

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) és a *Microcystis aeruginosa* Kützig (Cyanobacteria) alगतaxonok interakciós kapcsolatai

Interactions between *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa* Kützig (Cyanobacteria)

Bácsiné Béres Viktória

Témavezetők:

Dr. Borbély György, Dr. Grigorszky István



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2012.

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

1.1. Bevezetés

Különböző planktonikus algafajok adott víztérben való együttélését számos abiotikus (fényviszonyok, tápanyag-ellátottság, turbulencia, hőmérséklet, stb.) és biotikus (különböző interakciós kapcsolatok: predáció, allelopátia, stb.) tényező befolyásolhatja (Cloern 1976, 1978). Adott víztérben szezonálisan és napszakosan is változik az ott élő algák fajsza, és az ott lévő fajok egyedsza (Sommer 1994). Egy-egy faj jelenléte vagy hiánya számos információt hordoz az adott víztérre vonatkozóan. A több éves periódust felölelő vizsgálatok bizonyítják, hogy míg egyes években bizonyos fajok nem, vagy csak kis egyedszámmal képviseltetik magukat, addig más években tömegesen megjelenhetnek az adott víztérben (Cloern 1976). Történik mindez úgy, hogy a víztér abiotikus tényezői számottevően nem különböznek az előző években mért értékektől. Ilyen esetekben mindig tüzetesen meg kell vizsgálni az esetleges biotikus tényezőket is, mint például a toxicitás, predáció, allelopátia, konkurencia (Sukenik et al. 2002, Hedger et al. 2004).

A planktonikus algafajok közötti interakciós kapcsolatok feltárásának több lehetséges módja van: (i) axenikus tenyészetek együttélésének tesztelése; (ii) axenikus tenyészet más axenikus tenyészet sejtkivonatával és/vagy exudátumával történő kezelése; (iii) axenikus nem toxikus, vagy toxikus tenyészet más toxikus faj tisztított toxinjával történő kezelése (Sommer 1994). Az így kapott eredmények segítenek eldönteni, hogy allelopátiáról, konkurenciáról, vagy toxicitásról van-e szó a vizsgált populációk között.

Az együtt nevelt tenyészetekkel végzett kísérletek egyik nagy előnye, hogy lehetővé teszi a különböző környezeti faktorokért (tápanyagforrásért, fényért) való versengés során létrejövő interakciós kapcsolatok feltárását két, vagy több, de meghatározott számú faj egyedei között (Chu et al. 2007). A toxikus cianobaktériumok interakciós kapcsolatai mindig is az érdeklődés középpontjában álltak. Kevert tenyészetekkel végzett kísérletek során megfigyelték, hogy egyes *M. aeruginosa* tenyészetek esetében kompetíciós előnyt jelentenek az általuk termelt extracelluláris vegyületek (Lam és Silvester 1979), a tápanyag-dús környezet (Takeya et al. 2004), a magasabb hőmérséklet (Chu et al. 2007) valamint a megfelelő mennyiségben inokulált sejtek száma (Béres et al. 2007, 2012).

Az elmúlt években megnőtt az érdeklődés a terepi körülményeket imitáló kísérletek iránt, s egyre nőtt azon tanulmányok száma, melyekben tisztított toxin helyett, ill. mellett teljes sejtkivonatokat (crude extract), valamint exudátumot is használtak az interakciós kapcsolatok feltárására. A „teljes sejtkivonattal” végzett kísérletek egyik nagy előnye, hogy a természetben végbemenő folyamatok (pl. egy cianobakteriális vízvirágzás végstádiumát jellemző tömeges sejtpusztulás) „élet-szerű” leképezését teszik lehetővé azáltal, hogy a toxikus sejteket tartalmazó mintákat feltárás után, mindenféle tisztítás nélkül adják a vizsgálni kívánt tenyészetekhez. Az eddigi tanulmányok vizsgálati „alanyai” elsősorban hajtásos növények (*Triticum aestivum*, *Allium cepa* - Sanevas et al. 2006, Pflugmacher et al. 2007), zooplanktonot alkotó fajok (*Cladocera* sp. - Okumura et al. 2007), valamint különböző béka és halfajok (Oberemm et al. 1999) voltak. A cianobakteriális „teljes sejtkivonatok” eukarióta algákra, ill. prokarióta fotoszintetizáló nem-toxikus cianobaktériumokra kifejtett hatásairól még kevesebb adat áll rendelkezésre (Pietsch et al. 2001, Valdor és Aboal 2007, Vassalakaki és Pflugmacher 2008), s ezek is elsősorban a sejtkivonatokat által okozott fiziológiai hatásokat, nem pedig a hosszabb távú, populáció szintű változásokat mutatják be.

Egy-egy vegyület, vegyületcsoport sejtekre, szövetekre, szervezetre gyakorolt tényleges hatását azonban akkor lehet igazán megvizsgálni, ha a kezelésekhöz tisztított vegyületet/vegyületeket alkalmazunk. Éppen ezért használnak a cianotoxinok hatásmechanizmusának, toxikusságának vizsgálatához tisztított toxinokat (Singh et al. 2001).

Mivel a cianotoxinok jelentős része nemcsak a vízi ökoszisztémát veszélyezteti, hanem az ivóvízbe (Zilberg 1966, Lippy és Erb 1976, Byth 1980, Teixeira et al. 1993, Jochimsen et al. 1998), itató vizekbe (Francis 1978, Negri et al. 1995) táp-adalékokba (Negri és Jones 1995, Prepas et al. 1997) bekerülve az emberre és a tenyészállatokra is komoly veszélyt jelent, számos tanulmány/kutatócsoport foglalkozik vizsgálatukkal.

Mind a cianobaktérium, mind pedig a Cryptophyta fajok kisebb-nagyobb egyedszámban állandó tagjai felszíni vizeinknek; jelenlegi ismereteink szerint mindkét taxon nagy egyedszámban való együttes jelenlétére eddig még nincs adat. Ennek okai lehetnek, az abiotikus tényezőkön (hőmérséklet, turbulencia, fény) túlmenően a cianobaktériumok által termelt allelopatikus vegyületek is.

1.2. Célkitűzések

Vizsgálataink során a *Cryptomonas ovata* (nem toxikus, eukarióta *Cryptophyta*) és a *Microcystis aeruginosa* (toxikus, prokarióta, *Cyanobacterium*) fajok közti interakciós kapcsolatainak megismeréséhez három különböző, egymást kiegészítő módszert alkalmaztunk:

I. a két faj együtt nevelése kevert tenyészetekben

II. sejtkivonattal történő kezelés;

III. tiszta toxinnal történő kezelés

Munkánk során a következő konkrét kérdésekre kerestük a választ:

I. Kevert tenyészetek:

1. Befolyásolják-e, és ha igen, milyen mértékben a *C. ovata* sejtek életben maradását, szaporodását, végső soron a populáció fennmaradását a különböző sejtszám-arányban inokulált *M. aeruginosa* sejtek?
2. Hogyan befolyásolják az *M. aeruginosa* sejtszám-növekedését az eltérő sejtszám-arány-beállítási körülmények?

II. Sejtkivonattal kezelt tenyészetek:

1. Milyen mértékben toxikusak, amennyiben toxikusak a kevert tenyészetek inokulálási körülményeinek megfelelő *M. aeruginosa* sejtkivonatok a *C. ovata* tenyészetek populációira?
2. Van-e antibakteriális, vagy növekedés-serkentő hatása a kevert tenyészetek inokulálási körülményeinek megfelelő *C. ovata* sejtkivonatoknak a *M. aeruginosa* tenyészetekre?
3. Kimutatható-e autotoxicitás, vagy növekedés serkentés a *Microcystis* tenyészetek esetében az eltérő inokulálási körülményeknek megfelelő mennyiségű *M. aeruginosa* sejtkivonatokkal történő kezelés hatására?

III. Mikrocisztin-LR (MC-LR) tisztított toxinnal kezelt tenyészetek:

1. Milyen mértékben toxikus hosszú távon (14 napos expozíció) a MC-LR a *M. aeruginosa* sejtkivonatokkal egyenértékű koncentrációkban a *C. ovata* tenyészetekre?
2. Milyen mértékben toxikus a MC-LR magasabb koncentrációban, akut toxikológiai tesztben (72 órás expozíció) a *C. ovata* tenyészetekre?

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A kísérletek során használt *Cryptomonas ovata* és *Microcystis aeruginosa* törzsek, nevelési körülmények

Kísérleteink során *C. ovata* (CCAP 979/61, Egyesült Királyság) és *M. aeruginosa* (BGSD 243, Magyarország) törzseket vizsgáltuk. A kísérleteinkhez használt tápoldatot, fényintenzitást, hőmérsékletet az előkísérleteink tapasztalatai alapján választottuk ki (a dolgozatban nem bemutatott eredmények). A kísérletek buborékoltatott tenyészetekkel végeztük (SERA Air 275R akváriumi levegőpumpa; 275 L h⁻¹), a tenyészeteket 400 mL végtérfogatban 500 mL-es Erlenmeyer-lombikokban, Jaworski médiumban (<http://www.ccap.ac.uk/media/documents/JM.pdf>), állandó fényintenzitáson (20 μmol m⁻² sec⁻¹), 22-23°C-on tartottuk fent. A vizsgálatok időtartama 14 nap volt (kivéve a toxicitási tesztet, ld. később). A tenyészetekből naponta 1 × 10⁶ μL mintát vettünk, a tenyészetek sejtszám-változásának nyomon követésére. A sejtszámot Zeiss Jenaval mikroszkóp segítségével határoztuk meg 400-szoros nagyításon. A növekedési rátát a következő egyenlet segítségével határoztuk meg:

$$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

ahol k a tenyészet növekedési rátája, N_1 a tenyészet sejtszáma t_1 időpontban, az N_2 a tenyészet sejtszáma t_2 időpontban, t_1 az inokulálás napja, t_2 az inkubációs idő egy adott napja.

2.2. Kevert tenyészetek (*C. ovata* és *M. aeruginosa* sejtek együtt nevelése)

2.2.1. Egységnyi sejtszámú *C. ovata* együtt nevelése változó sejtszámú *M. aeruginosa*-val

A *C. ovata* inokulálási sejtszáma 0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ volt a kontroll és a kevert tenyészetekben. A *M. aeruginosa* sejtek száma a kevert tenyészetekben a kísérletek indításakor: 0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (1:1 arányú tenyészet); 0,2 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (1:2 arányú tenyészet); 0,4 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (1:4 arányú tenyészet); 2,5 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (1:25 arányú tenyészet); 5 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (1:50 arányú tenyészet). A kísérletek során alkalmazott *M. aeruginosa* kontroll tenyészetekben a sejtszámot a kevert tenyészetek *M. aeruginosa* sejtszámának megfelelően állítottuk be. A 0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ sejtszámú *M. aeruginosa* esetében árnyékolt kontroll tenyészetet is alkalmaztunk. Az árnyékolt kontroll tenyészetet alufólia segítségével árnyékoltuk le az inkubálási idő első hetében.

2.2.2. Egységnyi sejtszámú *M. aeruginosa* együttnevelése változó sejtszámú *C. ovata*-val

A *M. aeruginosa* inokulálási sejtszáma 0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ volt a kontroll, az árnyékolt kontroll és a kevert-tenyészetekben. A *C. ovata* sejtek száma a kevert tenyészetekben a kísérletek indításakor: 0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (1:1 arányú tenyészet); 0,2 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (2:1 arányú tenyészet); 0,4 × 10⁶ sejt mL⁻¹ (4:1 arányú tenyészet). A kísérletek során alkalmazott *C. ovata* kontroll tenyészetekben a sejtszámot a kevert tenyészetek *C. ovata* sejtszámának megfelelően állítottuk be.

Az 1:25 és 1:50 aránynak megfelelő tenyészetek beállításától el kellett tekintenünk, mivel a *C. ovata* tenyészet lehetséges maximális sejtszáma nem haladta meg sokkal a 10⁶ sejt mL⁻¹ egyedszámot (ami messze elmarad az 1:25 arányú tenyészet indításához szükséges 2,5 ×

10^6 , valamint az 1:50 arányú tenyészet indításához szükséges 5×10^6 sejt mL^{-1} egyedszámtól).

2.3. Sejtkivonattal kezelt tenyészetek

2.3.1. *C. ovata* tenyészetek kezelése *M. aeruginosa* kivonattal

A *C. ovata* inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt a kontroll és a kivonattal kezelt tenyészetekben. A *C. ovata* kezelt tenyészetekhez a *M. aeruginosa* sejtkivonatából a 2.2.1. fejezetben bemutatott kevert tenyészetek *M. aeruginosa* sejtszámának megfelelő mennyiséget adtunk ($0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és 5×10^6 sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* kivonátát).

2.3.2. A *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* kivonattal

Kísérleteink során *C. ovata* kivonattal kétféle kezelést alkalmaztunk a *M. aeruginosa* tenyészeteken.

A 2.2.1. fejezetben leírt arányoknak megfelelően $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* kivonattal kezeltük a $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} , $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészeteket. Minden esetben vizsgáltuk a kivonattal kezelt *M. aeruginosa* inokulált sejtszámával egyező sejtszámú kontroll tenyészetet is. A $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és 5×10^6 sejt mL^{-1} inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészeteket azért nem vizsgáltuk, mert a kevert tenyészetekben a *C. ovata* sejtszáma kimutatási határ alá (100 sejt mL^{-1}) csökkent az 1. napra, valamint a kevert és kontroll *M. aeruginosa* tenyészetek növekedése között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

A 2.2.2. fejezetben leírt arányoknak megfelelően a *M. aeruginosa* inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt a kontroll, az árnyékolt kontroll és a kivonattal kezelt tenyészetekben. A *M. aeruginosa* kezelt tenyészetekhez a *C. ovata* sejtkivonatából a 2.2.2. fejezetben bemutatott kevert tenyészetek *C. ovata* sejtszámának megfelelő mennyiséget adtunk ($0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* kivonátát).

2.3.3. *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *M. aeruginosa* kivonattal

A *M. aeruginosa* inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt a kontroll, az árnyékolt kontroll és a kivonattal kezelt tenyészetekben. A *M. aeruginosa* kezelt tenyészetekhez a *M. aeruginosa* sejtkivonatából a 2.2.1. fejezetben bemutatott kevert tenyészetek *M. aeruginosa* sejtszámának megfelelő mennyiséget adtunk ($0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} ; $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* sejt kivonátát).

2.4. A *M. aeruginosa* tisztított toxinjával kezelt tenyészetek

2.4.1. A *C. ovata* tenyészetek kezelése MC-LR-rel

A *C. ovata* sejtszáma minden tenyészetben megközelítőleg $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt. A tisztított toxinnal kezelt tenyészetek vizsgálata során a használt toxinmennyiségek megfeleltek a *M. aeruginosa* sejtkivonattal kezelt tenyészetek esetén használt kivonatok toxintartalmának ($0,0213 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,0425 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,0851 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,532 \mu\text{g mL}^{-1}$ és $1,063 \mu\text{g mL}^{-1}$). A sejtkivonatok toxintartalmát a 2.5.3. fejezetben bemutatott toxinmérések eredményei alapján számoltuk ki.

2.4.2. Toxikológiai teszt

A kísérleteket Jaworski médiumban nevelt *C. ovata* tenyészeteken háromszoros ismétlésben Titer-Tech® lemezen (4 mL végtérfogat), állandó fényintenzitáson ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) végeztük el. A *C. ovata* tenyészetek sejtszáma megközelítőleg $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt. A kísérletek időtartalma 72 óra volt (MSZ EN 28692:1998; ISO 8692:1989). A *C. ovata* tenyészeteket 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 és $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ toxinnal kezeltük. A *C. ovata* tenyészetek sejtszámában bekövetkező változást 72 óra eltelte után határoztuk meg; $10\text{-}10 \mu\text{L}$ mintát vettünk tenyészetenként, amit Jenaval fénymikroszkóppal 400-szoros nagyításon vizsgáltunk.

2.5. A sejtkivonatok elkészítése, a MC-LR tisztítása és mérése

2.5.1. A *M. aeruginosa* kivonat elkészítése

A *M. aeruginosa* sejtkivonat elkészítéséhez 300 mL *M. aeruginosa* tenyészetet centrifugáltunk össze (Beckman Avanti J-25 8500 rpm, 20 perc). A tenyészet sejtszáma a centrifugálás előtt 16×10^6 sejt mL^{-1} volt, az összegyűlt sejteket felhasználásig $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A sejtek feltárása háromszori fagyasztással-olvasztással történt (fagyasztás fagyasztószekrényben -20°C -on történt, időtartalma 24 óra volt; a felolvasztást szobahőmérsékleten teljes kiolvadásig végeztük), a kiolvasztott sejttömeget újbóli fagyasztás előtt minden esetben 2 percig szonikáltuk.

2.5.2. A *C. ovata* kivonat elkészítése

A *C. ovata* sejtkivonatának elkészítéséhez 800 ml *C. ovata* tenyészetet centrifugáltunk össze (Beckman Avanti J-25 8500 rpm, 20 perc). A tenyészet sejtszáma a centrifugálás előtt $1,1241 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt, az összegyűlt sejteket felhasználásig $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A sejtek feltárása háromszori fagyasztással-olvasztással (min. 24 óra fagyasztás -20°C -on, felolvasztás szobahőmérsékleten teljes kiolvadásig) történt, a kiolvasztott sejttömeget újbóli fagyasztás előtt minden esetben 2 percig szonikáltuk.

2.5.3. A MC-LR tisztítása és a tenyészetek toxintartalmának mérése

A MC-LR tisztítása kromatográfiás módszerrel történt (Harada et al. 1988, módosítva Vasas et al. 2006). A tápfolyadék toxintartalmát micelláris elektrokinetikus kromatográfiával (MEKC) határoztuk meg a Vasas és munkatársai (2006) által megadott paraméterek alkalmazásával. Ugyanezen módszert alkalmaztuk a *M. aeruginosa* sejtek toxintartalmának meghatározására. A mérési eredmények alapján az általunk alkalmazott körülmények között a *M. aeruginosa* sejtek mikrocisztin-tartalma $2,1266 \times 10^{-4}$ ng sejt⁻¹; ebből 50,6% MC-LR, 39% MC-YR, 10% MC-YA és 0,4% MC-RR.

Az általunk alkalmazott nevelési körülmények között, ahol sem magas hőmérséklet ($\geq 40^\circ\text{C}$), sem extrém magas (9), vagy extrém alacsony (1) pH, sem erős UV sugárzás nem állt fent, ill. az alkalmazott tenyészetek heterotróf baktériumoktól mentesek voltak (Chorus és Bartram 1999), a mikrocisztinek bomlásával nem kellett számolnunk.

2.6. A nitrát-meghatározás menete

A nitrát-meghatározás a tenyészetek 400 μL sejtmentes felülúszójából történt. A mintákat feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A nitrát tartalom meghatározása Felföldy (1987) által közölt módszer alapján történt, a méréshez felhasznált oldattérfogatok csökkentésével. A tenyészetek nitrát-felvételét a tápoldatban mérhető nitrát-tartalom alapján számítottuk, a tápoldat eredeti nitrát-tartalmát tekintve 100%-nak.

2.7. Statisztikai elemzés

A kontroll és kezelt tenyészetek növekedési görbéi közötti különbségeket egyutas ANCOVA módszerrel elemeztük (Zar 1996, Hammer et al. 2001). A növekedési ráták statisztikai értékelése egyutas ANOVA módszerrel történt. A statisztikai elemzésekhez a Past programot használtuk (Hammer et al. 2001).

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

3.1. Kevert tenyészetek

3.1.1. Egységnyi sejtszámú *C. ovata* együtt nevelése különböző sejtszámú *M. aeruginosa*-val

A *C. ovata* sejtek száma, valamint ezzel együtt növekedési rátája csökkent a kevert tenyészetekben, különbség abban mutatkozott, hogy mikorra csökkent a *C. ovata* sejtszám 100 sejt mL^{-1} (az alkalmazott sejtszámolási módszer kimutatási határa) alá, és ez összefüggésben áll a *M. aeruginosa* abundanciájával.

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészetben a *Microcystis* sejtek pusztulását, a populáció összeomlását feltehetően az árnyékolás hiánya okozta. Ezt a feltevést, az is alátámasztja, hogy a $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámú árnyékolt *M. aeruginosa* kontroll tenyészetekben a sejtek életben maradtak. Mint ahogy az ismert, a különböző *Microcystis aeruginosa* laboratóriumi törzsek fényigénye szinte törzsenként változó. Míg egyes törzsek esetében már a $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fényintenzitás is igen magasnak számít (Phelan és Downing

2011), addig vannak olyan törzsek, melyeket $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, vagy akár $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson is életben lehetett tartani, ill. ez volt az optimális a *Microcystis* sejtek számára (Yamaguchi et al. 2000, Boumnic et al. 2001, Visser et al. 2003). Általánosságban talán mégis elmondható, hogy a *M. aeruginosa* tenyészeteket $15\text{-}80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett nevelik (Yamaguchi et al. 2000, Visser et al. 2003, Yang és Jin 2008, Renaud et al. 2011, Yang et al. 2012). Természetesen azt, hogy milyen fényintenzitás számít optimálisnak, tapasztalataink szerint nagymértékben befolyásolja az inokulált sejtszám mennyisége is. A vizsgálataink, ill. a törzsnevelés során egyértelműen kiderült, hogy a kis sejtszámmal ($0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1}) inokulált sejtek még a $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitást sem képesek elviselni.

A kevert tenyészetekben az *M. aeruginosa* sejtszámában megfigyelhető változások szoros összefüggésben állnak a tenyészet *C. ovata* tartalmával. Az 1:2 és 1:4 arányú tenyészetek esetén a *M. aeruginosa* növekedési rátája alacsonyabb volt, mint a megfelelő kontroll tenyészeteké, viszont az 1:25 és 1:50 arányú tenyészetekben a *M. aeruginosa* sejtszám már nem tért el szignifikánsan a megfelelő *M. aeruginosa* kontroll tenyészetek sejtszámától. Ez arra enged következtetni, hogy a *C. ovata* sejtek ezen közepes arányok (1:2 és 1:4) esetén kölcsönös negatív hatással vannak a *M. aeruginosa* sejtek növekedésére. Nem teljesen világos, hogy mi áll e hatás hátterében. Az azonban ismert, hogy a Cryptophyták termelnek olyan extracelluláris vegyületeket (Kellam és Walker 1989), főleg poliszacharidokat, melyek eddigi ismeretek szerint heterotróf baktériumokra vannak negatív hatással. További magyarázat lehet még a két faj tápanyag-felvételi sajátosságában megnyilvánuló különbség is: míg a *C. ovata* sejtek a tenyésztési idő legelején akár 25%-kal is hatékonyabban veszik fel a tápoldatban található nitrátot, addig a *Microcystis* sejtek azonos sejtszám-összeállítás mellett a tenyésztési idő 2. felében kezdik el ezen tápanyag nagyfokú felvételét. Ennek oka feltehetően az is lehet, hogy míg a *M. aeruginosa* jól tolerálja a tápanyag-szegény környezetet, valamint gazdag tápanyag-raktárakkal (cianoficin, fikocianin mint nitrogén-raktár, polifoszfát-testek mint foszfor-raktár) rendelkezik (Kromkamp 1987, Kolodny et al. 2006), és alacsony növekedési ráta jellemző rá, addig a *Cryptomonas* sejtekre többek között gyors, hatékony tápanyag-felvétel és viszonylag magas növekedési ráta jellemző (Padisák 2003). Vagyis az 1:2 és 1:4 sejtszám-beállítás mellett a *M. aeruginosa* sejtek kontrolltól eltérő növekedését okozhatta a *C. ovata* sejtek gyorsabb tápanyag-felvétele is.

Lam és Silvester (1979) megfigyelték, hogy *M. aeruginosa* és *Chlorella* sp. kevert tenyészetében a *Microcystis* sejtek gátolták a *Chlorella* sejtek növekedését (94%-al a kontroll tenyészetéhez képest). Magas *Microcystis/Cryptomonas* arány esetén ehhez hasonló gátlás figyelhető meg. A kapilláris elektroforézis eredményei azt mutatták, hogy az extracelluláris mikrocisztin mennyisége a kimutatási határ alatt volt mind a kontroll *M. aeruginosa*, mind a kevert tenyészetekben. A mikrocisztinek, szemben más cianotoxinokkal, többnyire csak igen kis mennyiségben választódnak ki a környezetbe (általában 0,8-10%-a a teljes toxintartalomnak - Sivonen és Jones 1999, Ha et al. 2009, Zhang et al. 2010), nagyobb mennyiségben csupán a sejtek lízise után kerülnek ki a szabadba. Az irodalmi adatok alapján az is igen kérdésesnek tűnik, mennyire beszélhetünk aktív kiválasztásról (Shi et al. 1995, Rohrlack és Hyenstrand 2007)

Kérdés tehát, hogy az élő *M. aeruginosa* sejtek miért gátolják a *C. ovata* szaporodását, és a *C. ovata* sejtek miért tűnnek el a tenyészetből *M. aeruginosa* jelenlétében. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az 1:1, mind pedig a 1:2 arányú kevert tenyészetekben a *C. ovata* növekedési rátája az első két napban magasabb, mint a cianobaktérium törzse, és ez igaz a tápanyag-felvételi rátájukra is. Mindezek ellenére, a *M. aeruginosa* már ezen inokulálási körülmények között is túl tudja nőni a *Cryptomonas* sejteket. Ennek két lehetséges magyarázata van: egyrészt lehetséges, hogy a cianobaktérium sejtek olyan allelokemikáliát

termelnek és bocsátanak ki, amelyet a kísérleteink során nem vizsgáltunk, ill. amelyekre a folyamatosan pusztuló *Microcystis* sejtekből felszabaduló igen kis mennyiségű toxinok esetleg szinergista hatást gyakorolnak. Továbbá okozhatja az is, hogy a *C. ovata* sejtek, életstratégiájuknak megfelelően, az első napokban gyorsan felveszik a rendelkezésre álló tápanyagokat, és talán pontosan ez vezetett ahhoz, hogy a tenyésztési idő végére ezen sejtek „eltűnjenek” a tenyészetből: az alacsonyabb tápanyag-koncentrációt jobban toleráló *Microcystis* sejtek túl tudták nőni az arra érzékenyebb Cryptophyta sejteket (Padisák 2003).

3.1.2. Egységnyi sejtszámú *M. aeruginosa* együtt nevelése különböző sejtszámú *C. ovata* -val

A kevert tenyészetek *C. ovata* sejtszámának változása nagymértékben függött az inokulált *C. ovata* sejtek számától. Abban az esetben, mikor a kevert tenyészetben az inokulált *C. ovata* sejtek száma megegyezett az *M. aeruginosa* sejtek számával, a *C. ovata* sejtszáma jelentős mértékben lecsökkent a 14. napra, a *M. aeruginosa* sejtszáma viszont megsokszorozódott a kiindulási értékhez képest. A 2:1 és 4:1 arányú kevert tenyészetekben, ahol a *Cryptomonas* sejtek száma az inokulálás napján 2-, ill. 4-szerese volt a *Microcystis* sejtek számának, a tenyészetek *C. ovata* sejtszáma minden esetben szignifikánsan magasabb volt a kontroll tenyészetétől. Ezzel szemben ezen tenyészetekben a *Microcystis* populáció növekedése jelentős mértékben alatta maradt az árnyékolt kontroll tenyészetben tapasztaltaknak.

A kevert tenyészetekben a *C. ovata* populáció kontroll tenyészetéhez viszonyított intenzívebb növekedésének okai feltehetően abban is keresendők, hogy a *Microcystis* sejtek lízisével esetlegesen többlet-tápanyagok, hormon-hatású vegyületek kerültek a tápközegbe (Sergeeva et al. 2002, Stirk et al. 2002, Tsavkelova et al. 2008, Hussain et al. 2010).

A *Microcystis* sejtek számának csökkenése, valamint a populáció növekedés-gátlása egyrészt (i) a *C. ovata* sejtek intenzívebb nitrát-felvételével, valamint (ii) a *Cryptomonas* sejtek által termelt esetleges antibakteriális vegyületekkel lehet szoros összefüggésben.

Eredményeink jól összevethetők a Takeya és munkatársai (2004) *Chlorella* és *Microcystis* együttnevelésével kapcsolatos megfigyeléseivel: Eredményeik azt sugallják, hogy kis tápanyag utánpótlás esetén a *Microcystis* sejtek növekedési üteme a gyorsabb, hisz ezek az élőlények a tápanyagban szegényebb környezetet jobban elviselik, mint a *Chlorella* sejtek. Ezzel szemben tápanyagokkal jobban ellátott körülmények között a *Chlorella* sejtek nagyobb szaporodási rátájuknak és tápanyag-felvételi rátájuknak köszönhetően túlnővik a *Microcystis* sejteket. Vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy a *C. ovata* sejtek növekedési rátája az 1:1, 1:2, 2:1 és 4:1 arányú kevert tenyészetekben az első napokban magasabb, mint a *Microcystis* sejteké; továbbá az ezen tenyészetekhez tartozó kontroll tenyészetekben is a *Cryptophyta* sejtek tápanyag-felvételi rátája a magasabb.

Összességében a kevert tenyészetekben tapasztalt sejtszám-változások alapján elmondható, hogy létezik olyan *C. ovata*: *M. aeruginosa* arány, amely mind a két faj növekedését lehetővé teszi, azonban minél nagyobb a különbség a két faj inokulálási sejtszámában, annál kisebb az esélye annak, hogy az alacsonyabb sejtszámú inokulált faj életben marad a tenyészetben.

Vardi és munkatársai (2002) *P. gatunense* és *M. aeruginosa* együttnevelése során azt tapasztalták, hogy mind a *Peridinium* mind pedig a *Microcystis* sejtek életben maradása, ill. növekedése nagymértékben függött az iniciált sejtek számától. Kis, ill. közepes iniciált *Peridinium* sejtszám mellett a dinoflagellata sejtek elpusztultak, vagy növekedésük jelentősen gátolt volt. Ez az eredmény jól korrelál az általunk tapasztaltakkal, ahol a *Cryptomonas* sejtek életben maradása szorosan összefüggött az iniciált *C. ovata*, ill. *M. aeruginosa* sejtek

számával. Azonban a Vardi és munkatársai által végzett kísérletek arra is rávilágítottak, hogy a *M. aeruginosa* sejtek növekedése is jól korrelál a *P. gatunense* iniciált sejtek számával. Akár harmadára is csökkent a *Microcystis* sejtek száma a *Peridinium* sejtek számának növelésével. Az általunk tapasztalt eredmények is azt mutatták, hogy a cianobaktérium sejtek száma 30-80%-kal is alacsonyabb lehet az árnyékolt kontroll tenyészeténél az iniciált *Cryptomonas* sejtek számától függően.

3.2. Sejtkivonatokkal kezelt tenyészetek

3.2.1. Egységnyi sejtszámú *C. ovata* tenyészetek kezelése különböző mennyiségű *M. aeruginosa* kivonattal

Cianobaktérium sejtek teljes kivonatának alkalmazása jól modellezi azt a természetes jelenséget, amikor a cianobakteriális vízvirágzások összeomlásakor a sejtek lizálnak, és teljes intarcelluláris tartalmuk a vízbe kerül. A mikrocisztinek extracelluláris koncentrációja is ekkor a legmagasabb (Park et al. 1998).

Eredményeink azt mutatják, hogy a *M. aeruginosa* sejtkivonata szignifikánsan befolyásolja a *C. ovata* növekedését. Növekedést serkentő és gátló hatások egyaránt megfigyelhetők voltak a sejtkivonat mennyiségétől függően. Élő cianobaktérium sejtek exudátuma, vagy a cianobaktérium szűrt tápfolyadék gátolhatja bizonyos mikroalga fajok növekedését, poliszacharid termelését és szekretálását, GSH és ROS mennyiségét (Babica et al. 2006, Mohamed 2008, Oberhaus et al. 2008, Leao et al. 2009, El-Sheek et al. 2010). A *C. ovata* tenyészzel végzett kísérletek esetében csak a magas (1:50 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* sejtkivonat mennyiség esetén volt megfigyelhető ez a gátló hatás. Az 1:50 aránynak megfelelő mennyiségű sejtkivonat toxintartalma $1.0633 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR-rel egyenértékű, mégis a sejtkivonat ebben a magas koncentrációban erőteljesebb gátlást okozott, mint a megfelelő koncentrációjú tisztított MC-LR. Ennek oka többféle, egymással akár összefüggő jelenséggel is magyarázható: (i) a sejtkivonat más mikrocisztin variánst (MC-YR, MC-YA, MC-RR) is tartalmazott; (ii) – más *Microcystis* törzsekhez hasonlóan – más, eddig még nem izolált allelopatikus hatású vegyületek jelenléte is elképzelhető (Suikkanen et al. 2006, Palíková et al. 2007); ill. (iii) a mikrocisztinek egy része a sejtkivonatban fikobilinhez kötött, az alkalmazott MECK technikával nem kimutatható formában volt jelen (Jüttner és Lüthi 2008). A különböző mikrocisztin variánsok toxikussága célszervezetenként változó mértékben eltérő lehet (McElhiney et al. 2001); valamint szinergikus hatások is felléphetnek az egyes variánsok, ill. allelopatikus hatású vegyületek között (Mohamed 2008).

Az alacsonyabb sejtszámarányoknak megfelelő mennyiségű sejtkivonat növekedést serkentő hatása nem egyedülálló jelenség. 1998-ban Sedmak és Kosi $0,104\text{-}0,519 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-RR-rel kezelt *Cryptomonas erosa* (Cryptophyta), *Monoraphidium contortum* (Chlorophyta), *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta), nem-toxikus *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) taxonoknál figyelte meg a növekedés stimulálását. Bár esetükben, szemben a *C. ovata* tenyészetekben megfigyeltekkel, a stimulálás csak a tenyésztési idő első napjaiban érvényesült, a tenyésztés végére a vizsgált taxonoknál a növekedés gátlást szenvedett. Ou és munkatársai (2005) egy 17 napos kísérletben *Poteroiochromonas* sp. esetében figyeltek meg sejtszám-növekedést $0,1\text{-}4 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR és MC-RR kezelés hatására. Az is ismert, hogy egyes szabadon élő, ill. szimbióta cianobaktérium törzsek (*Calothrix* sp., *Phormidium animale*; *Nostoc* sp. *Anabaena* sp., *Anabaenopsis* sp., *Chlorogloeopsis* sp., *Cylindrospermum* sp., *Gloeothoece* sp., *Plectonema* sp., *Synechocystis* sp. *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Chroococcidiopsis* sp.) képesek fitohormon hatású vegyületeket (pl. auxinokat, cytokinineket, gibberellineket, abszizinsavat

és etilént - Manickavelu et al. 2006) kibocsátani, amelyek serkenthetik eukarióta algák növekedését (Sergeeva et al. 2002, Stirk et al. 2002, Tsavkelova et al. 2008, Hussain et al. 2010).

3.2.2. *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* kivonattal

3.2.2.1. Különböző inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése egységnyi mennyiségű *C. ovata* kivonattal

A *M. aeruginosa* tenyészetek inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$, és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt. A kezelésekhöz $0,1 \times 10^6$ sejtszámmal megfelelő mennyiségű *C. ovata* kivonatot használtunk. A $0,1 \times 10^6$ inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetekben a sejtszám az 5. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent. Feltételezéseink szerint, az árnyékolt kontroll tenyészetek eredményeit figyelembe véve, ennél a kísérletnél a *C. ovata* kivonat nem biztosított elegendő árnyékolást a *Microcystis* sejteknek, valamint anticianobakteriális hatások is feltételezhetők (lásd 3.2.3. fejezet). Ezzel szemben a $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek esetében a *C. ovata* kivonat már növelte azok sejtszámát, ill. növekedési rátáját (88% és 47%-kal) is.

Az általunk kapott eredmények jól összevethetők a Lam és Silvester (1979) által kapott eredményekkel, akik *Anabaena-Microcystis*, valamint *Chlorella-Microcystis* sejteket neveltek egymás „szűrletében”. Megfigyelték, hogy mind a *Chlorella*, mind pedig az *Anabaena* sejtek kivonata jelentős sejtszám-növekedést eredményezett a *Microcystis* tenyészetekben a kontroll tenyészetekhez képest.

3.2.2.2. Egységnyi inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése különböző mennyiségű *C. ovata* kivonattal

A *M. aeruginosa* tenyészetek inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt. A kezelésekhöz $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$, és $0,4 \times 10^6$ sejtszámmal megfelelő mennyiségű *C. ovata* kivonatot használtunk. A $0,1 \times 10^6$ inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetekben a sejtszám az 5. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent; a $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *Cryptomonas* sejt kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a *Microcystis* sejtek növekedési rátája, mint az árnyékolt kontroll tenyészeté, és sejtszámuk is 17-32%-kal alatta maradt az árnyékolt kontrollnak. Ezek az eredmények jól korrelálnak a hasonló beállítású kevert tenyészetek eredményeivel, és alátámasztani látszanak azt a feltevést, hogy a *C. ovata* sejtek valamilyen, eddig még nem detektált antibakteriális vegyületet termelhetnek, ami csökkenti a *Microcystis* sejtek szaporodását.

AnticIANobakteriális vegyületeket már mind mikroalga (perifiton – Wu et al. 2011), mind pedig makroalga fajokban leírtak (*Chara vulgaris* – Zhang et al. 2009, *Asparagopsis taxiformis* – El-Baroty et al. 2007, Manilal et al. 2010). Ezen élőlények esetén indol, 3-oxo-alfa-jonon (Wu et al. 2011), valamint (Z,Z)-9,12-oktadekadiénsav (ODEA, 18:2), tetradekánsav (TDA, 14:0) és hexadekánsav (HAD,16:0) (Zhang et al. 2009) termelését figyelték meg.

Kellam és Walker (1989) 27 eukarióta alga taxon, köztük a *Cryptomonas calceiformis* tengeri faj, antibakteriális hatását vizsgálták. Eredményeik alapján a *C. calceiformis* Gram-pozitív baktériumok, nevezetesen a *Bacillus subtilis* és a *Staphylococcus aureus* laboratóriumi törzsek növekedésére gyakorolt negatív hatást.

Annak bizonyítása, hogy a *M. aeruginosa* növekedésének gátlása esetünkben antibakteriális vegyületek termeléséhez köthető, további vizsgálatokat igényel.

3.2.3. Egységnyi sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése különböző mennyiségű *M. aeruginosa* kivonattal

Annak érdekében, hogy teljesen kizárhassuk az amúgy igen kis valószínűséggel előforduló autotoxicitás lehetőségét, valamint összevethessük a *C. ovata* kivonattal végzett kísérletek eredményeivel a *M. aeruginosa* kivonatának saját növekedésre gyakorolt hatását, feltétlenül szükségesnek tartottuk elvégezni ezeket a kísérleteket is.

A kezelt tenyészetekben a sejtek mennyisége a tenyésztési idő végére a kiindulási érték többszörösére emelkedett, szemben a kontroll tenyészetben lezajló változásokkal, ahol a tenyészet sejtszáma az 5. npra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent. A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} , $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} , $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámnak megfelelő mennyiségű sejtkivonattal kezelt tenyészetek növekedése szignifikánsan eltért az árnyékolt kontroll tenyészet növekedésétől is, annál magasabb sejtszámot értek el. A kapott eredményeket összevetve a *C. ovata* kivonattal végzett kísérletek eredményeivel elmondható, hogy míg az egyszeres sejtszámú *C. ovata* kivonat nem tudta megakadályozni az egységnyi sejtszámú *Microcystis* sejtek elpusztulását, addig az egyszeres sejtszámú *M. aeruginosa* kivonattal kezelt egységnyi sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetben a sejtek életben maradtak, és a kezelési idő végére túlnőtték az árnyékolt kontroll tenyészetet. Ebből arra lehet következtetni, hogy a *Microcystis* sejtkivonat az árnyékoló hatáson túlmenően egyéb, pozitív módon is hatással volt a populáció életben maradására. Ezt a feltevést támasztják alá Sedmak és Kosi (1998) kísérletei is, ami során kimutatták, hogy a mikrocisztineknek növekedésszabályozó (*M. aeruginosa* tenyészetre nézve növekedést fokozó) szerepe van. A *M. aeruginosa* sejtkivonat növekedésfokozó hatása a kétszeres és négyszeres sejtszámú kivonatokkal kezelt tenyészetek esetében pedig még kifejezettebb volt szemben a hasonló arányú *C. ovata* kivonatokkal, amelyek növekedésgátló hatása már ennél a koncentrációnál is érvényesült.

A $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és 5×10^6 sejt mL^{-1} sejtszámnak megfelelő mennyiségű *M. aeruginosa* sejtkivonattal kezelt tenyészetek növekedési rátája az első két napon alatta maradt az eddigiekben bemutatott kezelt tenyészetekének. Ennek feltehetően az az oka, hogy bár a sejtkivonattal bevitt tápanyagok mennyisége lehetővé tenné a sejtek gyorsabb szaporodását, azonban az ilyen nagy mennyiségű algakivonat árnyékoló hatása már megakadályozza a pozitív hatások kifejeződését. Az árnyékoló hatáson túl felmerülhetne a toxintartalom gátló hatásának valószínűsége, de az irodalmi adatok tükrében (Babica et al. 2007) ez az eshetőség elvethető.

3.3. A *M. aeruginosa* tisztított toxinjával kezelt tenyészetek

A természetben általában $0,001-0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban vannak jelen az oldott mikrocisztinek (mennyiségük természetesen variánstól, ill. populációtól függően változó) (Chorus 2005, Babica et al. 2007), azonban egy-egy masszív cianobaktérium vízvirágzás esetén extrém magas toxinkoncentrációk is előfordulhatnak ($19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Japán - Nagata et al. 1997, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, Németország - Fastner et al. 1999, $8,43-20 \mu\text{g mL}^{-1}$, Ausztrália - Kemp és John 2006, $18,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, Magyarország - Máthé et al. 2007). A vizsgálatok megtervezése során ezért törekedtünk arra, hogy minél szélesebb koncentráció-tartományban elvégezzük a kísérleteket, tekintettel arra is, hogy az adott sejtszámú *Microcystis* tenyészetnek mennyi az egységnyi toxintartalma. Ezért a kísérletek során alkalmazott toxinmennyiségek egyrészt

megfelelnek a különböző sejtszamarányú kevert tenyészetek (és ezáltal a *M. aeruginosa* sejtkivonatával kezelt *C. ovata* tenyészetek) toxintartalmának; valamint ezeknél az értékeknél jóval magasabb, de a természetben még releváns koncentrációkat is alkalmaztunk.

A különböző sejtszamarányú megfelelő toxinmennyiségek a nevelés első néhány napjában jelentős mértékben gátolták a kezelt tenyészetek növekedését (~50%-os gátlás a kontroll tenyészethez képest). A 4.-6. naptól kezdődően a tenyészetek azonban regenerálódtak, bár a tenyésztési idő végén sejtszámuk szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll tenyészeté. Ezek az eredmények jól korrelálnak más tanulmányok eredményeivel, melyekből arra lehet következtetni, hogy erősen faj, és környezet függő, melyik taxon hogyan reagál rövid és hosszú távon az adott mikrocisztin(ek) jelenlétére: Kearns és Hunter (2001) a *Chlamydomonas reinhardtii* MC-LR-rel kezelt tenyészetek esetén figyelték meg, hogy alacsony toxinkoncentrációk mellett a kezelt sejtek mozgásképessége nem különbözött a kontroll sejtektől a tenyésztési idő végére. Babica és munkatársai (2007) azt tapasztalták, hogy 0,001-0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mikrocisztin koncentráció nem okoz szignifikáns eltérést különböző zöldalgák növekedésében a tenyésztési idő végén. Ezt a mikrocisztin analóg nodularin esetében is megfigyelték (Suikkanen et al. 2006). Sedmak és Kosi (1998) a MC-RR heterogén hatásairól számoltak be. 0,104-0,519 $\mu\text{g mL}^{-1}$ toxinmennyiség és alacsony fényintenzitás mellett a *Monoraphidium contortum* és a *Scenedesmus quadricauda* sejtszáma emelkedett, míg a *Cryptomonas erosa* növekedése a tenyésztési idő végére a kezdeti növekedés stimulálást követően gátlást szenvedett. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az erős gátló hatás csak speciális megvilágítási körülmények között figyelhető meg. A toxikus hatásokat tehát erősen befolyásolhatja a mikrokozmosz: ugyanaz a koncentráció lehet toxikusabb a mikrokozmosztól és az adott alga érzékenységétől függően. Bartova és munkatársai (2011a) *Pseudokirchneriella subcapitata* tenyészeteket kezelték 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-RR és MC-LR toxinnal és azt tapasztalták, hogy a sejtek életben maradását és szaporodását sem pozitívan, sem negatívan nem befolyásolták ezek a toxinmennyiségek. Összességében tehát elmondható, hogy az általunk vizsgált *C. ovata*, hasonlóan a Sedmak és Kosi (1998) által vizsgált *C. erosa*-hoz, a különböző zöldalga taxonoknál érzékenyebben reagál az ebben az összeállításban alacsony, a sejtszámnak megfelelő toxinkoncentrációkra, azonban a populáció egyik esetben sem pusztult el, és a különböző toxinmennyiségek hatása nem különbözött egymástól.

A természetben is csak bizonyos körülmények közt előforduló, magas toxinkoncentrációk (2,5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) eredményei alapján arra lehet következtetni, hogy a *C. ovata* tenyészet még 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR-t is képes a kontrollhoz viszonyított alig több, mint 50%-os növekedésgátlás mellett elviselni. Vagyis igen tág határok között (0,0213 – 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nem változik jelentős mértékben az érzékenysége. A kiindulási értékhez viszonyítva 50,71%-os gátlás figyelhető meg a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációnál. Vagyis a vizsgált faj már igen kis toxinmennyiségre érzékenyen reagál, viszont hosszú távon, egyszeri behatás után (pl. vízvirágzás összeomlása) sejtszám-csökkenés mellett, de a populáció életben tudna maradni. A szakirodalom alapján azt lehet mondani, hogy a viszonylag magas toxinkoncentrációkkal végzett kísérletek során nem elsődlegesen magukkal a populációkkal, hanem az egyes sejtfolyamatokkal foglalkoztak elsősorban. Bár célszervezettől, ill. toxinmennyiségtől, valamint variánstól függően változik, melyik faj milyen mértékben érzékeny az adott toxinra, az azonban általánosságban elmondható, hogy csak kevés olyan algafaj (*Klebsormidium* sp. – Valdor és Aboal 2007) van, melyre semmilyen detektálható hatással nincs a nagy (akár 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) toxinkoncentráció. A fajok többségénél fotoszintézis gátlást (*Dunaliella tertiolecta* – Escoubas et al. 1995, *Anabaena* sp. és *Nostoc muscorum* – Singh et al. 2001, *Peridinium gatunense* – Sukenik et al. 2002, *Synechococcus elongatus* – Hu et al. 2004, *Scenedesmus quadricauda* - Sedmak és Elersek 2005), ill. az oxidatív stressz enzimek, ill. egyéb enzimek szintjének emelkedését (*Scenedesmus armatus* – Pietsch et al. 2001, *Anabaena* sp. és *Nostoc*

muscorum – Singh et al. 2001, *Synechococcus elongatus* – Hu et al. 2004, *Poteroochromonas* – Ou et al. 2005) figyelték meg. Ezek az eredmények azonban nehezen összevethetők az általunk végzett kísérletek eredményeivel, mivel mi a vizsgálataink során a populációsintű változások detektálására törekedtünk.

A bemutatott eredményeink tükrében a célkitűzésekben megfogalmazott kérdésekre a következő válaszok adhatók:

I. Kevert tenyészetek:

1. *Befolyásolják-e, és ha igen, milyen mértékben a C. ovata sejtek életben maradását, szaporodását, végső soron a populáció fennmaradását a különböző sejtszám-arányban inokulált M. aeruginosa sejtek?*

A *C. ovata* sejtek növekedését és életben maradását nagyban befolyásolták az eltérő inokulálási arányok. Az egységnyi sejtszámban inokulált *C. ovata* sejtek száma minden esetben kimutatási határ alá csökkent a kevert tenyészetekben. Annak magyarázatára, hogy milyen tényezők (pl. allelopatikus hatások) állnak ennek hátterében, a további vizsgálatok eredményeiből következtethettünk.

Abban az esetben, amikor a *C. ovata* sejtek inokulálási aránya volt a magasabb, a Cryptophyta sejtek minden esetben túlnőtték a *Microcystis* sejteket. Ezek az eredmények is alátámasztani látszanak azt a feltevést, hogy a kevert tenyészetekben a két faj közti interakciós kapcsolatban elsősorban az abiotikus tényezőkért való kompetíció játszik szerepet és a *M. aeruginosa* által termelt toxin esetleges allelopatikus hatása csupán másodlagos.

2. *Hogyan befolyásolják az M. aeruginosa sejtszám-növekedését az eltérő sejtszám-arány-beállítási körülmények?*

A *M. aeruginosa* sejtek minden esetben életben maradtak a kevert tenyészetekben. A tenyészetek közt eltérés csak a kontroll tenyészetekhez viszonyított növekedési rátájukban mutatkozott meg. Az 1:2 és 1:4 arányú tenyészeteknél az *M. aeruginosa* növekedési rátája alatta maradt a kontroll tenyészetekének, ez arra enged következtetni, hogy a *C. ovata* ezen közepes arányok esetén szintén hatással van a *M. aeruginosa* növekedésére. Nem teljesen világos, hogy mi áll e hatás hátterében. Feltételezhető, hogy az első napokban a *C. ovata* sejtek jelenléte a tápanyag felvételében konkurenciát jelentett az *M. aeruginosa* sejteknek (3b-c. ábra). Ezt támaszthatja alá az a megfigyelés is, hogy az 1×-es, 2×-es és 4×-es kontroll tenyészetekben a tápanyag-felvételi ráta minden esetben a *C. ovata* sejtek esetében volt magasabb (4. és 6. ábra).

Azokban a tenyészetekben, melyekben a *C. ovata* sejtek inokulálási aránya volt magasabb, a *Cryptomonas* sejtek hatékonyabb tápanyagfelvétele biztosította azt, hogy a Cryptophyta populáció jelentős mértékben túlnőtte a cianobaktérium sejteket.

II. Sejtkivonattal kezelt tenyészetek:

1. *Amennyiben toxikusak, milyen mértékben toxikusak a kevert tenyészetek inokulálási körülményeinek megfelelő M. aeruginosa sejtkivonatok a C. ovata tenyészetek populációira?*

A *M. aeruginosa* sejtkivonatokkal kezelt *C. ovata* tenyészetek vizsgálata során kapott eredmények több szempontból is alátámasztották azt a feltevésünket, hogy az élő sejtek között elsődlegesen interakciós kapcsolatokról nem pedig allelopátiáról van szó:

- (i) egyetlen sejtkivonat sem vezetett a *C. ovata* sejtek számának detektálási határ alá való csökkenéséhez szemben a kevert tenyészetekkel;
- (ii) a $0,4-2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} kivonatok serkentették a *C. ovata* sejtek növekedését szemben a kevert tenyészetekben tapasztalt detektálási határ alá csökkenő *Cryptomonas* sejtszámmal;
- (iii) az 5×10^6 sejt mL^{-1} kivonat növekedésgátló hatással bírt az első napokban, azonban a populáció nem pusztult el, hanem folyamatosan növekedett, csak a kontroll tenyészetnél kisebb intenzitással.

2. *Van-e antibakteriális, vagy növekedés-serkentő hatása a kevert tenyészetek inokulálási körülményeinek megfelelő C. ovata sejtkivonatoknak az M. aeruginosa tenyészetekre?*

A *C. ovata* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetekről elmondható, hogy amennyiben a sejtkivonat az élő *Microcystis* sejtek számával megegyező számú sejtől származik, úgy a kezelés a cianobaktérium sejtek pusztulásához vezet (8. ábra). Ha a *C. ovata* kivonat mennyisége a *M. aeruginosa* sejtszámánál alacsonyabb sejtszámnak megfelelő, akkor serkenti a *Microcystis* sejtek szaporodását, míg magasabb sejtszámnak megfelelő mennyiségű *Cryptomonas* kivonatok szignifikáns *M. aeruginosa* sejtszám csökkenést okoznak a kontroll tenyészetekhez képest. Összességében tehát elmondható, hogy a *C. ovata* termelhet olyan antibakteriális vegyületeket, amelyek negatívan befolyásolják a *Microcystis* sejtek szaporodását, azonban ezek kémiai összetételének, kibocsátásuk mértékének meghatározása, egyáltalán létezésük bizonyítása még további, jelen dolgozat kereteit meghaladó számú vizsgálatot igényel.

3. *Kimutatható-e autotoxicitás, vagy növekedés serkentés a Microcystis tenyészetek esetében az eltérő inokulálási körülményeknek megfelelő mennyiségű M. aeruginosa sejtkivonatokkal történő kezelés hatására?*

Míg a *C. ovata* sejtkivonatoknak mind neutrális, mind növekedést serkentő, mind pedig növekedést gátló hatása megfigyelhető volt, addig a *Microcystis* sejtkivonatok egyértelműen pozitívan befolyásolták a cianobaktérium sejtek számának emelkedését. Tehát az autotoxicitás ennél a laboratóriumi törzsnél egyértelműen kizárható.

III. MC-LR tisztított toxinnal kezelt tenyészetek

1. *Milyen mértékben toxikus hosszú távon (14 napos expozíció) a MC-LR a M. aeruginosa sejtkivonatokkal egyenértékű koncentrációkban a C. ovata tenyészetekre?*

A tiszta toxinnal való kezelés során alkalmazott toxinkoncentrációk ($0,02-1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) mérsékelt és visszafordítható változásokat okoztak a kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszámában. Vagyis az általunk vizsgált *C. ovata* mikrocsisztekre vonatkoztatva nem tekinthető érzékeny fajnak: bár már alacsony koncentrációban reagál a toxin jelenlétére, azonban ha egyszeri hatásról van szó, a populáció képes regenerálódni.

2. *Milyen mértékben toxikus a MC-LR magasabb koncentrációban, akut toxikológiai tesztben (72 órás expozíció) a C. ovata tenyészetekre?*

A toxikológiai tesztek azt mutatták, hogy a *C. ovata* sejtek EC_{50} értéke összevetve azt egyes vízínövények érzékenységgel (Pflugmacher 2002) viszonylag magasnak mondható ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Meg kell jegyezni azonban, hogy viszonylag széles koncentráció-tartományban hasonló érzékenységet tapasztaltunk. A *C. ovata* populáció teljes pusztulása (a sejtszám 99,5%-os csökkenése) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ toxinkoncentráció jelenlétében volt megfigyelhető.

Napjainkban egyre népszerűbbek a természetes körülményeket modellező kevert tenyészetekkel és a sejtkivonatokkal végzett kísérletek, mivel még kevés adat áll rendelkezésre a szakirodalomban a fitoplankton tagjai közti tényleges interakciós kapcsolatokról, különösen vitatott az allelopátia kérdése a cianotoxinokkal kapcsolatban. Ezért tartottuk fontosnak megvizsgálni a *C. ovata* és a *M. aeruginosa* közti interakciós kapcsolatokat. A *M. aeruginosa* 1:50 aránynak megfelelő mennyiségű nyerskivonatával kezelt *C. ovata* tenyészetek eredményei azt sugallják, hogy a toxinok allelopatikus hatása a gátlás kifejtésében feltételezhető (mint pl.: szinergizmus a különböző mikrocisztin variánsok között - Mohamed 2008; az alkalmazott analitikai módszerrel nem detektálható, proteinhez kötött cianotoxinok jelenléte - Jüttner és Lüthi 2008; más allelopatikus hatású vegyületek jelenléte - Suikkanen et al. 2006; Palíková et al. 2007); az alacsonyabb aránynak megfelelő mennyiségben alkalmazott sejtkivonattal, illetve a tiszta toxinnal végzett kezelések eredményei azonban azt mutatják, hogy a *C. ovata* sejtszámának csökkenése a kevert tenyészetekben nem elsősorban a tápoldatban lévő oldott mikrocisztineknek köszönhető. Vizsgálataink eredményei terepi megfigyelésekkel történő összevetése még további kutatás tárgyát képezi.

Az eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fizikai környezet hatásai elsődlegesek a fitoplankton közösségek összetételének meghatározásában (Padisák et al. 2010, Zohary et al. 2010), emellett a forrásokért való kompetíció, a populációk jelenléte, élettevékenysége okozta környezeti változások (árnyékolás, pH-változások), valamint a cianobakteriális vegyületek által okozott gátló hatások szintén fontos szerepet játszhatnak.

Interactions between *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa* Kützigg (Cyanobacteria)

Ph.D. thesis

Vikória B-Béres

1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES

1.1. Introduction

Planktonic algal species coexistence in water can be influenced by various abiotic (light, nutrient supply, turbulence, temperature, etc.) and biotic (different interactions as predation, allelopathy, etc.) factors (Cloern 1976, 1978). Algae species richness and number of individuals can change seasonally and spatially in a given water body (Sommer 1994). The presence or absence of a species holds information about the water body. Multi-year period studies show that some species are represented in only a small number in some years, while they may appear in huge biomass in other years (Cloern 1976), without evincible significant differences of abiotic factors measured from one year to the other. In such cases, the biotic factors such as toxicity, predation, allelopathy, concurrency must always be carefully considered (Sukenik et al. 2002, Hedger et al. 2004).

There are several possible ways of the investigation of interaction between phytoplankton species: (i) testing the coexistence of axenic cultures; (ii) treating an axenic culture with the crude extract/exudate of an other axenic culture; (iii) treating a toxic or non-toxic axenic culture with the purified toxin of an other toxic culture (Sommer 1994). The obtained results help to determine whether allelopathy, concurrency or toxicity is involved in the interactions of the studied populations. One great advantage of co-culturing experiments is that they allow to explore the interaction during competition for environmental factors (nutrients, light) between two or more, but limited number of species (Chu et al. 2007). Interactions of toxic cyanobacteria have always been in the focus of interest. It has been observed in mixed cultures that certain *M. aeruginosa* strains benefit by their extracellular compounds (Lam et Silvester 1979), by nutrient-rich environment (Takeya et al. 2004), by higher temperature (Chu et al. 2007) and by the corresponding quantities of inoculated cells (Beres et al. 2007, 2012).

In recent years, there is an increased interest for experiments imitating field conditions and there is growing number of studies in which crude extracts and exudates are also used instead or beside of purified toxins to explore the type of interactions. One great advantage of experiments with crude extracts is that they are modelling naturally occurring processes (e.g. lyses of cell mass at the end of a cyanobacterial water bloom) by adding toxin containing cell debris without purification to the studied cultures. Subjects of previous studies primarily were higher plants (*Triticum aestivum*, *Allium cepa* - Sanevas et al. 2006, Pflugmacher et al. 2007), zooplankton species (*Cladocera* sp. - Okumura et al. 2007), as well as different frog and fish species (Oberemm et al. 1999). There are fewer available data about the effects of cyanobacterial crude extracts on eukaryotic algae or on non-toxic cyanobacteria (Pietsch et al., 2001 Valdor and Aboal 2007, Vassilakaki and Pflugmacher 2008). These studies mainly present the physiological effects of crude extracts, rather than the longer-term, population-level changes.

The real impact of a compound/a group of compounds on cells, tissues, could be truly tested if purified compounds are used. This is the reason of application of purified toxins in studying the mechanism of action of cyanotoxins (Singh et al. 2001). Since the major part of cyanotoxins endangers not only the aquatic ecosystem, but humans or domestic animals as well, by getting into drinking water (Zilberg 1966, Lippy és Erb 1976, Byth 1980, Teixeira et al. 1993, Jochimsen et al. 1998, Francis 1978, Negri et al. 1995) or feed-additives (Negri és Jones 1995, Prepas et al. 1997), several studies / research groups dealing with them.

Cyanobacteria, as well as Cryptophyta species are permanent members of phytoplankton in large or small numbers; according to present knowledge, there are no data about the coexistence of each taxon in large numbers of individuals. The reasons for this may be allelopathic compounds produced by cyanobacteria in addition to the abiotic factors (temperature, turbulence, light).

1.2. Objectives

To understand the interaction between *Cryptomonas ovata* (non-toxic, eukaryotic cryptomonad) and *Microcystis aeruginosa* (toxic prokaryotic cyanobacterium) three different complementary methods were used:

- I. Co-culturing of the two species in mixed cultures**
- II. Treatments with crude extracts**
- III. Treatments with purified toxins**

We looked for the answers to the following specific questions during our work:

I. Mixed cultures:

1. Has any influence and in what extent the different inoculated cell densities of *M. aeruginosa* on the growth of *C. ovata* cultures, the survival of populations?
2. How the different inoculating conditions affect the increase of *M. aeruginosa* in mixed cultures?

II. Crude extract treated cultures:

1. Are *M. aeruginosa* crude extracts toxic to *C. ovata*?
2. Is there an antibacterial or growth-stimulating effect of *C. ovata* crude extracts on *M. aeruginosa* cultures?
3. Is there demonstrable autotoxicity or growth stimulation of *M. aeruginosa* crude extracts on *M. aeruginosa*?

III. Purified microcystin-LR (MC-LR) treated cultures:

1. How toxic is MC-LR in concentrations equivalent to *M. aeruginosa* crude extract to *C. ovata* cultures in long-term experiments (14 day exposure)?
2. How toxic MC-LR in higher concentrations to *C. ovata* cultures in acute toxicity test (72 h exposure)?

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Strains, culturing conditions and experimental setup

C. ovata (CCAP 979/61, United Kingdom) and *M. aeruginosa* (BGST 243, Hungary) were used for the experiments. The culturing medium, light intensity and temperature were chosen on the base of pilot-experiments. Batch cultures aerated with sterile air were used (SERA Air 275R air pump; 275 L h⁻¹) in 500 ml Erlenmeyer flasks with a final volume of 400 ml. Cultures were grown and maintained under continuous irradiation (20 μmol m⁻² sec⁻¹) in Jaworski's medium (<http://www.ccap.ac.uk/media/documents/JM.pdf>), at 22-23°C. The duration of the experiments was 14 days (except for the toxicity test, see below). To determine cell numbers, 10 μL samples were collected daily. Cell numbers were counted by a Zeiss Jenaval microscope at 400× magnification. Growth rates were calculated as follows:

$$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

where k is the growth rate of the culture, N_1 the cell number of the culture in time t_1 , N_2 the cell number of the culture in time t_2 , t_1 is the day of inoculation, t_2 a given day of the experiment.

2.2. Mixed cultures (containing both *C. ovata* and *M. aeruginosa* cells)

2.2.1. Mixed cultures inoculated with *C. ovata* and *M. aeruginosa* cells in 1:1, 1:2, 1:4, 1:25 and 1:50 ratios

The inoculated cell numbers of *C. ovata* were 0.1×10^6 cells mL⁻¹ in every case. Previous observations showed that this cell density is optimal for inoculation under our culturing practice. Lower cell densities results too long lag phase and do not allow reaching possible maximal biomass; while higher inoculating cell densities leads to early stationary phase. *M. aeruginosa* cell numbers in mixed cultures were 0.1×10^6 cells mL⁻¹ (1:1 ratio), 0.2×10^6 cells mL⁻¹ (1:2 ratio), 0.4×10^6 cells mL⁻¹ (1:4 ratio), 2.5×10^6 cells mL⁻¹ (1:25 ratio), and 5×10^6 cells mL⁻¹ (1:50 ratio). The inoculated cell numbers of *C. ovata* control cultures (*C. ovata* cultures without *M. aeruginosa* cells) were 0.1×10^6 cells mL⁻¹. The inoculated cell numbers of *M. aeruginosa* control cultures (*M. aeruginosa* cultures without *C. ovata* cells) were the same, as the inoculated cell numbers of *M. aeruginosa* in mixed cultures. In the case of *M. aeruginosa* control cultures, shaded cultures were also used, where the inoculated cell numbers were 0.1×10^6 cells mL⁻¹, to avoid photoinhibition. Shading was carried out with an aluminium foil collar around the erlenmeyer flask's neck on the first week of incubation time.

2.2.2. Mixed cultures inoculated with *C. ovata* and *M. aeruginosa* cells in 1:1, 2:1, and 4:1 ratios

The inoculated cell numbers of *M. aeruginosa* were 0.1×10^6 cells mL⁻¹ in control, shaded control and mixed cultures in every cases. *C. ovata* inoculated cell numbers in mixed cultures were 0.1×10^6 cells mL⁻¹ (1:1 ratio), 0.2×10^6 cells mL⁻¹ (2:1 ratio), 0.4×10^6 cells mL⁻¹ (4:1 ratio). The inoculated cell numbers of *C. ovata* control cultures were the same, as the inoculated cell numbers of *C. ovata* in mixed cultures. Since maximal cell number of *C. ovata* wasn't much higher than $1-1.5 \times 10^6$ cells mL⁻¹ we had to regarded to investigate the cultures with ratios 25:1 and 50:1.

2.3. Crude extracts treated cultures

2.3.1. Treatment of *C. ovata* cultures with *M. aeruginosa* crude extracts

The inoculated cell numbers of *C. ovata* were set to approximately 0.1×10^6 cells mL⁻¹, both in treated and in control cultures. *C. ovata* cultures were treated with *M. aeruginosa* extracts equivalent to the *M. aeruginosa* cell numbers in mixed cultures (see above, chapter 2.2.1).

2.3.2. Treatment of *M. aeruginosa* cultures with *C. ovata* crude extracts

Two different experimental setup were used for treatment of *M. aeruginosa* cultures with *C. ovata* crude extracts were used.

According to cell number ratios described in 2.2.1. chapter, *M. aeruginosa* cultures, inoculated with 0.1×10^6 cells mL⁻¹, 0.2×10^6 cells mL⁻¹ and 0.4×10^6 cells mL⁻¹ cells, were treated with 0.1×10^6 cells mL⁻¹ *C. ovata* crude extracts. The inoculated cell numbers of *M. aeruginosa* control cultures were the same, as the inoculated cell numbers of *M. aeruginosa* in treated cultures. Since the *C. ovata* cell number in mixed cultures with 1:25 and 1:50 ratios decreased below the limit of detection (100 cells mL⁻¹) for the first day, furthermore there were not significant differences between *M. aeruginosa* cell numbers in control and these mixed cultures, *M. aeruginosa* cultures, inoculated with 2.5×10^6 cells mL⁻¹ and 5×10^6 cells mL⁻¹ cells, were not treated *C. ovata* crude extracts.

According to *C. ovata* cell number ratios described in 2.2.2. chapter, *M. aeruginosa* cultures were treated with *C. ovata* crude extracts equal to inoculation cell numbers 0.1×10^6 cells mL⁻¹; 0.2×10^6 cells mL⁻¹ and 0.4×10^6 cells mL⁻¹. The cell number of *M. aeruginosa* in treated, control and shaded control cultures were 0.1×10^6 cells mL⁻¹.

2.3.3. Treatment of *M. aeruginosa* cultures with *M. aeruginosa* crude extracts

According to cell number ratios described in 2.2.1 chapter, *M. aeruginosa* cultures were treated with *M. aeruginosa* crude extracts equal to cell numbers 0.1×10^6 cells mL⁻¹, 0.2×10^6 cells mL⁻¹, 0.4×10^6 cells mL⁻¹, 2.5×10^6 cells and 5×10^6 cells mL⁻¹. The cell number of *M. aeruginosa* in treated, control and shaded control cultures were 0.1×10^6 cells mL⁻¹.

2.4. MC-LR treated cultures

2.4.1. Treatment of *C. ovata* cultures with purified toxin (MC-LR) of *M. aeruginosa*

The inoculated cell numbers of *C. ovata* were 0.1×10^6 cells mL⁻¹, in treated and control cultures as well. MC-LR was used for the purified toxin treatments; concentration of MC-LR in the toxin treated *C. ovata* cultures were $0.0213 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.0425 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.0851 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0.5317 \mu\text{g mL}^{-1}$, and $1.0633 \mu\text{g mL}^{-1}$. These concentrations of the purified toxin were equal to the total toxin contents of *M. aeruginosa* crude extracts (see below the calculation of toxin content).

2.4.2. Toxicity test

To determine the toxic effects of MC-LR after 72 h exposure, *C. ovata* cultures were treated with 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ toxin. Tests were carried out on 12 wells plates (in a final volume of 4 ml Jaworski's medium); the inoculated cell numbers of *C. ovata* were 0.1×10^6 cells mL^{-1} ; the plates were incubated for 72 h with continuous irradiation ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 22–23 °C. Cultures were sampled at 0th and 72nd hours. All experiments were done in triplicate.

2.5. Crude extract preparation, MC-LR purification and measurement

2.5.1. Preparation of *M. aeruginosa* crude extract

300 ml of *M. aeruginosa* culture with known cell number (16×10^6 cells mL^{-1}) was centrifuged (Beckman Avanti J-25, 20 min, $6,000 \times g$) to prepare *M. aeruginosa* extract. The pellet was stored at -20 °C until the start of the experiments. Cells were disrupted by freezing (at -20 °C) and thawing (at room temperature) thrice following 2 min of sonication (Transsonic T470/H sonicator).

2.5.2. Preparation of *C. ovata* crude extract

800 ml of *C. ovata* culture with known cell number ($1,13 \times 10^6$ cells mL^{-1}) was centrifuged (Beckman Avanti J-25, 20 min, $6,000 \times g$) to prepare *C. ovata* extract. The pellet was stored at -20 °C until the start of the experiments. Cells were disrupted by freezing (at -20 °C) and thawing (at room temperature) thrice following 2 min of sonication (Transsonic T470/H sonicator).

2.5.3. MC-LR purification and measurement

MC-LR purification was carried out according to Harada et al. (1988, later modified by Vasas et al. 2006). The toxin content of crude extract stock and the medium was measured by capillary electrophoresis (Vasas et al. 2006). The toxin content of *M. aeruginosa* cells was $2,1266 \times 10^{-4}$ ng cell⁻¹; the composition of MCs in the cells, and crude extract according to MECK analyses were MC-LR (50.6%), MC-YR (39%), MC-YA (10%), and traces of MC-RR.

The possibility of chemical and biological degradation was extremely low, because under the applied conditions, there were no extremely high temperatures ($\geq 40^\circ\text{C}$); high (9) or low (1) pH values; or intensive UV radiation; and the cultures were free from heterotrophic bacteria (Chorus és Bartram 1999).

2.6. Measurement of nitrate

To measure the nitrate content in cultures, 400 μL cell-free supernatants were used. The supernatants were stored at -20 °C. Nitrate measurements were carried out according to the method Felföldy (1987), with reduced volumes. To calculate the nitrate-uptake of cells, the

cultures nitrate content at the 0th day was regarded as 100%. The nitrate concentration of cultures was measured at 0th, 7th and 14th days.

2.7. Statistical analyses

One-way ANCOVA was used to determine the significances among the tendency-differences of growth curves of control and treated cultures (Zar 1996; Hammer et al. 2001). One-way ANOVA was used to determine the significances among the growth rates and nitrate uptake of control and treated cultures. Past program was used for the statistical analysis (Hammer et al. 2001).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Mixed cultures

3.1.1. Co-culturing of *C. ovata* and *M. aeruginosa* cells in 1:1, 1:2, 1:4, 1:25 and 1:50 ratios

Cell numbers of *C. ovata* decreased in mixed cultures in all cases. There were differences only in the time when *C. ovata* cell numbers decreased fewer than 100 cells mL⁻¹ (the detection limit of our count technique) and these decreases were in correlation with the abundance of *M. aeruginosa*.

The collapse of *M. aeruginosa* population in $0,1 \times 10^6$ cell mL⁻¹ culture was probably caused by the lack of shading. This assumption is corroborated by the fact, that the cells remained alive in $0,1 \times 10^6$ cell mL⁻¹ shaded control cultures. As it is known, the light requirements of different *M. aeruginosa* strains vary in a wide range. While $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity is very high for some strains (Phelan and Downing 2011), other strains can be kept alive up to $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (or this was the optimal light intensity for *Microcystis* cells; Yamaguchi et al. 2000, Boumnick et al. 2001, Visser et al. 2003). In general *M. aeruginosa* strains are cultured $15\text{-}80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity (Yamaguchi et al. 2000, Visser et al. 2003, Yang and Yin 2008, Renaud et al. 2011, Yang et al. 2012). We have found that it is greatly influenced by the amount of inoculated cells as well, what is the optimal light intensity. It is showed in this study that the used *M. aeruginosa* strain is not able to tolerate $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity in low inoculated cell density ($0,1 \times 10^6$ cell mL⁻¹).

M. aeruginosa cell count changes in mixed cultures are closely connected with the *C. ovata* content of the cultures. *M. aeruginosa* growth rate was lower than the corresponding control cultures in cultures with 1:2 and 1:4 ratio, but *M. aeruginosa* cell numbers were not significantly different from the corresponding *M. aeruginosa* controls in cultures with 1:25 and 1:50 ratio. However, *C. ovata* seemed to have some impact on *Microcystis* growth at intermediate (1:2 and 1:4) cell number ratios. The way of this interaction is not clear. It is known that cryptomonads can produce extracellular compounds ((Kellam and Walker 1989); these are mainly polysaccharides so far known to have allelopathic impact exclusively on heterotrophic bacteria. Another possible explanation could be the differences in nutrient-uptake characteristics of the two species: *C. ovata* cells take up nitrate up to 25% more efficiently from the culture medium at the beginning of the experiments than *M. aeruginosa* cells, while *Microcystis* cells in the same number start the uptake of this nutrient in the second

half of the culturing period. *M. aeruginosa* tolerates well the nutrient-poor environment, it has rich nutrient storages (cyanoficin, phycocyanin as nitrogen storage, polyphosphate bodies as phosphorus reserve; Kromkamp 1987, Kolodny et al. 2006), and low growth rates typical of it, while *Cryptomonas* can be characterised by fast, efficient nutrient uptake and relatively high growth rate (Padisák 2003). The lower *M. aeruginosa* cell numbers in mixed cultures with 1:2 and 1:4 ratio could be caused by the faster nutrient uptake of *C. ovata* cells.

Lam and Silvester (1979) observed that in mixed cultures of *M. aeruginosa* and *Chlorella sp. Microcystis* cells inhibited cell growth of *Chlorella* (94% in comparison to the control culture). Similar inhibition was observed in the case of high *Microcystis / Cryptomonas* ratio. Capillary-electrophoresis showed that extracellular MC content of the culturing media was under the LOD in all of the mixed cultures and in *M. aeruginosa* control cultures. Microcystins, unlike other cyanotoxins, mostly excreted into the environment in very small quantities (usually 0.8 to 10% of the total toxin content - Sivonen and Jones 1999, Ha et al. 2009, Zhang et al. 2010), larger amounts of these toxins are released after lyses of the cells. Active secretion of microcystins is questionable based on literary data (Shi et al. 1995, Rohrlack and Hyenstrand 2007).

The question is why *C. ovata* proliferation was inhibited by living *M. aeruginosa* cells, and why *C. ovata* disappeared from the culture in the presence of *M. aeruginosa*. Our results show that both growth rate and nitrate uptake rate of *C. ovata* are higher than those of the cyanobacterial strain in mixed cultures with 1:1 and 1:2 ratios. Nevertheless, *M. aeruginosa* can outgrow *Cryptomonas* cells in these inoculation conditions. There are two possible explanations: on one hand, it is possible that the cyanobacterial cells produce and emit an allelochemical compound, which was not tested in the experiments, which may exert a synergistic effect with the very small amounts of toxins continuously released from dying *Microcystis* cells. On the other hand, it is possible that according to the life strategy of *C. ovata*, available nutrients are rapidly taken up from the culturing medium in the first days. This could lead to the phenomenon that *C. ovata* cells "disappear" from the culture: *Microcystis* tolerate better the lower nutrient concentrations and can outgrow the cryptomonad (Padisák 2003).

3.1.2. Co-culturing of *C. ovata* and *M. aeruginosa* cells in 1:1, 2:1, and 4:1 ratios

Changes of *C. ovata* cell numbers in mixed cultures were largely dependent on its inoculation conditions. In the case when the inoculated cell number of *C. ovata* was equal to that of *M. aeruginosa*, the cell number of *C. ovata* decreased significantly to the 14th day of the experiment, while cell number of *M. aeruginosa* multiplied in comparison with the starting densities. The cell numbers of *C. ovata* were higher in mixed cultures with 2:1 and 4:1 ratios than in the corresponding control cultures. In contrast, the cell numbers of *Microcystis* populations were significantly below of the cell number of shaded *M. aeruginosa* control culture. The more intense growth of *C. ovata* populations in mixed cultures with 2:1 and 4:1 ratios relative to controls might be caused by additional nutrients and/or hormon-like compounds released into the medium during lyses of *Microcystis* cells (Sergeeva et al. 2002, Stirk et al. 2002, Tsavkelova et al. 2008, Hussain et al. 2010).

The decrease of *Microcystis* cell numbers and the inhibition of growth could be caused by (i) the intensive nitrate uptake of *C. ovata* cells, (ii) and could be closely related with possible antibacterial compounds produced by the *Cryptomonas* cells.

Our results are well comparable with the observations of Takeya et al. (2004). They found that the growth rate of *Microcystis* was higher at low nutrient supply, because these organisms tolerate better the nutrient-poor environment than *Chlorella*. In contrast, *Chlorella*

cells overgrew *Microcystis* cells due to their higher growth rate and nutrient-uptake rate under better nutritional conditions. In our study we found that the growth rates of *C. ovata* were higher than that of *Microcystis* in mixed cultures with 1:1, 1:2, 2:1 and 4:1 ratios in the first few days of the experiments, as well as there were higher nutrient uptake rates in cryptomonad control cultures than in *Microcystis* control cultures.

Overall, it can be said based on the observed cell number changes in mixed cultures that there exists a *C. ovata* - *M. aeruginosa* ratio which allows to grow both species, however, the greater the difference between the inoculation cell number of the two species, the smaller the chance that the species inoculated in lower cell numbers survives. Vardi et al. (2002) found that survival of both *P. gatunense* and *M. aeruginosa* in mixed cultures was largely dependent on the number of inoculated cells. *Peridinium* cells died or their growth was significantly inhibited when the dinoflagellata was inoculated in small or medium cell numbers. This result correlates well with our findings, that *Cryptomonas* survival was closely related to the numbers of inoculated cells. However, the experiments carried out by Vardi et al. also highlighted the fact that *M. aeruginosa* growth was well correlated with the number of inoculated cells of *P. gatunense*. The number of *Microcystis* cells decreased less than one third of their initial number with the increasing number of *Peridinium*. Our results also showed that the number of cyanobacterial cells could be lower by 30-80% than in shaded control cultures depending on the initial number of *Cryptomonas* cells.

3.2. Crude extract treated cultures

3.2.1. Treatment of *C. ovata* cultures with various amounts of *M. aeruginosa* crude extracts

The maximum release of MCs occurs during the decomposition period of *Microcystis* cells when a bloom collapses in the aquatic environment (Park et al., 1998). The use of crude extracts of cyanobacterial cells could be a good representation of this natural situation.

Our results proved that the crude extract could significantly influence the growth rate of *C. ovata*. The relationship was highly variable. Inhibitory, neutral, and facilitative interactions were also observed depending on the amount of the crude extract. Exudates of living cyanobacterial cells or filtrates of cyanobacterial culturing media can inhibit the growth; the polysaccharides production and release; GSH and ROS values of certain microalgal species (Babica et al. 2006, Mohamed 2008, Oberhaus et al. 2008, Leao et al. 2009b, El-Sheekh et al. 2010). At high concentration of crude extract (equivalent to 1:50 ratio) we experienced this inhibition. MC content of this amount of crude extract was equivalent to the 1.0633 $\mu\text{g mL}^{-1}$ purified toxin treated *C. ovata* cultures; however, the crude extract seemed to be more toxic at the first 7–8 days at this high concentration. It could be explained by the presence of other MC variants (MC-YR, MC-YA, MC-RR); the presence of other inhibitory compounds of *M. aeruginosa* (Suikkanen et al. 2006, Palíková et al. 2007), or the occurrence of protein bound cyanotoxin. MCs could be present bound to phycobilin ($\alpha\beta$) monomers (Jüttner and Lüthi 2008) which are not detectable by our MECK method. The present but undetected toxin could explain the stronger toxicity of the crude extract. Furthermore, different MCs could have different toxic properties (McElhiney et al. 2001) and there could be synergistic interactions among MC variants (Mohamed 2008).

The facilitative impact that we experienced at low crude extract concentration is a known phenomenon. Sedmak and Kosi (1998) observed growth stimulation in the case of *Cryptomonas erosa* (Cryptophyta), *Monoraphidium contortum* (Chlorophyta), *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta), and non-toxic *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) cultures

treated with 0.104-0.519 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-RR. It has to be noted; that in these cases the facilitative effects were observable only in the first few days of the experiments, and later growth inhibition was detected, in contrast to our study, where the growth of *C. ovata* was stimulated during the whole time of exposure. Ou et al. (2005) observed increased growth of *Poterioochromonas* sp. treated with 0.1-4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR and MC-RR. It is known, that several free living or symbiotic cyanobacterial strains (*Calothrix* sp., *Phormidium animale*, *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Anabaenopsis* sp., *Chlorogloeopsis* sp., *Cylindrospermum* sp., *Gloeotheca* sp., *Plectonema* sp. *Synechocystis* sp. *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Chroococciopsis* sp.) are able to release phytohormone-like compounds (e.g. auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethylene - Manickavelu et al. 2006), which may facilitate the growth of eukaryotic algae (Sergeeva et al. 2002, Stirk et al. 2002, Tsavkelova et al. 2008, Hussain et al. 2010).

3.2.2. Treatment of *M. aeruginosa* cultures with *C. ovata* crude extracts

3.2.1.1. Treatment of variously inoculated *M. aeruginosa* cultures with a given amount of *C. ovata* crude extracts

The cell numbers of *M. aeruginosa* cultures were set to 0.1×10^6 , 0.2×10^6 , and 0.4×10^6 cells mL^{-1} . *C. ovata* crude extract equal to 0.1×10^6 cell number was used for the treatments. The cell number of *M. aeruginosa* in cultures inoculated with 0.1×10^6 *Microcystis* cells mL^{-1} decreased fewer than 100 cells mL^{-1} after the treatment with *C. ovata* crude extract. It can be assumed, that this amount of crude extract did not provide enough shading for *M. aeruginosa* cells; and anticyanobacterial effects of the crude extract also can be presumed (see chapter 3.2.3.). In contrast, the applied amount of *C. ovata* extract increased the growth of *M. aeruginosa* in cultures inoculated with 0.2×10^6 or 0.4×10^6 *Microcystis* cells mL^{-1} .

These results are well correlated with the results of Lam and Silvester (1979) culturing *Anabaena-Microcystis* and *Chlorella-Myrocystis* cells in the filtrate of one other. They observed that the filtrate of both *Anabaena* and *Chlorella* increased the growth of *Microcystis* in comparison with control cultures.

3.2.2.2. Treatment of *M. aeruginosa* cultures with various amounts of *C. ovata* crude extracts

The cell numbers of *M. aeruginosa* cultures were set to 0.1×10^6 cells mL^{-1} . *C. ovata* crude extracts equal to 0.1×10^6 , 0.2×10^6 , and 0.4×10^6 cell numbers were used for the treatments. The cell number of *M. aeruginosa* in cultures inoculated with 0.1×10^6 *Microcystis* cells mL^{-1} decreased fewer than 100 cells mL^{-1} in after the treatment with *C. ovata* crude extracts (see chapters 3.2.1.1. and 3.2.3). The cell number of *M. aeruginosa* were significantly lower (by 17-32%) in cultures treated with *C. ovata* extracts equal to 0.2×10^6 cells mL^{-1} and 0.4×10^6 cells mL^{-1} than in *Microcystis* control cultures. These results are in good correlation with the results of mixed cultures and seem to support the assumption that *C. ovata* could produce a not yet detected antibacterial compound, which able to decrease the proliferation of *M. aeruginosa* cells.

Anticyanobacterial compounds are described in the case of microalgae (periphyton - Wu et al. 2011) and macroalgae (*Chara vulgaris* – Zhang et al. 2009, *Asparagopsis taxiformis* – El-Baroty et al. 2007, Manilal et al. 2010). The products were indole, 3-oxo-alpha-ionone

(Wu et al. 2011), (Z,Z)-9,12-octadecadienic acid (ODEA, 18:2), tetradecanoic acid (TDA, 14:0) and hexadecanoic acid (HAD,16:0) (Zhang et al. 2009).

Kellam and Walker (1989) studied the antibacterial effects of 27 eukaryotic algal taxa, the marine *Cryptomonas calceiformis* among them. *C. calceiformis* had a negative impact on the growth of Gram-positive bacteria, namely on laboratory strains of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.

It requires further investigations to prove that antibacterial compounds caused the growth inhibition of *M. aeruginosa*.

3.2.3. Treatment of *M. aeruginosa* cultures with various amounts of *M. aeruginosa* crude extracts

These experiments were achieved to exclude autotoxicity and to compare the effects of *Microcystis* extracts and *C. ovata* extracts on the growth of *M. aeruginosa*.

The cell numbers of *M. aeruginosa* were significantly higher in cultures treated with *Microcystis* extracts equal to 0.1×10^6 , 0.2×10^6 and 0.4×10^6 cells mL⁻¹ than in *M. aeruginosa* shaded control culture. It has to be emphasised that the cell number of *M. aeruginosa* decreased fewer than 100 cells mL⁻¹ in cultures treated with *C. ovata* crude extract equal to 0.1×10^6 cells and *M. aeruginosa* cell numbers were significantly lower in cultures treated with *C. ovata* extracts equal to 0.2×10^6 cells mL⁻¹ and 0.4×10^6 cells mL⁻¹ than in *Microcystis* control cultures (see in chapter 3.2.2.2). These results suggest that *C. ovata* extracts contain inhibitory compounds, while *Microcystis* cell extracts can facilitate somehow the growth of *Microcystis* cultures in addition to the shading effect. This assumption is supported by the observations of Sedmak and Kosi (1998), which showed that MCs has growth regulator role (growth stimulator in the case of *M. aeruginosa*).

The growth rates of *M. aeruginosa* cultures treated with *Microcystis* extracts equal to 2.5×10^6 cell mL⁻¹ and 5×10^6 cell mL⁻¹ were lower in the first two days than in cultures treated with less concentrated extracts. This is likely because of the shading effects of such large quantities of algal extracts, although the nutrient intakes of cell extract allow faster growth of the cells. The inhibitory effect of toxin content of the extracts can be raised in addition to shading effects, but this possibility can be rejected in the light of literary data (Babica et al. 2007).

3.3. Cultures treated with the purified toxin of *M. aeruginosa*

Dissolved MCs generally are present in concentrations 0,001-0,01 µg mL⁻¹ in nature (this quantity can vary, of course, according to the toxin variant or *Microcystis* population - Chorus 2005, Babica et al. 2007). Extremely high MC concentrations can occur in the case of collapse of massive cyanobacterial blooms (19.5 µg mL⁻¹, Japan - Nagata et al. 1997, 25 µg mL⁻¹, Germany - Fastner et al. 1999, 8.43-20 µg mL⁻¹, Australia - Kemp and John 2006, 18.04 µg mL⁻¹, Hungary - Máthé et al. 2007). Therefore, wide concentrations ranges were applied during the experiments taking into consideration the toxin content of *Microcystis* cells, i.e. there was a set of experiments carried out with MC concentrations equal to the cell number ratios, and there was an other set of experiments applying higher MC concentrations. MC-LR in concentration equal to the appropriate cell number ratios significantly inhibited the growth of treated *C. ovata* cultures (~ 50% inhibition compared to the control cultures). The cultures were regenerated from the 4th to 6th days, but cell numbers remained significantly lower than in control cultures at the end of the culturing period. These results correlate well with the

results of other studies, which suggest that short or long term responses of different taxa to the presence of MCs strongly depends on the species and environment. Kearns and Hunter (2001) observed in the case of *Chlamydomonas reinhardtii* that mobility of the treated cells did not differ from control cells at low MC-LR concentrations at the end of the culturing period. Babica et al. (2007) found that 0,001-0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC concentrations did not cause significant difference in the growth of various green algae at the end of the culturing period. This was also observed for MC analog nodularin (Suikkanen et al. 2006). Sedmak and Kosi (1998) reported heterogeneous effects of MC-RR. *Monoraphidium contortum* and *Scenedesmus quadricauda* cell numbers increased at the presence of 0.104 to 0.519 mg mL^{-1} toxin and low light intensity, while the growth of *Cryptomonas erosa* culture was inhibited after the initial stimulation. The authors concluded that the strong inhibitory effect can be observed only in special lighting conditions. The toxic effects are strongly affected by the microenvironment: the same concentration could be more toxic depending on the microenvironment and on the sensitivity of algae. Bartova et al (2011) treated *Pseudokirchneriella subcapitata* cultures with 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-RR and MC-LR. It was found that this toxin concentration has neither positive nor negative influence on the survival and proliferation of the cells. Overall, we can say that *C. ovata* more sensitive to low toxin concentrations than green algae, similarly to *C. erosa* studied by Sedmak and Kosi (1998). However, the population was not destroyed and the effects of different toxin concentrations did not differ from each other.

Based on the results of toxicity tests with high toxin concentrations (2.5 to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) it can be concluded that 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR caused little more than 50% growth inhibition of *C. ovata* cultures, 50.71% growth inhibition was observed even at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration. This means that the sensitivity of *C. ovata* did not significantly change in a very wide concentration range of MC-LR (from 0.0213 to 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). *C. ovata* is sensitive on low MC-LR concentrations, but in long term, after a single exposure (e.g., after the collapse of a cyanobacterial bloom) the population is able to stay alive despite of cell number decrease. Based on the literature, it can be said that experiments applying relatively high MC concentrations addressed not primarily populations, but certain cell processes. Although the sensitivity of species depends on target organism, amount and variant of toxin, it can be generally stated that there are only few algal species (*Klebsormidium* sp. - Valdor and Aboal 2007), on which there is no detectable effect of large (up to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) MC concentrations. Inhibition of photosynthesis (*Dunaliella tertiolecta* – Escoubas et al. 1995, *Anabaena* sp. and *Nostoc muscorum* – Singh et al. 2001, *Peridinium gatunense* – Sukenik et al. 2002, *Synechococcus elongatus* – Hu et al. 2004, *Scenedesmus quadricauda* - Sedmak and Elersek 2005), stimulation of oxidative stress enzymes and other enzymes (*Scenedesmus armatus* – Pietsch et al. 2001, *Anabaena* sp. and *Nostoc muscorum* – Singh et al. 2001, *Synechococcus elongatus* – Hu et al. 2004, *Poteroochromonas* – Ou et al. 2005) were observed. However, these results are difficult to compare with the results of our experiments, as in our study we attempted to detect changes in population level.

On the basis of the presented results the questions of the objectives can be answered as follows:

I. Mixed cultures:

1. *Has any influence and in what extent the different inoculated cell densities of M. aeruginosa on the growth of C. ovata cultures, the survival of populations?*

Cell growth and survival of *C. ovata* was influenced by the different inoculation rates. The cell numbers of *C. ovata* fell below the detection limit in all cases of mixed cultures inoculated with $0.1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ *C. ovata* cells. The reason of this is complex (interactions for nutrients, light sensitivity). Toxins of *M. aeruginosa*, however, are likely to play only a secondary role in it, because there was not present extracellular microcystins in detectable amounts in these cultures.

When *C. ovata* cells were inoculated in higher number than *M. aeruginosa* cells, the cryptophyte exceeded the cyanobacterium. These results seem to support the hypothesis that primarily competition for the abiotic factors plays a role in the interaction between the two species in mixed cultures, and the possible allelopathic effect of the toxin produced by *M. aeruginosa* has secondary importance.

2. How the different inoculating conditions affect the increase of *M. aeruginosa* in mixed cultures?

M. aeruginosa cells always survived in mixed cultures. The only difference among the cultures was in their growth rate compared to control cultures. *M. aeruginosa* growth rates were below that of control cultures in cultures with 1:2 and 1:4 ratio, this suggests that *C. ovata* affects *M. aeruginosa* growth in these ratios. It is not entirely clear what is behind this effect. It can be assumed that *C. ovata* cells competed with *M. aeruginosa* cells in nutrient uptake in the first few days of experiments. This may corroborate by the observation that nutrient-uptake rates of *C. ovata* cells in 1×, 2× and 4× control cultures were higher in each case than that of *M. aeruginosa* cells.

In cultures, in which the inoculation rates of *C. ovata* were higher, the increased nutrient uptake rates of *Cryptomonas* cells ensured that the population of cryptomonad outgrew the cyanobacterial cells.

II. Crude extract treated cultures:

1. Are *M. aeruginosa* crude extracts toxic to *C. ovata*?

The results of *C. ovata* cultures treated with *M. aeruginosa* crude extracts confirmed our assumption, that the relations between living cells and not allelopathy play primary roles in the interaction of the two species:

- (i) Cell numbers of *C. ovata* was never below the detection limit in contrast with the observations in mixed cultures;
- (ii) Crude extracts equal to $0,4\text{-}2,5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ stimulated the growth of *C. ovata* in comparison to control cultures;
- (iii) Crude extract equal to $5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ inhibited the growth of *C. ovata*, however, the population was not destroyed, but continued to grow with lower intensity than the control culture.

2. Is there an antibacterial or growth-stimulating effect of *C. ovata* crude extracts on *M. aeruginosa* cultures?

The treatment causes the death of the cyanobacterial population, when the cell extract of *C. ovata* was equal to the cell number of *Microcystis*. *C. ovata* crude extract stimulated the growth of *Microcystis*, when it was equal to lower cell number than the number of *Microcystis* cells; while at cell extracts of the cryptomonad corresponding to higher cell numbers caused a significant decrease in *M. aeruginosa* cell numbers compared to control

cultures. Overall, we can conclude that *C. ovata* may produce anti-bacterial compounds that negatively affect the growth of *Microcystis* cells, however, to describe their chemical composition, level of release, to prove their existence needs further examinations going beyond the possibilities of the present work.

3. *Is there demonstrable autotoxicity or growth stimulation of M. aeruginosa crude extracts on M. aeruginosa?*

C. ovata crude extracts had both neutral, growth stimulatory as well as growth inhibitory effects, while *Microcystis* crude extracts clearly had a positive impact on the number of cyanobacterial cells. Thus, autotoxicity can be clearly excluded in the case of this laboratory strain.

III. Purified MC-LR treated cultures:

1. *How toxic is MC-LR in concentrations equivalent to M. aeruginosa cell extract to C. ovata cultures in long-term experiments (14 day exposure)?*

The used toxin concentrations in pure toxin treatments (from 0.02 to 1.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) caused moderate and reversible changes in the cell numbers of treated *C. ovata* cultures. *C. ovata* can not be considered as sensitive species to microcystins: although it responds to low concentrations of presence toxin, but the population able to regenerate in the case of single exposure.

2. *How toxic MC-LR in higher concentrations to C. ovata cultures in acute toxicity test (72 h exposure)?*

The toxicological tests showed that EC_{50} values for the cryptomonad can be considered as relatively high (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in comparison with the sensitivity of some aquatic plants. It should be noted, however, that similar sensitivity was observed in a relatively wide range of concentrations (from 0.02 to 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The total destruction of *C. ovata* population (99.5% decrease of cell numbers) was observed at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ toxin concentration.

Nowadays experiments modelling natural conditions (mixed cultures, crude extracts) are more and more popular, whereas there are few data available in the literature for interactions between members of phytoplankton, particularly contentious issue the allelopathic activity of cyanotoxins. Therefore it is considered important to study the interaction between *C. ovata* and *M. aeruginosa*, a eukaryotic alga and a toxic cyanobacterium. The results of *C. ovata* cultures treated with *M. aeruginosa* crude extract in 1:50 ratio suggest that the allelopathic effect of toxins in growth inhibition can be assumed (such as synergism of the different variants of microcystins - Mohamed 2008; presence of protein-bound cyanotoxins undetectable by the applied analytical method - Jüttner and Lüthi 2008; presence of other allelopathic compounds - Suikkanen et al. 2006, Palíková et al. 2007). However, the results of treatments with crude extract corresponding to lower ratio, and the pure toxin treatments suggest, that the decrease in *C. ovata* cell number in mixed cultures is not primarily due to dissolved microcystin content of the culture medium. Comparison of our results with field observations is the subject of further research.

Based on these results we can conclude that the effects of the physical environment are primary in the composition of phytoplankton communities (Padisák et al. 2010, Zohary et al. 2010). In addition competing for resources, environmental changes caused by the presence

and activity of other populations (shading, pH changes), and the inhibitory effects caused by cyanobacterial compounds also play an important role.

IRODALOMJEGYZÉK/REFERENCES

- Babica, P., L. Bláha & M. Blahoslav (2006) Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42: 9-20.
- Babica, P., K. Hilscherova, K. Bartova, L. Blaha & B. Marsalek (2007) Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia* 46: 137-142.
- Bartova, K., K. Hilscherova, P. Babica, B. Marsalek & L. Blaha (2011a) Effects of microcystin and complex cyanobacterial samples on the growth and oxidative stress parameters in green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and comparison with the model oxidative stressor—herbicide paraquat. *Environmental Toxicology* 26: 641–648.
- Béres, V., I. Bácsi, Gy. Surányi, G. Vasas, M. M-Hamvas, Sz. Tóth, Cs. Máthé, K. T. Kiss, Gy. Borbély, A. S. Nagy, A. Plenković-Moraj & I. Grigorszky (2007) The interaction between *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa* Kützig (Cyanobacteria) species. *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 161: 405-415.
- B-Béres, V., I. Grigorszky, G. Vasas, G. Borics, G. Várбірó, S. A. Nagy, Gy. Borbély & I. Bácsi (2012) The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages. *Hydrobiologia* 691: 97-107.
- Boumnick, L., A. Derraz, B. Naji & A. Dauta (2001) Influence of light-temperature and nutrient conditions on the growth and intracellular storage (nitrogen and phosphorus) of *Microcystis aeruginosa* Kützing isolated from the El Kansera (Morocco) eutrophic impoundment. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 37: 191-198.
- Byth, S. (1980) Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia* 2: 40-42.
- Chorus, I. (ed) (2005) Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Berlin pp. 117
- Chorus, I. & J. Bartram (1999) Toxic cyanobacteria in water - A guide to their public health consequences, monitoring and management. E and FN Spon London.
- Chu, Z., X. Jin, N. Iwami & Y. Inamori (2007) The effect of temperature on growth characteristics and competitions of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria mougeotti* in a shallow, eutrophic lake simulator system. *Hydrobiologia* 581: 217-223.
- Cloern, J. E. (1976) Recent limnological changes in southern Kootenay Lake, British Columbia. *Canadian Journal of Zoology* 54: 1571-1578.
- Cloern, J. E. (1978) Simulation model of *Cryptomonas ovata* population dynamics in southern Kootenay Lake, British Columbia. *Ecological Modelling* 4: 133-149.
- El-Baroty, G. S., M. Y. Moussa, M. A. Shallan, M. A. Ali, A. Z. Sabh & E. A. Shalaby (2007) Contribution to the Aroma, Biological Activities, Minerals, Protein, Pigments and Lipid Contents of the Red Alga: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 1825-1834.
- El-Sheekh, M. M., H. M. Khairy & R. A. El-Shenody (2010) Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. *Allelopathy Journal* 26: 275-289.
- Escoubas, J. M., M. Lomas, J. LaRoche & P. G. Falkowski (1995) Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 10237–10241.
- Fastner, J., U. Neumann, B. Wirsing, J. Weckesser, C. Wiedner, B. Nixdorf & I. Chorus (1999) Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology* 41: 13–22.
- Felföldy, L. (1987) A biológiai vízminőség. 4. kiad. In: *Vízügyi Hidrobiológia* 16. – VGI, Budapest, 258.
- Francis, G. (1978) Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11-12.
- Ha, J. H., T. Hidaka & H. Tsuno (2009) Quantification of toxic microcystin and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environmental Science & Technology* 43: 812-818.
- Hammer, R., D. A. T. Harper & P. D. Ryan (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- Harada, K. I., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M. F. Watanabe, S. Oishi, A. M. Dahlem, V. R. Beasley & W. W. Charmichael (1988) Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 448: 275-283.
- Hedger, R.D., N. R. B. Olsen, D. B. George, T. J. Malthus & P. M. Atkinson (2004) Modelling spatial distribution of *Ceratium hirundinella* and *Microcystis* spp. in a small productive British lake. *Hydrobiologia* 528: 217-227.
- Hu, Z. Q., Y. D. Liu & D. H. Li (2004) Physiological and biochemical microcystin-RR toxicity to the *Synechococcus elongatus*. *Environmental Toxicology* 19: 571–577.

- Hussain, A., M. Krischke, T. Roitsch & S. Hasnain (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Current Microbiology* 61: 361–369.
- Jochimsen, E. M., W. W. Carmichael, J. An, D. M. Cardo, S. T. Cookson, C. E. M. Holmes, M. B. C. Antunes, F. D. A. Melo, T. M. Lyra, V. S. T. Baretto, S. M. F. O. Azevedo & W. R. Jarvis (1998) Liver failure and death after exposure to microcystin at a haemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 338: 873-878.
- Jüttner, F. & H. Lüthi (2008) Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806. *Toxicon* 51: 388-397.
- Kearns, K. D. & M. D. Hunter (2001) Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial Ecology* 42: 80–86.
- Kellam, S. J. & J. M. Walker (1989) Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal* 24: 191-194.
- Kemp, A. & J. John (2006) Microcystins associated with *Microcystis* dominated blooms in the southwest wetlands, Western Australia. *Environmental Toxicology* 21: 125–130.
- Kolodny, N. H. D. Bauer, K. Bryce, K. Klucsevsek, A. Lane, L. Medeiros, W. Mercer, S. Moin, D. Park, J. Petersen, J. Wright, C. Yuen, A. J. Wolfson & M. M. Allen (2006) Effect of nitrogen source on cyanophycin synthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC 6308 *Journal of Bacteriology* 188: 934-940.
- Kromkamp, J. (1987) Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 457-465.
- Lam, C. W. Y. & W. B. Silvester (1979) Growth interaction among blue-green (*Anabaena Oscillarioides*, *Microcystis aeruginosa*) and green (*Chlorella* sp.) algae. *Hydrobiologia* 63: 135-143.
- Leao, P. N., M. T. S. D. Vasconcelos & V. M. Vasconcelos, 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 35: 271-282.
- Lippy, E. C. & J. Erb (1976) Gastrointestinal illness at Sewickley, P.A. *Journal of American Water Works Association* 68: 606-610.
- Manickavelu, A., N. Nadarajan, S. K. Ganesh, R. Ramalingam, S. Raguraman & R. P. Gnanamalar (2006) Organogenesis induction in rice callus by cyanobacterial extracellular product. *African Journal of Biotechnology* 5: 437–439.
- Manilal, A., S. Sujith, B. Sabarathnam, G. S. Kiran, J. Selvin, C. Shakir & A. P. Lipton Bioactivity of the red algae *Asparagopsis taxiformis* collected from the Southwestern coast of India. *Brazilian Journal of Oceanography* 58: 93-100.
- Máthé, Cs., M. M-Hamvas, G. Vasas, Gy. Surányi, I. Bácsi, D. Beyer, Sz. Tóth, M. Timár & Gy. Borbély (2007) Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist* 176: 823-835.
- Mohamed, Z. A. (2008) Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology* 17: 504-516.
- Nagata, S., T. Tsutsumi, A. Hasegawa, F. Yoshida, Y. Ueno & M. F. Watanabe (1997) Enzyme immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. *Journal of AOAC International* 80: 408–417.
- Negri, A. P. & G. J. Jones (1995) Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyra condola*. *Toxicon* 33: 667-678.
- Negri, A. P., G. J. Jones & M. Hindmarsh (1995) Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon* 33: 1321-1329.
- Oberemm, A., J. Becker, G. A. Codd & C. Steinberg (1999) Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* 14: 77–88.
- Oberhaus, L., J. F. Briand & J. F. Humbert (2008) Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *FEMS Microbiology Ecology* 66: 243-249.
- Okumura, D. T., R. B. Sotero-Santos, R. A. Takenaka & O. Rocha (2007) Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology* 16: 263-270.
- Ou, D. Y., L. R. Song, N. Q. Gan & W. Chen (2005) Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poteroiochromonas* sp. *Environmental Toxicology* 20: 373–380.
- Padisák, J. (2003) Phytoplankton. In: P.E. O’Sullivan, C.S. Reynolds (eds.) *The lakes handbook*. Vol. 1. Blackwell Publishing. Malden, Oxford, Carlton. p. 251-308.
- Padisák, J., É. Hajnal, L. Naselli-Flores, M. T. Dokulil, P. Nöges & T. Zohary (2010) Convergence and divergence in organization of phytoplankton communities under various regimes of physical and biological control. *Hydrobiologia* 639: 205-220.

- Palíková, M., R. Krejčí, K. Hilscherová, P. Babica, S. Navrátil, R. Kopp & L. Bláha (2007) Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 81: 312–318.
- Park, H. D., C. Iwami, M. F. Watanabe, K. Harada, T. Okino & H. Hayashi (1998) Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13: 61-72.
- Pflugmacher, S., M. Aulhorn & B. Grimm (2007) Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytologist* 175: 482–489.
- Phelan, R. R. & T. G. Downing (2011) A growth advantage for microcystin production by *Microcystis* PCC7806 under high light. *Journal of Phycology* 47: 1241-1246.
- Pietsch, C., C. Wiegand, M. V. Amé, A. Nicklisch, D. Wunderlin & S. Pflugmacher (2001) The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology* 16: 535-542.
- Prepas, E. E., B. G. Kotak, L. M. Campbell, J. C. Evans, S. E. Hruddy & C. F. B. Holmes (1997) Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grantis simpsoniana*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 54: 41-46.
- Renaud, S. L., F. R. Pick & N. Fortin (2011) Effect of light intensity on the relative dominance of toxigenic and nontoxigenic strains of *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7016-7022.
- Rohrlack, T. & P. Hyenstrand (2007) Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia* 46: 277-283.
- Sanevas, N., Y. Sunohara & H. Matsumoto (2006) Crude extract of the cyanobacterium, *Hapalosiphon* sp., causes a cessation of root elongation and cell division in several plant species. *Weed Biology and Management* 6: 25-29.
- Sedmak, B. & G. Kosi (1998) The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research* 20: 691-708.
- Sedmak, B. & T. Elsersek (2005) Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplankton. *Microbial Ecology* 50: 298–305.
- Sergeeva, E., A. Liaimer & B. Bergman (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215: 229–238.
- Shi, L., W. W. Carmichael & I. Miller (1995) Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology* 163: 7–15.
- Singh, D. P., M. B. Tyagi, A. Kumar, J. K. Thakur & A. Kumar (2001) Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 15–22.
- Sivonen, K. & G. Jones (1999) Cyanobacterial toxins. In: Chorus I. & J. Bartram (eds.) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management*. E&FN Spon, London p. 41–111.
- Sommer, U. (1994) *Planktologie*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. pp. 274.
- Stirk, W. A., V. Ördög, J. Van Staden & K. Jäger (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology* 14: 215–221.
- Suikkanen, S., J. Engstrom-Ost, J. Jokela, K. Sivonen & M. Viitasalo (2006) Allelopathy of Baltic Sea cyanobacteria: no evidence for the role of nodularin. *Journal of Plankton Research* 28: 543-550.
- Sukenik, A., R. Eshkol, A. Livne, O. Hadas, M. Rom, D. Tchernov, A. Vardi & A. Kaplan (2002) Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. *Limnology and Oceanography* 47: 1656-1663.
- Takeya, K., A. Kuwata, M. Yoshida & T. Miyazaki (2004) Effect of dilution rate on competitive interactions between the cyanobacterium *Microcystis novacekii* and the green alga *Scenedesmus quadricauda* in mixed chemostat cultures. *Journal of Plankton Research* 26: 29-35.
- Teixera, M. G. L. C., M. C. N. Costa, V. L. P. Carvalho, M. S. Pereira & E. Hage (1993) Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27: 244-253.
- Tsavkelova, E. A., S. Y. Klimova, T. A. Cherdyntseva & A. I. Netrusov (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemical Microbiology* 42: 117–126.
- Valdor, R. & M. Aboal (2007) Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon* 49: 769–779.
- Vardi, A., D. Schatz, K. Beeri, U. Motro, A. Sukenik, A. Levine & A. Kaplan (2002) Dinoflagellate-Cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. *Current Biology* 12: 1767–1772.

- Vasas, G., D. Szydlowska, A. Gáspár, M. Welker, M. Trojanowicz & Gy. Borbély (2006) Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 66: 87-97.
- Vassilakaki, M. & S. Pflugmacher (2008) Oxidative stress response of *Synechocystis* sp. (PCC 6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. *Journal of Applied Phycology* 20: 219-225.
- Visser, P. M., J. Fastner, J. S. Metcalf, G. A. Codd & L. R. Mur (2003) Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1475-1481.
- Wu, Y. H., J. T. Liu, L. Z. Yang, H. Chen, S. Q. Zhang, H. J. Zhao & N. M. Zhang (2011) Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. *Environmental Microbiology* 13: 604-615.
- Yamaguchi, M., T. Ogawa, K. Muramoto, M. Jimbo & H. Kamiya (2000) Effects of culture conditions on the expression level of lectin in *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium). *Fisheries Science* 66: 665-669.
- Yang, S. W. & X. C. Jin (2008) Critical light intensities for *Microcystis aeruginosa*, *Scenedesmus quadricauda* and *Cyclotella* sp and competitive growth patterns under different Light : N : P ratios. *Journal of Freshwater Ecology* 23: 387-396.
- Yang, Z., L. L. Geng, W. Wang & J. Zhang (2012) Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. *Biochemical Systematics and Ecology* 41: 130-135.
- Zar, J. H. (1996) *Biostatistical Analysis*, 3rd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Zhang, T. T., M. He, A. P. Wu & L. W. Nie (2009) Allelopathic effects of submerged macrophyte *Chara vulgaris* on toxic *Microcystis aeruginosa* Allelopathy *Journal* 23: 391-401.
- Zhang, X., H. Hu, Y. Men & K. S. Christoffersen (2010) The effect of *Poteroiochromonas* abundance on production of intra- and extracellular microcystin-LR concentration. *Hydrobiologia* 652: 237-246.
- Zilberg, B. (1966) Gastroenteritis in Salisbury European children- a five year study. *Central African Journal of Medicine* 12: 164-168.
- Zohary, T., J. Padisák & L. Naselli-Flores (2010) Phytoplankton in the physical environment: beyond nutrients, at the end, there is some light. *Hydrobiologia* 639: 261-269.

A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

Az értekezés témakörében megjelent, vagy közlésre elfogadott közlemények

- B-Béres, V.**, I. Grigorszky, G. Vasas, G. Borics, G. Várbíró, S. A. Nagy, Gy. Borbély & I. Bácsi (2012) The effects of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) in laboratory cultures: why these organisms do not coexist in steady-state assemblages. *Hydrobiologia* 691: 97-107. **IF:1,964**
- Bácsi, I., **V. B-Béres** & G. Vasas (2012) The possible roles of cyanotoxins in species interactions of phytoplankton assemblages. In: Ferrão Filho, A. S. (ed.) *Cyanobacteria: Toxicity, Ecology and Management*. Nova Science Publishers, Inc., New York. In press.
- Bácsi, I., T. Török, **V. B-Béres**, P. Török, B. Tóthmérész, A. S. Nagy & G. Vasas (2012) Laboratory and microcosm experiments testing the toxicity of chlorinated hydrocarbons on a cyanobacterium strain (*Synechococcus* PCC 6301) and on natural phytoplankton assemblages. *Hydrobiologia*. In press (Minor revision) **IF:1,964**
- Grigorszky, I., Gy. Dévai, K. T. Kiss, B. Tóthmérész, M. Gligora, A. Plenkovics-Moraj, K. Kraj, **V. B-Béres**, Cs. Schnitchen, G. Borics & S. A. Nagy (2010) Importance of acidic phosphatase activity in P supply and *Gonyostomum semen* Ehrenberg (Raphidophyta) occurrence in a hungarian peat bog, Keleméri Kis-Mohos (NE Hungary). *Acta Biologica Hungarica* 61: 111-121. **IF: 0,793**
- Bácsi I., **B-Béres V.**, Vasas G. (2009) Cianotoxinok, humán megbetegedések, hatásmechanizmus. *Magyar Epidemiológia* 4. (6) 269-284.

- B-Béres V.**, Bácsi I. & Borbély Gy. (2008) A *Microcystis aeruginosa* Kützig (Cyanobacterium) tenyészetek nyerskivonatának hatása a *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) tenyészetek növekedésére. Hidrológiai Közlöny 88: 21-23.
- Béres, V.**, I. Bácsi, Gy. Surányi, G. Vasas, M. M-Hamvas, Sz. Tóth, Cs. Máthé, K. T. Kiss, Gy. Borbély, Cs. Schnitchen & I. Grigorszky (2007) The interaction between *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa* Kützig (Cyanobacteria) species. Archive für Hydrobiologie Supplement 161. (3-4) 405-415. **IF: 1,409***
- Béres V.**, Bácsi I., Surányi Gy., Vasas G., M-Hamvas M., Tóth Sz., Máthé Cs., Borbély Gy., Grigorszky István (2007) A *Cryptomonas ovata*, Ehrenberg (Cryptophyta) és a *Microcystis aeruginosa*, Kützig (Cyanobacterium) interakciója. Hidrológiai Közlöny 87. (6) 55-57.
- Grigorszky, I., K.T. Kiss, **V. Béres**, I. Bácsi, M. M-Hamvas, Cs. Máthé, G. Vasas, J. Padisák, G. Borics, M. Gligora & Gy. Borbély (2006) The effects of temperature, nitrogen, and phosphorus on the encystment of *Peridinium cinctum*, Stein (Dinophyta). Hydrobiologia 563: 527-535. **IF: 1,049**
- Béres, V.**, I. Bácsi, I. Grigorszky, Cs. Schnitchen & Gy. Borbély (2004) Factors controlling the encystment a dinoflagellata species (*Peridinium cinctum*, Stein). Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie 29: 235-238.
- Béres V.**, Bácsi I., Schnitchen Cs., (2005) A *Peridinium cinctum* (Dinophyta) cisztaképzését befolyásoló tényezők. Hidrológiai Közlöny 85. (6) 20.-22.

Egyéb megjelent, vagy közlésre elfogadott közlemények

- Szilágyi Zs., **B-Béres V.**, Grigorszky I., Tóth B., Ács É. (2012) Bevonatlakó kovaalga vizsgálatok a Duna gödi szakaszán az áradásokkal tarkított 2010-es és a kiegyenlített vizjárású 2011-es évben. MHT XXX. Országos Vándorgyűlés. ISBN 978-963-8172-29-7, 1-16.
- B-Béres V.**, Kassai S. Vitál Z., Szabó G., Görgényi J., Gonda S., Nagy S.A., Tóthmérész B. & Bácsi I. (2011) A *Monoraphidium pusillum* (Chlorophyta) lipidtermelésének vizsgálata különböző nitrogén-ellátottságú tenyészetekben. Hidrológiai Közlöny 91: 18-21.
- Szabó G., **B-Béres V.**, Görgényi J., Vitál Z., Kassai S., Gonda S., Nagy S.A., Tóthmérész B. & Bácsi I. (2011) A cink hatása a *Monoraphidium pusillum* (Chlorophyta) növekedésére és morfológiájára. Hidrológiai Közlöny 91: 82-85.
- M-Hamvas M., Vasas G., Tomku E., Jámbrik K., Máthé Cs., Beyer D., **B. Béres V.**, Borbély Gy. (2009) Proteáz aktivitás kimutatása vízvirágzásokat okozó cianobaktérium fajokból Hidrológiai Közlöny 89. (6) 149-152.
- Grigorszky I., Borics G., Várbiro G., G. Budai T., **Béres V.**, Krasznai E., Schnitchen Cs. (2008) A nitrát és nitrit ion hatása az üledékből történő foszfor felszabadulásra két Körös-vidéki holtmederben. Hidrológiai Közlöny 88. (6) 61-63.
- Grigorszky I., Borics G., **Béres V.**, Farkas T. (2007) A savas foszfátáz aktivitás jelentősége egy tőzegmohalápnban. Hidrológiai Közlöny 87. (6) 41-44.
- Grigorszky, I., G. Borics, K.T. Kiss, Cs. Schnitchen, **V. Béres**, Gy. Borbély (2004) Seasonal variation of organic compounds in a eutrophic oxbowlake. Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie 29: 650-653.

Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

- B-Béres V.:** Allelopatikus kapcsolatok toxintermelő cianobaktérium (*Microcystis aeruginosa*) és egy nem toxikus eukarióta alga (*Cryptomonas ovata*) között. 8. Magyar Ökológus Kongresszus. 2009. augusztus 26-28. Szeged, Magyarország.
- B-Béres V.:** A *Cryptomonas ovata* és a *Microcystis aeruginosa* interakciós viszonyai. I. Doktorandusz Konferencia. 2009. március 26. Debrecen, Magyarország.
- B-Béres, V., I. Bácsi, Cs. Máthé, Cs. Schnitchen, S. A. Nagy, Gy. Borbély & I. Grigorszky:** Toxic Cyanobacteria and eucaryota algae interaction in cultures. 15th Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP). 2008. november 23-30. Ramot, Israel.
- Béres V. & Bácsi I.:** A *Microcystis aeruginosa*, Kützig (Cyanobacterium) tenyészetek nyerskivonatának hatása a *Cryptomonas ovata*, Ehrenberg (Cryptophyta) tenyészetek növekedésére. XLIX. Hidrobiológus Napok 2007. október 3-5. Tihany, Magyarország.
- Béres V., Bácsi I., Surányi Gy., Vasas G., M-Hamvas M., Tóth Sz., Máthé Cs., Borbély Gy. & Grigorszky I.:** A *Cryptomonas ovata*, Ehrenberg (Cryptophyta) és a *Microcystis aeruginosa*, Kützig (Cyanobacterium) interakciója. XLVIII. Hidrobiológus Napok 2006. október 4-6. Tihany, Magyarország.
- Béres, V., Bácsi I., Surányi Gy., Vasas G., M. M-Hamvas, Sz. Tóth, Cs. Máthé, K. T. Kiss, Gy. Borbély, Cs. Schnitchen & I. Grigorszky:** The interaction between *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa* Kützig (Cyanobacteria) species. 6th International Symposium on Use of Algae for Monitoring Rivers Congress. 2006. september 12-15. Balatonfüred, Hungary.
- Béres, V., I. Bácsi, I. Grigorszky, Cs. Schnitchen & Gy. Borbély:** Factors controlling the encystment a dinoflagellata species (*Peridinium cinctum*, Stein). XXIX SIL International Congress of Limnology. 2004. august 8-14. Lahti, Finland.
- Béres V., Bácsi I. & Schnitchen Cs.:** A *Peridinium cinctum* (Dinophyta) cisztaképzését befolyásoló tényezők. XLVI. Hidrobiológus Napok. 2004. október 6-8. Tihany, Magyarország.

Egyéb előadások és poszterek

- Szilágyi Zs., **B-Béres V.**, Grigorszky I., Tóth B., Ács É.: Bevonatlakó kovaalga vizsgálatok a Duna gödi szakaszán az áradásokkal tarkított 2010-es és a kiegyenlítettebb vízjárású 2011-es évben. MHT XXX. Országos Vándorgyűlés. 2012. július 4-6. Kaposvár, Magyarország.
- B-Béres, V., G. Szabó, Z. Novák, Z. Vitál & I. Bácsi:** The sensitivity of two *Monoraphidium* species to zinc: their possible role in bioremediation. The 16th Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP). 2011. august 21-28. S. Michele all'Adige, Italy.
- B-Béres V., Kassai S., Vitál Z., Szabó G., Görgényi J., Gonda S. & Bácsi I.:** A *Monoraphidium pusillum* (Chlorophyta) lipidtermelésének vizsgálata különböző nitrogén-ellátottságú tenyészetekben. LII. Hidrobiológus Napok. 2010. október 6-8. Tihany, Magyarország.
- Szabó G., **B-Béres V.**, Görgényi J., Vitál Z., Kassai S., Gonda S. & Bácsi I.: A cink hatása a *Monoraphidium pusillum* (Chlorophyta) növekedésére és morfológiájára. LII. Hidrobiológus Napok. 2010. október 6-8. Tihany, Magyarország.

- M-Hamvas M., Vasas G., Tomku E., Jámbrik K., Máthé Cs., Beyer D., **B-Béres V.** & Borbély Gy.: Proteáz aktivitás kimutatása vízvirágzásokat okozó cianobaktérium fajokból. L. Hidrobiológus Napok. 2008. október 1-3. Tihany, Magyarország.
- Grigorszky, I., Gy. Dévai, A. Tóth, Cs. Schnitchen, **V. Béres** & A.S. Nagy: The relationships among algae, zooplankton and fish stock levels in a small lowland reservoir. Fish Stock Assessment Methods for Lakes and Reservoirs: Towards the true picture of fish stock. 2007. september 11-15. Ceske Budejovice, Czech Republic.
- Grigorszky I., K.T. Kiss, Gy. Dévai, S. A. Nagy, G. Borics, M. Gligora, K. Kraj, A. Plenkovič, **V. Béres**, P. Owsiany & G. Várbró: The main characteristics of phytoplankton populations in the Hungarian section of the River Tisza in connection with WFD. Use of algae for monitoring rivers congress. 2006. september 12-16. Balatonfüred, Hungary.
- Grigorszky, I., G. Borics, K.T. Kiss, Cs. Schnitchen, **V. Béres** & Gy. Borbély: Seasonal variation of organic compounds in a eutrophic oxbowlake. XXIX SIL International Congress of Limnology. 2004. august 8-14. Lahti, Finland.
- Schnitchen, Cs., E. Magyari, D. Charman, I. Grigorszky, M. Braun, B. Tóthmérész, **V. Béres**: The reconstruction of hydrological changes in *Sphagnum* bogs by the use of testate amoebae (Rhizopoda: Testacea) in north Hungary. XXIX SIL International Congress of Limnology. 2004. august 8-14. Lahti, Finland.
- Grigorszky, I., Borics G., Kiss K.T., Schnitchen Cs., **Béres V.** & Borbély Gy.: Szerves anyag tartalom változása egy eutróf holtágban. XLVI. Hidrobiológus Napok. 2004. október 6-8. Tihany, Magyarország.