

B 3325

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA  
SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT  
NÖVÉNYBIOLÓGIAI INTÉZET

**A *Microcystis aeruginosa*  
toxintermelése**



**Kós Péter**

**A doktori értekezés tézisei**

**1996.**

Korunk egyik jelentős környezeti problémája egyes alga- és cianobactérium fajok tömeges elszaporodása, az ún. vízvirágzás. A jelenség jobbra a környezetszennyezéshez kapcsolódik, bár az ezt elősegítő tényezőket még nem ismerjük kielégítően. A cianobactérium populációk növekedésére számos faktornak jelentős hatása van, ilyenek pl. a fény, a hőmérséklet, a tó morfológiája, a víz cirkulációja, a zooplankton táplálkozása stb. E tényezők az egyes fajok mennyiségét és arányát egyaránt meghatározhatják. A környezeti paraméterek váltakozása a domináns fajok szukcesszióját eredményezi.

A cianobactérium fajokok egy része megfelelő környezeti hatásokra a víz felszínén összegyűlik, olykor vastag tajtékot képezve. Ezen fajok legtöbbje toxinokat is termel. A leggyakrabban előforduló toxinok szerkezete ismert, azonban nem ismerjük az ezek termelődéséhez vezető biokémiai folyamatokat. Az egereken végzett toxicitási tesztek adatai azt mutatják, hogy a cianobactériális toxinok a legerősebb biológiai eredetű mérgek közé tartoznak.

A probléma tanulmányozásának elengedhetetlen feltétele, hogy megfelelően reprodukálható, standard minőségi és mennyiségi analitikai módszerek álljanak rendelkezésre a toxinok meghatározására különböző mintákban.

A cianotoxinoknak a tavak és víztározók flórájára és faunájára gyakorolt hatását eddig még nem vizsgálták részletesen.

A jelen munkánkban a leggyakrabban előforduló toxintermelő cianobactérium, a *Microcystis aeruginosa* által termelt toxin tanulmányozásával foglalkoztunk. A termelt toxin ciklikus heptapeptid változatok elege; ezeket microcisztimeknek nevezzük. Öt állandó és két változó aminosavból állnak, relatív molekulatömegük 1 kDa körüli. A legtöbb laboratóriumi izolátum egyidejűleg több microcisztin változatot termel. Ezideig több mint 50 változatot azonosítottak. Ezek toxicitása különböző lehet. A leggyakrabban előforduló microcisztin változatot a microcisztin-LR.

Az 1991-ben a velencei-tavi vízvirágzás során gyűjtött *Microcystis aeruginosa*-t izoláltuk. Elkülönítettük a toxikus frakciót, és a HPLC analízis alapján több microcisztin változat valószínű jelenlétét tapasztaltuk. Ezek közül a két legnagyobb mennyiségben előforduló összetevőt tisztítottuk. Aminosav-analízis és NMR vizsgálat segítségével megállapítottuk, hogy ezek microcisztin-LR (a változó aminosavak: leucin és arginin) illetve microcisztin-YR (a változó aminosavak: tirozin és arginin).

Egyszerűsítettük a toxin tisztítási módszert. Egy olya eljárást írtunk le, ami egyszerűen kivitelezhető, és amivel az egyes komponenseket 94-98 %-os tisztaságát lehet elérni. Továbbá

a módszer nem igényel jelentős műszerezettséget, így olyan laboratóriumokban is alkalmazható, ahol preparatív HPLC nem áll rendelkezésre.

Kidolgoztunk egy új tesztet a tisztított toxinkomponensek és nyers minták toxicitásának meghatározására. A módszer a mustár (*Sinapis alba*) magok csíráztatásán alapul. A mintát tartalmazó, agarral szilárdított tápoldatra vetett magokból kifejlődő csíranövények hossza a minta toxicitásának függvényében különbözik (elmarad) a kontroll csíranövények hosszától. Az eljárás az elterjedt egér-teszt felváltását teszi lehetővé és azzal közel azonos érzékenységgű. Itt a csíranövények hossza az egerek túlélő képességének megfelelően jellemző a minta toxicitására. Az élő szervezetben lejátszódó folyamatok rendkívüli sokfélesége és sokoldalú kölcsönhatása miatt e teszt nem specifikus, vagyis a toxin kvalitatív azonosítására (mint pl. az ELISA, HPLC és egyéb módszerek) nem alkalmazható. Ugyanakkor, minthogy a tápoldatban a lipidek nem oldódnak, az egér-tesztnél specifikusabb. (A teljes sejteket tartalmazó vízminták vizsgálata esetén a baktériumok toxikus sejtfal-alkotói gyakran megnehezítik az egér-tesztek eredményeinek értelmezését.) A módszer olyan laboratóriumokban is alkalmazható, ahol kísérleti egerek nem állnak rendelkezésre.

Vizsgáluk a cianotoxin termelés biológiai jelentőségét, megkíséreltük meghatározni azokat a várható előnyöket, amelyek ellensúlyozzák a sejt szárazanyagának mintegy 0,2 %-át kitevő toxin szintézisével járó anyag- és energia vesztséget.

A cianobaktériumok természetes élőhelyeiken számos szervezettel kerülnek kapcsolatba. Ezek egymásra is hatnak az általuk termelt anyagokkal, illetve az oxigén, a tápanyag, vagy a fény mennyiségét csökkentve stb. Továbbá e szervezetek a cianotoxinok hatásának is ki vannak téve. A zooplankton táplálkozása ilyen szempontból szintén meghatározó jelentőségű lehet. A sokféle lehetséges kölcsönhatás jobb megértése érdekében megvizsgáltuk a mikrocisztin kivonatoknak illetve a teljes *Microcystis aeruginosa* sejteknek a cianobaktériumokkal azonos élőhelyen előforduló élőlények főbb csoportjainak egyes jellegzetes képviselőire gyakorolt hatását.

Úgy találtuk, hogy a toxin nem gátolja az egysejtűek (baktériumok, cianobaktériumok, algák) növekedését. A magasabbrendű növények azonban lassabban csíráznak és növekednek *Microcystis aeruginosa* sejtek ill. microcisztin jelenlétében, és ez a növekedésgátló hatás az alkalmazott toxin koncentrációjától függ. Számos növényfajt megvizsgáltunk e tekintetben, és mindegyiknél hasonló tendencia volt megfigyelhető. Úgy gondoljuk, hogy e hatást figyelembe kell venni a toxikus vízvirágzásokot okozó cianobaktériumok ökológiai szerepének megítélésében.

*Drosophyla melanogaster* lárvákon egyértelmű toxikus hatást mutattunk ki. Ez egybehangzik a szúnyoglárvákkal (*Aedes aegypti*) kapcsolatban leírtakkal. Figyelembe véve, hogy a szűrő zooplankton eddig tanulmányozott képviselőire (főként *Daphnia* fajok) toxikusnak bizonyult a mikro-cisztin, feltételezhetjük, hogy a toxin termelése általánosságban a cianobaktériumokkal táplálkozó rovarok és zooplankton elleni védekező funkció. A papucsállatkákra (*Paramecium caudatum*) gyakorolt toxikus hatás is ezt látszik tovább valószínűsíteni.

A mikro-cisztinek a 2A típusú protein foszfatázok inhibitorai. Megvizsgáltuk egy toxin nem termelő cianobaktérium protein foszforilációját mikro-cisztin jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* megváltozik a foszforilációs profil a mikro-cisztin hatására. A toxin nem okozott jelentős növekedés gátlást, úgyhogy az említett változásnak nem lehet lényeges szerepe a sejtek általános anyagcseréjében. Feltételeztük azonban, hogy valamely védekező mechanizmusban szerepe lehet. E hipotézis ellenőrzésére a cianobaktériumok vírusfertőzését vizsgáltuk meg.

A cianobaktériumok vírusait, a cianofágokat szigorú gazda-specifitás jellemzi. Minthogy a *Microcystis aeruginosa*-nak nincsen ismert fága, a *Synechococcus* sp.-AS-1 fág rendszert választottuk modellként. Kimutattuk, hogy az AS-1 fágok szaporodása mikro-cisztin jelenlétében gátolt. Nem tudtunk ilyen hatást kimutatni *E. coli*-λ fág rendszerben. A cianofágok lényeges szerepet játszanak az egyes fajok elszaporodásának és egymás közötti arányuk szabályozásában. Úgy gondoljuk, hogy a mikro-cisztin produkció lényeges szerepet játszik a cianobaktériumoknak a fágok elleni védekezésében. Minthogy eddig egyetlen cianofágot sem izoláltak, amelynek toxintermelő cianobaktérium volna a gazdaszervezete, valószínűnek tartjuk, hogy a mikro-cisztin termelése evolúciós előnyhöz juttatja az erre képes cianobaktérium fajokat.

Munánk során tehát

- ✓ izoláltuk, azonosítottuk és karakterizáltuk a *Microcystis aeruginosa* egy új izolátumának fő toxin komponenseit.
- ✓ Leírtunk egy olcsó, egyszerű, gyors és megbízható toxin tisztítási módszert, valamint egy hasonló előnyökkel rendelkező új toxicitási tesztet.
- ✓ Megvizsgáltuk a cianotoxinok a cianobaktériumokkal kölcsönhatásba kerülő szervezetek jellegzetes képviselőire gyakorolt hatását.
- ✓ Kimutattuk a toxintermelésből származó legvalószínűbb ökológiai előnyöket.