J.B. és F.W. Valois (1993): Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. 3393-3399. oldal.
95. Bratbak, G., M. Heldal, S. Norland és T.F. Thingstad (1990): Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**. 1400-1405. oldal.
96. Wiggins, B.A. és M. Alexander (1985): Minimum bacterial density for bacteriophage replication: Implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**. 19-23. oldal.
97. Bergh, O.I., K.Y.I. Borsheim, G. Bratbak és M. Heldal (1989): High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature.* **340**. 467-468. oldal.
98. Suttle, C.A., A.M. Chan és M.T. Cottrell (1990): Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature.* **347**. 467-469. oldal.
99. Lenski, R.E. és B.R. Levin (1985): Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: A model, some experiments, and predictions for natural communities. *Am. Nat.* **125**(4). 585-602. oldal.
100. Padan, E. és M. Shilo (1973): Cyanophages - Viruses attacking blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* **37**. 343-370. oldal.
101. Levin, B.R., F.M. Stewart és L. Chao (1977): Resource-limited growth, competition, and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage. *Am. Nat.* **111**. 3-24. oldal.
102. Proctor, L.M. és J.A. Fuhrman (1990): Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature.* **343**. 60-62. oldal.
103. Phung, L.T., G. Ajlani és R. Haselkorn (1994): P-type ATPase from the cyanobacterium *Synechococcus* 7942 related to the human Menkes and Wilson disease gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**. 9651-9654. oldal.
104. Allen, M.M. (1968): Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* **4**. 1-4. oldal.
105. Codd, G.A. és W.W. Carmichael (1982): Toxicity of a clonal isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from Great Britain. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**. 409-411. oldal.
106. Reed, L.J. és H. Muench (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* **27**. 493-497. oldal.

107. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. **227**. 680-685. oldal.
108. Borbely, G. és G. Suranyi (1988): Cyanobacterial heat shock proteins and stress responses. *Methods Enzymol.* **167**. 622-629. oldal.
109. Bourke, A.T.C., R.B. Hawes, A. Neilson és N.D. Stallman (1983): An outbreak of hepato enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon*. **3(Suppl.)**. 45-48. oldal.
110. Bourke, A.T.C. és R.B. Hawes (1983): Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) and human health. *Med. J. Aust.* **1**. 491-492. oldal.
111. Byth, S. (1980) *Med. J. Aust.* **2**. 40-42. oldal.
112. Meriluoto, J.A.O. és J.E. Eriksson (1988): Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. *J. Chromatogr.* **438**. 93-99. oldal.
113. Brooks, W.P. és G.A. Codd (1986): Extraction and purification of toxic peptides from natural blooms and laboratory isolates of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**. 1-3. oldal.
114. Harada, K., K. Matsuura, M. Suzuki és társai (1988): Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **448**. 275-283. oldal.
115. Fitzgerald, R.L. (1994): HPLC and drug analysis. Response. *Clin. Chem.* **40**. 953
116. Cremer, J. és K. Henning (1991): Application of Reversed-Phase Medium-Pressure Liquid Chromatography to the Isolation, Separation and Amino Acid Analysis of 2 Closely Related Peptide Toxins of the Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa* Strain PCC-7806. *J. Chromatogr.* **587**. 71-80. oldal.
117. Cohen-Kupiec, R., M. Gurevitz és A. Zilberstein (1993): Expression of *glnA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is initiated from a single *nif*-like promoter under various nitrogen conditions. *J. Bacteriol.* **175**. 7727-7731. oldal.
118. Kiviranta, J., M. Namikoshi, K. Sivonen, W.R. Evans, W.W. Carmichael és K.L. Rinehart (1992): Structure determination and toxicity of a new Microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon*. **30**. 1093-1098. oldal.
119. Kiviranta, J. (1992): Larvicidal effects of toxic cyanobacteria on yellow fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Acta Pharm Fenn.* **101**. 105-109. oldal.
120. Runnegar, M.T.C., S.-M. Kong, Y.-Z. Zhong, J.-L. Ge és S.C. Lu (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. oldal.
121. P.Zánkai, N. (1981): Daphnia-fajok táplálkozása a Balatonban. *Állattani Közlemények*. **LXVIII**. 111-121. oldal.
122. Woolf, V.M., B.P. Wittmershaus, W.F.J. Vermaas és T.D. Tran (1994): Resolution of low-energy chlorophylls in Photosystem I of *Synechocystis* sp. PCC 6803 at 77 and 295 K through fluorescence excitation anisotropy. *Photosynth. Res.* **40**. 21-34. oldal.
123. Rouag, D. és P. Dominy (1994): State adaptations in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 (PCC): Dependence on light intensity or spectral composition. *Photosynth. Res.* **40**. 107-117. oldal.
124. Spiller, H., W. Stallings, Jr., C. Tu és M. Gunasekaran (1994): Dependence of H⁺ exchange and oxygen evolution on K⁺ in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain UTEX 2380. *Can. J. Microbiol.* **40**. 257-265. oldal.
125. DeMott, W.R. és F. Moxter (1991): Foraging on cyanobacteria by copepods: Responses to chemical defenses and resource abundance. *Ecology*. **72**. 1820-1834. oldal.
126. Edmondson, W.T. és A.H. Litt (1982): *Daphnia* in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* **27(2)**. 272-293. oldal.
127. Infante, A. és S.E.B. Abella (1985): Inhibition of *Daphnia* by *Oscillatoria* in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* **30(5)**. 1046-1054. oldal.

128. Jarvis, A.C., R.C. Hart és S. Combrink (1987): Zooplankton feeding on size fractionated *Microcystis* colonies and *Chlorella* in a hypertrophic lake (Hartbeespoort Dam, South Africa): implications to resource utilization and zooplankton succession. *J. Plankton Res.* **9**(6). 1231-1249. oldal.
129. DeMott, W.R., Q.-X.Z. Zhang és W.W. Carmichael (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **36**(7). 1346-1357. oldal.
130. Nizan, S., C. Dimentman és M. Shilo (1986): Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.* **31**(3). 497-502. oldal.
131. Lampert, W. (1981): Inhibitory and toxic effects of blue-green algae on *Daphnia*. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* **66**. 285-298. oldal.
132. Reinikainen, M., M. Ketola és M. Walls (1994): Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnol. Oceanogr.* **39**. 424-432. oldal.
133. Haney, J.F. (1973): An in situ examination of the grazing activities of natural zooplankton communities. *Arch. Hydrobiol.* **72**. 87-132. oldal.
134. Eriksson, J.E., J.A.O. Meriluoto és T. Lindholm (1989): Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. *Hydrobiologia*. **183**. 211-216. oldal.
135. Goriushyn, V.A. és S.M. Chaplinskyaya (1968): The discovery of viruses lysing blue-green algae in the Dneprovsk reservoirs. *Tsvetenie Vody. Dumka.* (Kiev).
136. Rubenchik, L.I., O.I. Bershova, N.S. Novikova és Z.P. Koptyeva (1966): Lysis of blue-green alga *Microcystis pulvera*. *Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk. Ukr. RSR.* **28**. 88-91. oldal.

8. Az ábrák jegyzéke

1. ábra A fitoplankton megoszlása a Balatonban 1976-ban (1)	4
2. ábra Az anatoxin-a szerkezeti képlete	9
3. ábra A saxitoxin szerkezeti képlete	9
4. ábra A nodularin szerkezeti képlete	11
5. ábra A mikrocisztin-LR szerkezeti képlete	12
6. ábra A cianobaktériumok helye az evolúciós törzsfán	15
7. ábra Egy cianobaktérium sejt sematikus képe	17
8. ábra A cianotoxin megoszlása a <i>Microcystis aeruginosa</i> sejtek és a tápoldat között	48
9. ábra A cianotoxinok hatása néhány egysejtű növekedésére	49
10. ábra Az <i>E. coli</i> baktérium növekedése különböző mikrocisztin koncentrációk mellett	50
11. ábra A <i>Paramecium caudatum</i> életképessége mikrocisztin jelenlétében	51
12. ábra A <i>Synechococcus</i> sp. protein szintézise	52
13. ábra A <i>Synechococcus</i> sp. protein foszforilációja in vivo	54
14. ábra A mikrocisztin hatása a <i>Synechococcus</i> sp. protein foszforilációjára in vitro	55
15. ábra A különböző toxinkoncentrációkkal kezelt <i>A. thaliana</i> magoncok	56
16. ábra A toxin hatása a lucerna növekedésére	57
17. ábra A toxin β komponensének hatása a mustár csíranövények növekedésére	58
18. ábra A mikrocisztin hatása fényben (a) ill. sötétben (b)	59
19. ábra Az IC_{50} meghatározása búza csíranövényekkel	60
20. ábra A mikrocisztin hatása a békalencse növekedésére	61
21. ábra Az IC_{50} meghatározása békalencsével	62
22. ábra A mikrocisztin hatása a gyékény csíranövények növekedésére	63
23. ábra A toxin hatása a <i>Drosophyla melanogaster</i> lárvák életképességére	64
24. ábra A <i>Synechococcus</i> sp. lízisének gátlása	65
25. ábra A mikrocisztin hatása az AS-1 fágok fejlődésére	66

26. ábra	A mikrocisztin hatása a λ fágok fejlődésére	67
27. ábra	A mikrocisztin termostabilitása	69
28. ábra	Az ultrahangos kezelés és a fagyasztás hatásának összehasonlítása	71
29. ábra	A toxinpreparátum DE-52 kromatogramja	75
30. ábra	A DE-52 oszloppal elválasztott toxinkomponensek HPLC kromatogramja	76
31. ábra	A két toxinpreparátum összehasonlítása	77
32. ábra	A mikrocisztin toxicitása az egértestben	79
33. ábra	A toxinpreparátum HPLC kromatogramja	80
34. ábra	A toxinpreparátum összetevőinek UV spektruma	81
35. ábra	A fő toxinkomponensek aminosav analízise	83
36. ábra	Az α jelű toxinkomponens NMR spektruma	84
37. ábra	A β jelű toxinkomponens NMR spektruma	85

Tartalomjegyzék

1. A bevezetés és a célkitűzés	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A vízvirágzásokat okozó cianobaktériumok és toxinjaik	3
2.1.1. A toxikus vízvirágzások	3
2.1.2. A toxikus cianobaktériumok	6
2.1.3. A cianotoxinok típusai	7
2.1.3.1. A lipopoliszacharidok	8
2.1.3.2. A neurotoxinok	8
2.1.3.3. A hepatotoxinok	10
2.2. A cianobaktériumok	13
2.2.1. A cianobaktériumok megjelenése a Földön, az ökológiai jelentőségük	13
2.2.2. A cianobaktériumok sejtszerveződése	16
2.2.3. A cianobaktériumok rendszertani és biokémiai helye, C- és N-anyagcseréjük	18
2.2.3.1. A cianobaktériumok rendszerének rövid áttekintése	18
2.2.3.2. A cianobaktériumok energianyerése és szénanyagcseréje	21
2.2.3.3. A nitrogén anyagcsere	22
2.2.3.4. A makromolekulák anyagcseréjének általános jellemzése és fényfüggősége	23
2.2.3.5. Az obligát fotoautotrófia biokémiai alapjai a cianobaktériumokban	24
2.3. A <i>Microcystis aeruginosa</i>	25
2.4. A cianobaktériumok kapcsolata életközösségük tagjaival	25
2.4.1. A vírusok szerepe a cianobaktérium populációk méretének szabályozásában	26
3. Anyagok és módszerek	30
3.1. Vegyszerek	30
3.2. Organizmusok	30
3.2.1. <i>Microcystis aeruginosa</i>	30
3.2.2. Egyéb szervezetek	31
3.3. A cianobaktérium tenyésztés körülményei	31
3.3.1. A cianobaktérium kultúra fenntartása	31
3.3.2. A növekedés nyomon követése	32
3.4. A toxin tisztítására és vizsgálatára használt módszerek	33
3.4.1. Az extrakció	33
3.4.2. A szilárd fázisú extrakció, és a cartridge használata	33
3.4.3. A HPLC	35
3.4.3.1. Az analitikai HPLC	36
3.4.3.2. A preparatív HPLC	36
3.4.4. A DE-52 oszlopkromatográfia	36

3.5. A toxicitási tesztek	37
3.5.1. A baktérium-, a cianobaktérium- és a zöldalgatesztek	37
3.5.2. Protozoa teszt	38
3.5.3. A magasabbrendű növények nevelése	39
3.5.3.1. A mustár és a lucerna	39
3.5.3.2. A búza	39
3.5.3.3. Az <i>Arabidopsis sp.</i> , a gyékény és a dohány	39
3.5.3.4. A békalencse	40
3.5.4. A <i>Drosophyla melanogaster</i> teszt	40
3.5.5. Az egértesztek	40
3.6. Anyagvizsgáló módszerek	41
3.6.1. A diódasoros analitikai HPLC	41
3.6.2. Aminosav analízis	41
3.6.3. NMR	42
3.7. Radioaktív izotópos jelölések	43
3.7.1. A fehérje szintézis vizsgálata ³⁵ S-jelöléssel	43
3.7.2. Az <i>in vivo</i> foszforiláció	44
3.7.3. Az <i>in vitro</i> foszforiláció	44
3.7.4. A poliakrilamid gélelektroforézis és a szárított gélek autoradiográfiás vizsgálata	44
3.8. A vírusinfekciós kísérletek	45
3.8.1. A <i>Synechococcus sp.</i> - AS-1 rendszer	45
3.8.2. Az <i>E. coli</i> - λ rendszer	46
4. A kísérleti eredmények	47
4.1. A cianotoxin megoszlása a sejtek és a tápfolyadék között	47
4.2. A toxin hatása más szervezetek növekedésére	48
4.2.1. Az egysejtűek	48
4.2.1.1. Az <i>E. coli</i> baktérium növekedése cianotoxin jelenlétében	50
4.2.1.2. A mikrocisztin hatása a <i>P. caudatum</i> életképességére	50
4.2.1.3. A <i>Synechococcus sp.</i> protein szintézisére és protein foszforilációjára gyakorolt hatás	51
4.2.2. A cianotoxinok hatása a magasabbrendű növényekre	56
4.2.2.1. A <i>Medicago sativa</i> csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében	56
4.2.2.2. A <i>Sinapis alba</i> csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében	57
4.2.2.3. A <i>Triticum aestivum</i> csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében	58
4.2.2.4. A <i>Lemna minor</i> növekedése cianotoxinok jelenlétében	60
4.2.2.5. A <i>Typha sp.</i> csírázása és növekedése a cianotoxinok jelenlétében	62
4.2.3. A mikrocisztin hatása a <i>Drosophyla melanogaster</i> lárvákra	63
4.3. A toxin hatása a vírusok szaporodására	64
4.3.1. A toxin hatása a cianobaktérium – cianofág rendszerre	64
4.3.2. A toxin hatása az <i>E. coli</i> baktérium – λ fág rendszerre	66
4.4. A mustárteszt kidolgozása	68
4.4.1. A mustár kiválasztása	68
4.4.2. A toxin hőstabilitása	68
4.4.3. A fagyasztás és a szonikálás összehasonlítása a cianotoxinok kivonása során	70
4.4.4. A táptalaj térfogata	73
4.5. A toxin tisztítása	73
4.5.1. Az extrahálószerrek összehasonlítása	73
4.5.2. A DE-52 oszlopkromatográfia	75

4.5.2.1. A preparatív HPLC	77
4.6. A toxin azonosítása	78
4.6.1. Az egérteszt	78
4.6.2. HPLC	79
4.6.3. Az aminosav analízis	82
4.6.4. Az NMR vizsgálatok	83
5. Az eredmények megvitatása	86
5.1. A toxin komponensek azonosítása	86
5.2. A toxin tisztítás optimalizálása	88
5.3. A mustárteszt kidolgozása	90
5.4. A toxin hatása vízi élőlényekre, feltételezett szerepe a vízi ökoszisztémákban	92
5.4.1. A táplálékkonkurenszek	93
5.4.2. A predátorok	94
5.4.3. A heterotróf baktériumok	96
5.4.4. A cianofágok	96
6. Köszönetnyilvánítás	100
7. Az idézett irodalom	100
8. Az ábrák jegyzéke	106