

# A cilindrospermopszin termelés analitikai vizsgálata *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumokban

Vasas Gábor<sup>1</sup>, Padisák Judit<sup>2</sup>, Mikóné Hamvas Márta<sup>3</sup>, Máthé Csaba<sup>3</sup>, Molnár Erika<sup>3</sup>, Surányi Gyula<sup>3</sup>, Grigorszky István<sup>3</sup>, Borbély György<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MTA DE Mikrobiológiai és Növénytani Kutatócsoport, <sup>2</sup>Veszprémi Egyetem, 8200. Veszprém, Pf. 158

<sup>3</sup>Debreceni Egyetem TTK Növénytani Tanszék, 4010. Debrecen, Egyetem tér 1.

**Kivonat:** Aphanizomenon ovalisporum cianobaktérium törzsből tisztítottunk HPLC-DAD és azonosítottunk MALDI-TOF, NMR segítségével cilindrospermopszint. A cilindrospermopszin standard segítségével magyarországi, braziliai valamint Ausztrál C. raciborskii izolátumok toxintartalmát határoztuk meg. A legmagasabb cilindrospermopszin tartalmat A. ovalisporumból mértünk (4mg/ml), valamint 2,5 mg/g toxintartalmat határoztunk meg az ausztrál izolátum esetében. A magyarországon izolált törzsek az általunk használt módszerekkel nem tartalmaznak kimutatható mennyiségben cilindrospermopszint.

**Kulcsszavak:** Cylindrospermopsis raciborskii, HPLC-DAD, cilindrospermopszin.

## Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben a „civilizáció tevékenységének” köszönhetően a felszíni vizek szerves- és szervetlen anyag tartalmának felhalmozódása jelentős mértékben megnőtt, s ennek következtében eutrofikációs folyamatok indultak és indulnak el (Reynolds, 1975). Világszerte ismert jelenség, hogy az ilyen eutróf vizekben toxintermelő cianobaktériumok szaporodhatnak el, vízvirágzást idézhetnek elő (Carmichael, 1994). Az utóbbi években egyre több kontinens vizeitében jelent meg a *Cylindrospermopsis raciborskii* (*C. raciborskii*) cianobaktérium faj és okozott vízvirágzást (Padisák, 1997, Vörös, nem publikált adat).

A faj toxintermelésre jellemző, hogy egyes izolátumaik termelik a cilindrospermopszin nevezetű cianotoxint, míg más izolátumok esetében saxitoxin analógokat mutattak ki, illetve több jelentős ismeretes cianotoxint nem termelő izolátumokról (Sivonen, 1999).

Munkánkban magyarországi, braziliai valamint ausztráliai *C. raciborskii* izolátumok cilindrospermopszin termelését vizsgáltuk meg illetve hasonlítottuk össze a cilindrospermopszint termelő *Aphanizomenon ovalisporum* cianotoxintartalmával.

## Anyag és módszer

Munkánk során a Kineret tóból (izrael) származó cilindrospermopszint termelő *Aphanizomenon ovalisporum*-ot, Ausztráliából származó két *C. raciborskii*, valamint az általunk izolált három magyarországi és egy braziliai *C. raciborskii* izolátum cilindrospermopszin tartalmát vizsgáltuk meg.

**HPLC:** A HPLC-s analíziseket, diódasoros UV-VIS detektorral ellátott Shimadzu LC-10AD vp-n folytattuk A HPLC-oszlop Supelco Supercosil<sup>™</sup> SPLC-18 (25 x 10 mm, 5 µm), az eluens MeOH/H<sub>2</sub>O.

**NMR:** Az <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C NMR-vizsgálatokat Bruker DRX-500 készülékkel 500.13/125.79 MHz-engeztük a DE, TTK NMR laboratóriumában. 1D <sup>1</sup>H-NMR spectrum felvétele deuterált vízben (D<sub>2</sub>O), 298K hőmérsékleten történt Shigemi kuvettában (250 µl). A kétdimenziós HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) spektrum identikus <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C eredményt adott.

**MALDI TOF:** MALDI-TOF MS analízist pozitív-ion módban a Bruker Biflex MALDI-TOF tömegspektrométerrel folytattuk. A minta deszorpció/ionizációja 337 nm-en nitrogén lézerrel történt. A műszer kalibrálását malto-oligosaccharid [M+Na]<sup>+</sup> csúcsaival végeztük (m/z: 527.15, 689.21, 851.26, 1013.31 and 1175.36). A spektrumot 2,5-dihidrobizenzo sav (DHB) matrixban vettük föl (0.5 µl matrix oldatot 0.5 µl mintával szobahőmérsékleten szárítottuk be). A DHB mátrix (10 mg) DHB-t tartalmazott (0.5 ml) etanol:víz (1:1/v:v) elegyében. A liofilezett analizálandó mintát vízben vettük fel, az identifikált mintánk báziscsúcsa az [M+H]<sup>+</sup> csúcs.

## Eredmények

Az *A. ovalisporum* metanolos kivonatát analizáltuk HPLC-DAD-al, majd a csúcsok spektrumainak elemzése után a 11 perc retenció idejű csúcsot összegyűjtöttük. Az anyag UV (λ<sub>max</sub>: 262) spektruma és MALDI TOF spektruma (m:416.5) alapján azonosítottuk, és az NMR spektrum segítségével meghatároztuk az ismeretlen anyag szerkezeti képletét. Az NMR adatok azonosak voltak Ohtani és munkatársai (Ohtani, 1992) által közölt adatokkal. Az általunk HPLC-DAD-al megtisztított és modern szerkezetazonosító műszerekkel meghatározott anyag, a N-tartalmú uracilszármazék, a cilindrospermopszin volt (1. ábra).

A feltárt sejtek metanolos kivonatát HPLC-vel analizáltuk, és cilindrospermopszin standarddal készített kalibrációs görbe segítségével meghatároztuk a cilindrospermopszin tartalmukat (1. táblázat).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a legnagyobb cilindrospermopszin tartalmat az *A. ovalisporumból* sikerült kimutatnunk (4

mg/g), illetve jelentős cilindrospermopszin tartalmat mértünk az Ausztráliából származó AQS izolátum esetében (2 mg/g). Az általunk vizsgált többi *C. raciborskii* izolátumokban cilindrospermopszint analizálható mennyiségben nem tudtunk kimutatni.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a legnagyobb cilindrospermopszin tartalmat az *A. ovalisporumból* sikerült kimutatnunk (4 mg/g), illetve jelentős cilindrospermopszin tartalmat mértünk az Ausztráliából származó AQS izolátum esetében (2 mg/g). Az általunk vizsgált többi *C. raciborskii* izolátumokban cilindrospermopszint analizálható mennyiségben nem tudtunk kimutatni.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a legnagyobb cilindrospermopszin tartalmat az *A. ovalisporumból* sikerült kimutatnunk (4 mg/g), illetve jelentős cilindrospermopszin tartalmat mértünk az Ausztráliából származó AQS izolátum esetében (2 mg/g). Az általunk vizsgált többi *C. raciborskii* izolátumokban cilindrospermopszint analizálható mennyiségben nem tudtunk kimutatni.

I. táblázat: A *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumok cilindrospermopszin tartalma

Izolátum	Törzs származási helye	Cilindrospermopszin tartalom
BGSD 423 <i>A. ovalisporum</i>	Kineret tó (Izrael)	4 mg/g
BGSD 266 <i>C. raciborskii</i>	Balaton (1995)	Nem detektálható
BGSD 2000 <i>C. raciborskii</i>	Balaton (2000)	Nem detektálható
BGSD 280 <i>C. raciborskii</i>	Szelidi tó	Nem detektálható
BGSD323 <i>C. raciborskii</i>	Nova Avanhandava (Brazília)	Nem detektálható
AQS <i>C. raciborskii</i>	Ausztrália	2,5 mg/g
LT <i>C. raciborskii</i>	Ausztrália	Nem detektálható

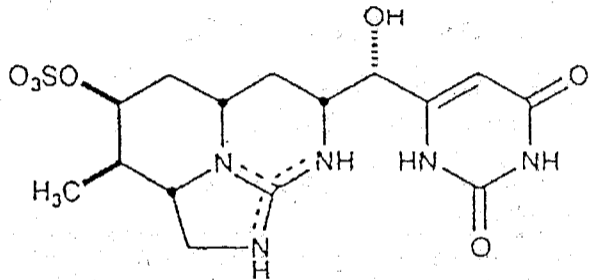
Magyarországi izolátumaink BGSD-280 (Szelidi tó), BGSD-266 (Balaton), BGSD-2000 (Balaton) cilindrospermopszin analízise kiemelt jelentőséggel bír hiszen hazai cianobakteriális tömegtermelési toxinanalízisei gyakran ellentmondásos eredményeket adnak. A vizsgált magyarországi izolátumok esetében elmondható, hogy a tudományos irodalom által leírt és ismert cilindrospermopszint nem tartalmazható mennyiségben.

## Köszönetnyilvánítás:

A kutatómunka feltételeinek megteremtéséért köszönjük az OTKA T22988 és T9235 számú pályázatok támogatását.

## Irodalom

- Carmichael, W.W. (1994) The toxins of Cyanobacteria. Scientific American. January 64-72.
- Ohtani, I., Moore, R.E. and Runnegar, M.T.C. (1992) Cylindrospermopsis: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J. Am. Chem. Soc. 114, 7941-7942.
- Padisák, J. (1997) Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. Arch. Hydrobiol./Suppl. 107, 563-593.
- Reynolds, C.S. and Walsby, A.E. (1975) Water-blooms. Biol. Rev. 50, 437-481.
- Sivonen, K. and Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxins, In Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management, (Chorus, I. and Bartram, J. Eds.), pp 41-111, E & FN Spon, London and New York.



1. ábra. A cylindrospermopszin szerkezeti képlete

**Abstract:** Recently, *Cylindrospermopsis raciborskii* is reported as a toxic bloom-forming species in various countries. The health effects of acute and chronic exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells or extracts are poorly understood. Isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (BGSD 280, -266, 2000, -323) LT, AQS were collected and isolated from water blooms on Lake Szelidi, Lake Balaton, Hungary and Nova Avanhandava, Brazil, and Australia and deposited into our Blue-Green Collection in Debrecen. These isolates were studied throughout the experiments. Cylindrospermopsin was purified from cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon ovalisporum* (Lake Kineret) by HPLC-DAD, and identified by MALDI TOF and NMR. With the help of cylindrospermopsin standard and calibration curve, we determined the cylindrospermopsin concentration in the *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. 2,5 mg CYN were detected in *C. raciborskii* BGSD-AQS. There was no detectable cylindrospermopsin concentration in *C. raciborskii* BGSD 280, -266, 2000, -323 LT isolates.