

Különböző országokból származó cianobaktérium populációk toxicitása

Törökne Kozma Andrea¹, László Erzsébet¹, Ingrid Chorus², Jutta Fastner², Rita Heinze², Padisák Judit³, Francisco A. R. Barbosa⁴

¹Fodor József Országos Közegészségügyi Központ, 1966. Budapest, Pf 64.

²Institute for Water, Soil and Air Hygiene of the German Environmental Protection Agency, Corrensplatz 1, D-14191, Berlin, Germany

³Veszprémi Egyetem, 8200. Veszprém, Pf. 158.

⁴Federal University of Minas Gerais, P. O. B. 486, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

Kivonat:

7 *Microcystis* és 2 *Planktothrix* toxintermelő cianobaktérium minta vizsgálatára került sor, melyek a Velencei tóból, Braziliából és Németországból származnak. A minták egy része a természetben gyűjtött biomaszra, míg másik része törzsiszolátum. A toxicitás detektálására Thamnotox kitted, patkány májsejtvonalat, egértesztet alkalmaztunk. Az eredményeket összevetettük a HPLC-s analízis eredményeivel, mely szerint a brazil mintákban microcystin LR forma, vagyis a legtoxikusabb variáns nem fordult elő. A magyar és német minták egyaránt tartalmazták mindhárom vizsgált microcystin formát (LR, RR, YR), azonban a magyar mintákban az LR forma koncentrációja egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a német mintákban. Toxicitásában a magyar és brazil minták mutattak hasonlóságot, bár a brazil minták nem tartalmaztak LR variánst, de az RR forma koncentrációja olyan magas volt (12,5 és 14,8 mg/g), hogy ez jelentkezett a hasonló toxicitásában. A német minták alacsonyabb toxicitása a kisebb toxintartalommal magyarázható. A korreláció a Thamnotox teszttel szemben az egérteszt eredmények között igen szoros ($r: 0.967$), míg a teljes toxin koncentráció és az egérteszt között 0.473 , ugyanígy a teljes toxin koncentráció és a Thamnotoxkit teszttel szemben 0.680 jóval gyengébb az összefüggés. Hasonló eredményre jutottunk a májsejtekre kifejtett toxikus hatással kapcsolatban is. A biomaszra kivonatok toxikusabbnak tűnnek, mint az a microcystin tartalommal magyarázható lenne, tehát feltételezhető, hogy a már ismert toxinokon kívül más toxikus hatású vegyületekkel is kell számolnunk a cianobaktériumoknál.

Kulcsszavak:

cianobaktérium toxinok, Thamnotoxkit, *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp.

Bevezetés

Felszíni vizek eutrofizációja felgyorsult az emberi tevékenység következtében, így a mezőgazdaság műtrágya felhasználása, a nem kellően megtisztított kommunális szennyvizek a felszíni vizekbe kerülve növelik a külső tápanyagterhelést. Emellett nem elhanyagolható az ún. belső terhelés sem, ami a már eutrofizálódott vizek biomaszra termeléséből és annak elpusztulásából és mineralizációjából tevődik össze. Ezek hatására alakulnak ki a vízvirágzások, melyeket főleg a potenciálisan toxintermelő cianobaktériumok okoznak. Ezek a jelenségek ma már világmértekek (*Codd és Bell*, 1998). Jelenleg fő feladataink közé tartozik a cianobaktériumok és toxinjaik megjelenésének monitorozása alternatív biológiai tesztekkel és kémiai meghatározásokkal.

Jelen munkánkban az alternatív biológiai tesztek skálájának bővítésére vizsgáltuk a *Thamnocephalus platyurus* édesvízi csupaszrak lárváinak, a patkány májsejt kultúra in vitro teszt érzékenységét cianobaktériumok toxinjaival szemben összehasonlítva az intraperitoneális (ip) egérteszttel.

1. táblázat.

Thamnotoxkit teszttel vizsgált cianobaktérium minták
Table 1:
Origin of cyanobacterium samples investigated by Thamnotoxkit-test

Sz.	Domináns faj	A gyűjtés időpontja	A minta eredete (ország)
1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	09.06.1997	Velencei tó, Dinnyés, Magyaro.
2	<i>Microcystis aeruginosa</i>	25.06.1998	Velencei tó, Gárdony, Magyaro.
3	<i>Microcystis aeruginosa</i>	16.03.1998	Velencei tó, üledék, Magyaro.*
4	<i>Microcystis aeruginosa</i>	02.02.1998	Barra Bonita tározó, Brazília
5	<i>Microcystis aeruginosa</i>	02.02.1998	Bariri tározó, Brazília
6	<i>Microcystis</i> sp.	23.08.1995	Wannsee, Németország.
7	<i>Planktothrix agardhii</i>	05.09.1996	Östertalsperre, Németország**
8	<i>Planktothrix rubescens</i>	27.08.1996	TS Weida, Németország
9	<i>Microcystis</i> sp.	01.07.1997	Radeburg, Németország

A minták mindegyike - egy kivétellel - planktonháló volt.

A kivétel a *-gal jelzett minta, amely törzsiszolátum.

** A mintát Dr. Nusch, Ruhrverband biztosította

Anyag és módszer

Az 1. táblázatban foglaltuk össze azokat a cianobaktérium mintákat, amelyek toxicitását vizsgáltuk Thamnotoxkit teszttel. A fenn leírt 9 mintánál elvégeztük a Thamnotoxkit tesztet, melyet 1997-ben közöltünk (*Törökne* 1997). Néhány esetben (1.2.3. minta) meghatároztuk az ip. egértesztben a Minimális Letális Dózis (MLD) értékét *Falconer* módszer szerint (1993). A német minták (6.7.8. minta) toxicitását in vitro májsejt kultúrával ellenőriztük *Fastner et al.* szerint (1995)

A nagyérzékenységű folyadékkromatográfiás (HPLC) analízist Hewlett Packard 1090 A készülékkel *Lawton et al.* (1994) módszere szerint végeztük.

Eredmények és megvitatásuk

A HPLC analízis eredményei (2. táblázat) rámutatnak a microcystin (MC) formák eloszlásbeli különbségeire a magyar (1.2.3. minta) és a brazil (4.5. minta) minták esetében. Mindegyik magyar minta tartalmazott MC-LR formát, melyet minden esetben a MC-RR és főleg MC-YR formák kísérték, mely adatokat előző vizsgálatunk is alátámasztják (*Törökne*, in press, a). Jelen vizsgálatunkban a legnagyobb koncentrációt (7,8 mg/g) a Velencei tó üledékéből kitenyészett mintában találtuk.

2. táblázat. A Thamnotoxkit teszt és HPLC analízis eredményei (LC₅₀ értékek mg liofilizált algapor/mL, a microcystin tartalom mg toxin/g szárazanyag)

Table 2:

Results of Thamnotoxkit test and HPLC analyses (LC₅₀ values refer to freeze-dried algal bloom material/mL, microcystin content is given in units mg toxin/g dry weight+)

Sz.	Szervezet	Thamnotoxkit LC ₅₀	Microcystin LR	Microcystin RR	Microcystin YR	Összes microcystin
1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.22	1.18	0.42	0.11	1.71
2	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.89	1.66	0.58	4.36	6.60
3	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.49	1.92	0.75	5.13	7.80
4	<i>Microcystis</i> sp.	0.55	0.0	12.5	2.2	14.7
5	<i>Microcystis</i> sp.	0.40	0.0	14.8	2.7	17.1
6	<i>Microcystis</i> sp.	1.65	0.41	0.76	0.26	1.56
7	<i>Planktothrix aghardii</i>	0.53	0.17*	0.24*	0.94*	3.60
8	<i>Planktothrix rubescens</i>	0.25	0.11*	0.2*	0.26*	2.40
9	<i>Microcystis</i> sp.	1.81	0.93	0.11	0.43	2.76

*demetilált microcystin forma

A gyűjtött mintákban különböző microcystin formák találhatók különböző arányban. Az USA-beli Homer tóból gyűjtött *Microcystis* virágzásban például 19 különböző microcystin formát tudtak karakterizálni (*Namikoshi et al.*, 1995). A microcystin-LR forma a természetben a leggyakrabban előforduló variáns. Erről számolnak be Portugáliából (*Vasconcelos et al.* 1995), Franciaországból (*Vezie et al.* 1997), Kanadából (*Kotak et al.*, 1993). Jelen munkánk rámutatott arra, hogy a brazil minták azonban nem tartalmaztak MC-LR formát. Hasonlóan erre az eredményre jutottak Ausztráliában, ahol 23 microcystin variánst azonosítottak, azonban egy sem volt microcystin-LR (*Jones et al.* 1995).

A toxicitást tekintve a magyar és brazil minták hasonlóak voltak. Bár a brazil mintákban a microcystin tartalom többszörös a magyar mintákhoz képest, a hasonló toxicitás, abból adódik hogy a MC-RR forma a legkevésbé toxikus variáns. A 4 német minta kisebb toxicitást mutatott, ami az alacsonyabb toxin koncentrációval magyarázható. A Velencei tó üledékéből izolált *Microcystis aeruginosa* törzs toxicitása hasonló volt a nyári vízvirágzás idején gyűjtött *Microcystis aeruginosa* biomaszra toxicitásával (2.táblázat 3.és 1. minta). Az egértesztet és

Thamnotoxkit tesz eredményei között a korreláció igen erős jelenleg vizsgálati anyagunkban ($r:0,967$), míg az egérteszt és össz-microcystin tartalom között sokkal gyengébb ($r:0,473$), hasonlóan a Thamnotoxkit teszt és össz-microcystin között a korrelációs együttható csak 0,680. Úgy tűnik, hogy a cianobaktériumok vizes kivonatai a microcystineken kívül tartalmaznak még olyan vegyületeket, amelyek toxikusak mind az egerekre, mind a kiskrokokra. A 8. német *Planktothrix agardhii* minta esetében például a toxicitás sokkal kifejezettebb, mint az össz-microcystin tartalom alapján számított érték. A toxicitás alapján a 8. minta 7,69 mg/g MC-LR-t kellene tartalmazzon, a valóságban azonban 3,60 mg/g össz-microcystint tartalmaz.

A 3. táblázatban összefoglaltuk az egérteszt, a *Thamnocephalus platyurus* teszt, a májsejt teszt valamint a HPLC analízis eredményeit. A brazil mintákat (4.5. minta) vizsgálták fehér mustár teszttel (BGST) is. A BGST teszt érzékenysége egy nagyságrenddel kisebb, mint a Thamnotoxkit teszt érzékenysége (Padisák et al., 1998). Jelen vizsgálatokban a májsejt teszt egy nagyságrenddel érzékenyebb volt, mint a Thamnotoxkit teszt, azonban a neurotoxintokat nem jelzi, míg a Thamnotoxkit teszt érzékeny a neurotoxintokra is (Törökné, in press, b). Az irodalmi adatokat átnézve a következőket tudjuk összegezni (4. táblázat) tiszta MC-LR-rel szembeni érzékenységre: A zebrahal embriók érzékenysége 3 nagyságrenddel kisebb, mint a *Thamnocephalus platyurus* lárváké. A microcystin-LR-rel szembeni két legérzékenyebb teszt a májsejt kultúra teszt és a Thamnotoxkit teszt.

3. táblázat.

Az egérteszt, a Thamnotoxkit teszt, a májsejt teszt és HPLC analízis eredményeinek összehasonlítása.

(n.v.: nem vizsgáltuk)

Table 3:

Comparison of mouse-test, Thamnotoxkit-test, rat hepatocyte test and HPLC analyses (n.v.: not tested)

Sz.	Szervezet	MLD az egértesztben (mg/g)	Thamnotox teszt LC ₅₀ (mg/mL)	Máj-sejt teszt (mg/mL)	Össz-microcystin (mg/g)
1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	20	0,22	n.v.	1.71
2	<i>Microcystis aeruginosa</i>	50	0.89	n.v.	6.60
3	<i>Microcystis aeruginosa</i>	25	0.49	n.v.	7.80
6	<i>Microcystis sp</i>	n.v.	1.65	0.22	1.56
7	<i>Planktothrix aghardii</i>	n.v.	0.53	0.08	3.60
8	<i>Planktothrix rubescens</i>	n.v.	0.25	0.026	2.40

4. táblázat.

Különböző teszt metodikák érzékenységének összehasonlítása microcystin-LR-rel szemben.

Table 4:

Comparison of sensitivity different test methods for microcystin-LR

Szervezet	LC ₅₀ or EC ₅₀ in µg/mL	References
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	0.1	Törökné (in press, a)
<i>Sinapis alba</i> (fehér mustár)	3.0	Kós et al (1995)
3 <i>Daphnia</i> faj	9.6-21.4	DeMott et al.(1991)
<i>Diaptomus birgei</i> (Copepoda)	0.45-1	DeMott et al.(1991)
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) embriók	> 10	Oberemm et al. (in press)
Patkány májsejt kultúra	0.2	Fastner et al. (1995)

Toxicity of some cyanobacterium populations from different countries

Törökné-Kozma, A., László, E., Chorus, I.², Fastner, J.,² Heinze, R., Padisák, J., Barbosa, F. A. R.⁴

Abstract:

The Thamnotoxkit FTM was evaluated for detecting cyanobacterial toxins as they may be hazardous to human health if they reach drinking water networks or if people are exposed through recreational activity. This test kit is a 24-hour bioassay using larvae of the freshwater anostracan crustacean *Thamnocephalus platyurus* hatched from cysts. Nine freeze-dried *Microcystis* and *Planktothrix sp.* samples from freshwaters of Hungary, Germany and Brazil were tested with the Thamnotox test, rat hepatocyte test, mouse test and analysed for microcystins by high performance liquid chromatography (HPLC). It can be concluded that the Thamnotox test is an alternative simple, cost-effective method that may replace the mouse bioassay used previously for determination of cyanobacterial toxicity.

Keywords:

cyanobacterial toxins, microcystins, *Thamnocephalus platyurus*, monitoring

Irodalom

- Codd G. A. and Bell S. G. (1998). Toxic Cyanobacteria - The Global View, in: *Proceedings of the 1998 Water TECH Meeting*, Brisbane, Australia, Apr. 27-28. AWWA, Artarmon, NSW, Australia, pp. 1-14
- DeMott W.R., Zhang Q.X., Carmichael W.W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 36(7): 1346-1357.
- Falconer I. R. (1993). Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, I.R. Falconer (ed.), Academic Press, London, pp. 165-175.
- Fastner J., Heinze R., and Chorus I. (1995). Microcystin-content hepatotoxicity and cytotoxicity of cyanobacteria in some German waterbodies. *Wat. Sci. Tech.* 32(4), 165 - 170.
- Jones G. J., Falconer I. F. and Wilkins R. M. (1995). Persistence of cyclic peptide toxins in dried cyanobacterial crusts from Lake Mokoan, Australia. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 19-24.
- Kós P., Gorzó Gy., Surányi Gy., Borbély Gy. (1995). Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry* 225, 49-53.
- Kotak B. G., Kenefick S. L., Fritz D. L., Rousseaux C. G., Prepas E. E., Hrudevy S. E. (1993). Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. - *Water Research* 27, 500-506.
- Lawton L. A., Edwards C., Codd G. A. (1994). Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119, 1525-1530.
- Namikoshi M., Sun F., Choi B. W., Rinehart K. L., Carmichael W. W., Evans W. R. and Beasley, V. R. (1995). Seven more microcystins from Homer lake cells: application of the general method for structure assignment of peptides containing dehydroamino acid units. *J. Organic Chemistry* 60, 3671-3679.
- Oberemm A., Becker G. A., Codd G.A., Steinberg C. (1999). Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.* in press.
- Padisák J., Barbosa F. A. R., Borbély G., Borics G., Chorus I., Espindola E. L. G., Rocha O., Törökné A. K., Vasas G. (1998). Phytoplankton composition, biodiversity and a pilot survey of toxic cyanoprokaryotes in a large cascading reservoir-system (Tietê basin, São Paulo State, Brazil) *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27.
- Törökné K. A., Nagy G. (1997). Rutinteszt elővizsgálatok cianobaktérium (kékalga) toxinok detektálására. *Hidrológiai Közöny* 77: 71-72.
- Törökné K. A. (1999a). A new culture-free microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins. *Environ. Toxicol. Water Qual.* in press
- Törökné K. A. (1999b). The potential of the Thamnotoxkit microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins. In: *Toxicity Screening and Biomonitoring*, Guido Persoone, Colin Janssen, Wim de Coen (eds), Publisher Kluwer Academic/Plenum Press, in press
- Vasconcelos V. M., Sivonen K., Evans W. R., Carmichael W. W., Namikoshi M. (1995). Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend Elekin. *Archiv für Hydrobiologie* 134, 295-305.
- Veize C., Brient L., Sivonen K., Betru G., Lefevre J.-C., Salkinoja-Salonen M., (1997). Occurrence of microcystins containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France). *Archiv für Hydrobiologie* 139, 401-413.