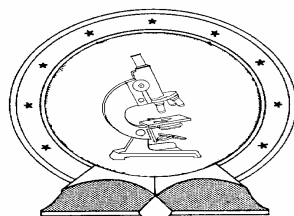


DE TTK



1949

**A *CRYPTOMONAS OVATA* EHRENBORG
(CRYPTOPHYTA) ÉS A *MICROCYSTIS AERUGINOSA*
KÜTZIG (CYANOBACTERIA) ALGATAXONOK
INTERAKCIÓS KAPCSOLATAI**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Bácsiné Béres Viktória

Témavezetők:

Dr. Grigorszky István

Prof. Dr. Borbély György

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2012.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola *Hidrobiológia* programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2012. szeptember 20.

.....
Bácsiné Béres Viktória

Tanúsítom, hogy Bácsiné Béres Viktória doktorjelölt 2006-2010 között a fent megnevezett Doktori Iskola *Hidrobiológia* programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2012. szeptember 20.

.....
Dr. Borbély György

Tanúsítom, hogy Bácsiné Béres Viktória doktorjelölt 2006-2010 között a fent megnevezett Doktori Iskola *Hidrobiológia* programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2012. szeptember 20.

.....
Dr. Grigorszky István

**A CRYPTOMONAS OVATA EHRENBERG
(CRYPTOPHYTA) ÉS A MICROCYSTIS AERUGINOSA
KÜTZIG (CYANOBACTERIA) ALGATAXONOK
INTERAKCIÓS KAPCSOLATAI**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
Környezettudomány tudományágban

Írta: *Bácsiné Béres Viktória* okleveles biológus/ökológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
(Hidrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Borbély György, Dr. Grigorszky István

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Szabó József	
tagok: Dr. Karaffa Levente	
Dr. Ács Éva	

A doktori szigorlat időpontja: 2011. április 8.

Az értekezés bírálói:

Dr.	
Dr.	
Dr.	

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.	
tagok: Dr.	
Dr.	
Dr.	
Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 20..... .

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	1
1.1. Bevezetés	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. Fitoplankton populációk egyedszám-növekedésének jellemzői	5
2.1.1. Növekedési ráta	5
2.1.2. Interakciós kapcsolatok fitoplankton fajok populációi között	6
2.1.2.1. Fitoplankton populációk közti kompetíció	7
2.1.2.2. Allelopátia és/vagy toxicitás fitoplankton együttesekben	9
2.2. A <i>Microcystis aeruginosa</i> és interakciós kapcsolatai	10
2.2.1. A <i>M. aeruginosa</i> faj bemutatása	10
2.2.2. A mikrocisztinek és egyéb bioaktív vegyületek	11
2.3. A Cryptophyta taxon és interakciós kapcsolatai	24
2.3.1. A <i>Cryptomonas ovata</i> faj ismertetése	24
2.3.2. A Cryptophyta taxon inetarakciós kapcsolatai	25
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	27
3.1. A kísérletek során használt <i>Cryptomonas ovata</i> és <i>Microcystis aeruginosa</i> törzsek, nevelési körülmények	27
3.2. Kevert tenyészetek (<i>C. ovata</i> és <i>M. aeruginosa</i> sejtek együttnevelése	28
3.2.1. Egységnyi sejtszámú <i>C. ovata</i> együtt nevelése különböző sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> -val	28
3.2.2. Egységnyi sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> együttnevelése különböző sejtszámú <i>C. ovata</i> -val	30
3.3. Sejtkivonattal kezelt tenyészetek	31
3.3.1. <i>C. ovata</i> tenyészetek kezelése <i>M. aeruginosa</i> kivonattal	31
3.3.2. <i>M. aeruginosa</i> tenyészetek kezelése <i>C. ovata</i> kivonattal	32
3.3.3. <i>M. aeruginosa</i> tenyészetek kezelése <i>M. aeruginosa</i> kivonattal	33
3.4. A <i>M. aeruginosa</i> tisztított toxinjával kezelt tenyészetek	34
3.4.1. A <i>C. ovata</i> tenyészetek kezelése MC-LR-rel	34
3.4.2. Toxikológiai teszt	34
3.5. A sejtkivonatok elkészítése, a MC-LR tisztítása és mérése	34
3.5.1. A <i>M. aeruginosa</i> kivonat elkészítése	34
3.5.2. A <i>C. ovata</i> kivonat elkészítése	35
3.5.3. A MC-LR tisztítása és a tenyészetek toxintartalmának mérése	35
3.6. A nitrát-meghatározás menete	36
3.7. Statisztikai elemzés	37
4. EREDMÉNYEK	38
4.1. Kevert tenyészetek	38
4.1.1. Egységnyi sejtszámú <i>C. ovata</i> együtt nevelése különböző sejt-	

számú <i>M. aeruginosa</i> -val	38
4.1.1.1. A <i>C. ovata</i> sejtszámának változása	38
4.1.1.2. A <i>M. aeruginosa</i> sejtszámának változása	39
4.1.2. Egységnyi sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> együtt nevelése különböző sejtszámú <i>C. ovata</i> -val	43
4.1.2.1. A <i>C. ovata</i> sejtszámának változása	43
4.1.2.2. A <i>M. aeruginosa</i> sejtszámának változása	45
4.2. Sejt kivonatokkal kezelt tenyészetek	47
4.2.1. Egységnyi sejtszámú <i>C. ovata</i> tenyészetek kezelése különböző mennyiségű <i>M. aeruginosa</i> kivonattal	47
4.2.2. <i>M. aeruginosa</i> tenyészetek kezelése <i>C. ovata</i> sejt kivonattal	49
4.2.2.1. Különböző inokulálási sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> tenyész- etek kezelése egységnyi mennyiségű <i>C. ovata</i> kivonattal	49
4.2.2.2. Egységnyi inokulálási sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> tenyész- etek kezelése különböző mennyiségű <i>C. ovata</i> kivonattal	51
4.2.3. Egységnyi sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> tenyészetek kezelése kü- lönöző mennyiségű <i>M. aeruginosa</i> kivonattal	52
4.3. A <i>M. aeruginosa</i> tisztított toxinjával kezelt tenyészetek	54
4.3.1. <i>C. ovata</i> tenyészetek kezelése MC-LR-rel	54
4.3.2. A toxikológiai teszt eredményei	55
5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	57
5.1. Kevert tenyészetek	57
5.1.1. Egységnyi sejtszámú <i>C. ovata</i> együtt nevelése különböző sejt- számú <i>M. aeruginosa</i> -val	57
5.1.2. Egységnyi sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> együtt nevelése különböző sejtszámú <i>C. ovata</i> -val	60
5.2. Sejt kivonatokkal kezelt tenyészetek	62
5.2.1. Egységnyi sejtszámú <i>C. ovata</i> tenyészetek kezelése különböző mennyiségű <i>M. aeruginosa</i> kivonattal	62
5.2.2. <i>M. aeruginosa</i> tenyészetek kezelése <i>C. ovata</i> kivonattal	63
5.2.2.1. Különböző inokulálási sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> tenyész- etek kezelése egységnyi mennyiségű <i>C. ovata</i> kivonattal	63
5.2.2.2. Egységnyi inokulálási sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> tenyész- etek kezelése különböző mennyiségű <i>C. ovata</i> kivonattal	64
5.2.3. Egységnyi sejtszámú <i>M. aeruginosa</i> tenyészetek kezelése kü- lönöző mennyiségű <i>M. aeruginosa</i> kivonattal	65
5.3. A <i>M. aeruginosa</i> tisztított toxinjával kezelt tenyészetek	66
6. ÖSSZEFOGLALÁS	72
7. SUMMARY	77
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	81
9. IRODALOMJEGYZÉK	82
10. MELLÉKLETEK	98

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, mint predáció, allelopátia, stb.) tényező befolyásolhatja (Cloern 1976, 1978). Adott víztérben szezonálisan és napszakosan is változik az ott élő algák fajszáma, és az ott lévő fajok egyedszáma (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 (Sukénik et al. 2002, Hedger et al. 2004).

A taxonok közti interakciós kapcsolatok már régóta az érdeklődés középpontjában állnak (Keating 1978). A fitoplanktont alkotó fajok interakciós kapcsolatainak jellemzéséhez általában a különböző taxonok populációinak tér-, és időbeli változásait vizsgálják (biomassza, egyedszám, klorofill-tartalom, fehérje-tartalom mérése; Keating 1978, Wiegand és Pflugmacher 2005).

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), zooplanktont alkotó fajok (*Cladocera* sp.) (Okumura et al. 2007), valamint különböző béka és halfajok (Oberemm et al. 1999) voltak. A cianobakteriális „teljes sejtkivonatokat” 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 kezelésekhez 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 sejtszámarány-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. 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?

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Fitoplankton populációk egyedszám-növekedésének jellemzői

2.1.1. Növekedési ráta

Az egyes fajok populációinak egyedszám-változását számos abiotikus és biotikus tényező befolyásolja. Egy-egy faj populációjának egyedszám-változására koncentrálna, kiiktatva más fajok populációinak jelenlétét az adott környezetben, a leggyakrabban vizsgált tényezők a születési (nettó növekedési) -, és halálozási (csökkenési) ráta, valamint a környezet eltartóképessége.

Ideális esetben a bruttó növekedés (μ), és a nettó növekedés (k) közel megegyezik egymással:

$$k = \mu$$

Természetes körülmények között a populációk nettó növekedési rátája (k) nem egyezik a bruttó növekedési rátával (μ), annál kisebb:

$$k = \mu - \lambda$$

ahol λ a csökkenési ráta.

A bruttó és a nettó növekedési ráta és az idő közti lineáris összefüggést a következő egyenlettel lehet leírni:

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

ahol N_1 a populáció biomasszája t_1 időpontban, N_2 pedig a populáció biomasszája t_2 időpontban. A fitoplankton ökológiájával foglalkozó tudományterületen konvencionálisan 1 napot tekintenek egységnyi időnek, ezért a k értéke is 1 napra vonatkozik (Padisák 2003).

A különböző alga-fajok egyedszám-változásának pontosabb megértése érdekében a terepi (Cloern 1976, Sommer 1982, Dokulil és Padisák 1994, Ács et al. 2003, 2008, Grigorszky et al. 2003, Buric et al. 2007, Gross et al. 2007) megfigyelések mellett laboratóriumi, kontrollált körülmények közt zajló vizsgálatokat is végeztek (Cloern 1978, Reynolds 1984, Fahnenstiel et al. 1991, Vörös 1995, Rengefors és Legrand 2001, Suikkanen et al. 2004, Tillmann et al. 2008). A vizsgált fajok túlnyomó többségénél, a vártak megfelelően, a laboratóriumi körülmények közt (optimális tápoldatban, optimális hőmérsékleten,

fényintenzitáson, ragadozók és kompetitorok kizárásával) nevelt populációk növekedési rátája magasabb volt a terepen mért értékeknél. Néhány faj terepen mért növekedési rátája megközelíti a laboratóriumi tenyészetek növekedési rátáját (*Cryptomonas*, *Ceratium*; lásd 1. táblázat).

1. táblázat. Különböző fajok - többek között az általunk vizsgált *M. aeruginosa* és a *C. ovata* populációk (kiemelt értékek) - növekedési rátája k (nap^{-1}) laboratóriumi (k_{lab}) és terepi (k_{terepi}) körülmények között (Padisák 2003).

Fajnév	k_{lab}	Hivatkozás	k_{terepi}	Hivatkozás
<i>Microcystis aeruginosa</i> (kolónia)	0,48	Reynolds (1984)	0,37	Padisák (1994)
<i>Synechococcus sp.</i>	1,5	Fahnenstiel et. al (1991)	0,42	Fahnenstiel et. al (1991)
<i>Anabaena flos-aque</i>	0,78	Reynolds (1984)	0,41	Sommer (1981)
<i>Aphanizomenon flos- aque</i>	0,98	Reynolds (1984)	0,43	Sommer (1981)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	1,6	Vörös (1995)	0,23	Padisák (1994)
<i>Cryptomonas ovata</i>	0,81	Reynolds (1984)	0,89	Sommer (1981)
<i>Cryptomonas erosa</i>	0,83	Reynolds (1984)	0,48	Sommer (1981)
<i>Ceratium hirundinella</i>	0,21- 0,27	Reynolds (1984)	0,14- 0,24	Padisák (1985)
<i>Peridinium cinctum</i>	0,22	Reynolds (1984)	0,1	Sommer (1981)

2.1.2. Interakciós kapcsolatok fitoplankton fajok populációi között

A populációk természetes környezetükben nem egyedül élnek, hanem más populációkkal együtt, melyek már jelenlétükkel, élettani folyamataikkal, táplálkozási szokásaikkal, extrahált vegyületeikkel, és számos más módon jelentős mértékben befolyásolják más populációk életben-maradását, növekedését. Vagyis az egyes populációk, a környezet fizikai-kémiai tulajdonságai mellett, fontos környezeti faktorai is egymásnak. Általában a populációk közti kölcsönhatások központi

elve a „táplálkozni és tápláléknak lenni”. Azonban a populációk közti kölcsönhatások egy másik jelentős formája az, mikor a vizsgált populációk egyazon erőforrást hasznosítanak; ez a kompetíció (Sommer 1994, Padisák 2003, Reynolds 2006).

A fitoplankton tagjai közötti interakciós kapcsolatok lehetséges formáit az alábbi táblázatban foglaljuk össze (2. táblázat).

2. táblázat A fitoplankton taxonok közti lehetséges interakciós kapcsolatok (Sommer 1994 alapján)

Kölcsönhatás típusa	+	-	0
+	Ekto-, endoszimbiózis	Átmenet az allelópátia és a préda- áldozat kapcsolat között	Kommenzalizmus
-	Ld. előbb	Kompetíció, allelópátia	–

2.1.2.1. Fitoplankton populációk közti kompetíció

A kompetíció az ökológiai feltételekért (pl. az ásványi tápanyagokért, a prédáért, a fényért) folyó versengés. Eredménye legtöbbször a populációs létszám (az. ún. demográfiai viszonyok) alakulásán mérhető le. Két populáció együttélése vagy az egyik populáció másik általi kiszorítása a két populáció egymásra hatásának mértékétől és a környezet eltartóképességétől függ.

Az egyszerűbb kompetíciós modellek azt sugallják, hogy azon fitoplankton taxonok száma, melyek egy adott víztérben együtt élhetnek, nem lehet nagyobb, mint az együttélést limitáló faktorok (pl. tápanyag, fény, stb.) száma. Elsődleges tehát adott időben, adott helyen együtt élő fajok száma az ott található limitáló faktorok számától függ. A Hardin-féle kompetitív kizárás elve alapján a fitoplankton közösség maximálisan 5 fajból állhat (Hardin 1960). Ezen elv kísérletes bizonyítását Tilman végezte el 1982-ben. Vizsgálatai során megállapította, hogyha különböző fajok ugyanazon erőforrást használnak, akkor, figyelmen kívül hagyva a kezdeti növekedési rátát és konstansnak tekintve a csökkenési rátát, az adott forrás iránt legnagyobb

affinitással rendelkező faj a többi fajjal szemben kompetíciós előnyben lesz és felül fog emelkedni rajtuk.

Hutchinson azonban már 1961-ben rámutatott arra, hogy sokkal több plankton faj él együtt, mint azt az előbb említett modellek alapján feltételezni lehetne (plankton-paradoxon). Ennek egyik legfontosabb oka, hogy a plankton-közösségek nem-equilibrium állapotban vannak. A nem-equilibrium állapot egyik magyarázata a környezeti feltételekben keresendő: az évszakok, ill. a kevésbé megjósolható faktorok (időjárás) változása (Padisák et al. 1993).

Általánosságban elmondható, hogy külső zavarás hiányában a szukcesszió egy stabil állapot kialakulásához vezet, amelyben a legtöbb fajt kompetíciósan kiszorítja egy, vagy néhány domináns faj (Reynolds et al. 1993). A kutatások eredményei azt mutatják, hogy állandó környezeti feltételek mellett maximálisan 4 fajból álló közösség esetén alakulhat ki stabil állapot, abban az esetben, ha az egyik faj kompetíciósan kiszorítja a másik három fajt (Scheffer 1991). Laboratóriumi kísérletek eredményei szerint a külső környezeti tényezők teljes kizárása esetén is a több, mint négy fajból álló plankton-eggyüttesek változó fluktuációt mutatnak és a közösség évekig diverz maradhat (Kersting 1985). Öt, vagy több fitoplankton fajból álló közösség viselkedése más zavaró tényezők, pl. zooplankton fajok kizárása esetén is kaotikus lesz (Scheffer et al. 2003). Több, mint valószínű, hogy ez a komplex dinamika a fajok között interakció eredménye, amely „determinisztikus káosz”-ként definiálható (Scheffer 1991). A plankton közösség dinamikája könnyen kaotikussá válik, ha a több fajból álló közösségben legalább három limitáló tápanyagért zajlik versengés (Huisman és Weissing 1994, 1999, 2001).

Abban az esetben, ha két faj verseng két limitált erőforrásért, akkor 3 lehetséges végkifejlet lehet, feltételezve, hogy X faj affinitása nagyobb az A erőforrásért, mint a B erőforrásért; az Y faj affinitása pedig a B erőforrásért nagyobb, mint az A erőforrásért (Tilman 1982).

- Az X faj fog felülemelkedni az Y fajon akkor, ha az Y faj affinitása megnő az A erőforrásért, de alatta marad az X faj affinitásának.
- Az Y faj fog felülemelkedni az X fajon, ha az X faj affinitása megnő a B erőforrásért, de alatta marad az Y faj affinitásának.
- Abban az esetben, ha az A erőforrás mennyisége egy az Y faj küszöbértékénél magasabb szinten állandósul; ezzel párhuzamosan

a B erőforrás koncentrációja az X faj küszöbértékénél magasabb szinten állandósul, akkor a két faj adott helyen adott időben egymás „felülkompenzálása” nélkül fog együtt élni. Az Y faj nagyobb mértékű elszaporodását az A erőforrás fogja megakadályozni, míg az X fajét a B erőforrás.

Azonban két, vagy több fajból álló közösségek esetében a limitáló forrásokon túlmenően más tényezők is befolyásolhatják az egyes fajok sikerességét, pl. az allelopátia és/vagy toxicitás.

2.1.2.2. Allelopátia és/vagy toxicitás fitoplankton együttesekben

A kompetíció másik lehetséges formája az, mikor a populációk közt kölcsönös, vagy egyoldalú direkt negatív hatás érvényesül. Ezt a direkt negatív hatást okozhatja az egyik populáció által termelt kémiai vegyület (allelopátia) vagy lehet direkt mechanikai hatás is a populációk között (Sommer 1994).

Az allelopátia az algák esetében változatos ökológiai/fiziológiai jelenség. Az algák által termelt vegyületek hatással lehetnek más algákra a termelő szervezet környezetében, magára a termelő szervezetre (autotoxicitás), az algákkal közösségben élő heterotróf mikroorganizmusokra, hajtásos növényekre, az algákkal táplálkozó gerinctelenekre, vagy akár gerincesekre – bár ez utóbbi esetek tárgyalása már a toxikológia tárgykörébe vezet át (Inderjit és Dakshini 1994).

Egyes kutatók szerint a kémiai interakciók, különösen az allelopátia, igen fontos szerepet játszanak a fitoplankton fajok közötti kompetícióban. Mások szigorúbban fogalmazznak: feltételezhető, hogy tavakban a fitoplankton taxonok közötti allelopátia fontos szerepet játszik a közösség szerkezetének alakulásában, a vízvirágzások dinamikájának szabályozásában (Keating 1977, Vardi et al. 2002, Takamo et al. 2003). Vízfolyásokban az allelopátia jelentősége a fitoplankton közösségekben minden bizonnyal kisebb, de a bentikus közösségek életében itt is fontos szerepet játszhat (Leflaive és Ten-Hage 2007). Legrand és munkatársai (2003) allelopátia alatt az egyik faj által termelt másodlagos anyagcseretermékek gátló hatását értik a másik faj növekedésére, vagy fiziológiai folyamataira. Leflaive és Ten-Hage (2007) szerint az allelopátia másodlagos anyagcseretermékek gátló hatása a termelő szervezet kompetítoraira vagy ragadozóira.

A toxinok, melyek szintén másodlagos anyagszertermékek, mérgezőek a termelő szervezettel közvetlen kapcsolatban nem álló organizmusokra is. A két fogalom nem zárja ki egymást – a szélesebb hatásspektrumú toxinok között is találunk allelokemikáliákat. A két csoport közötti – nem határozottan megállapítható – különbség általánosságban a következőkben foglalható össze: Az allelokemikáliák termelése nem taxonhoz kötött, míg toxintermeléssel édesvizekben elsősorban a cianobaktériumok körében találkozunk. Az allelokemikáliák hatásmechanizmusa igen változatos, míg a toxinok elsősorban enzim inhibitorok, vagy membránreceptorokhoz kötődnek. Az allelokemikáliák ökológiai szerepe az esetek többségében világos, míg a toxinok esetében ez a kérdés még nem tisztázott (Leflaive és Tenhage 2007).

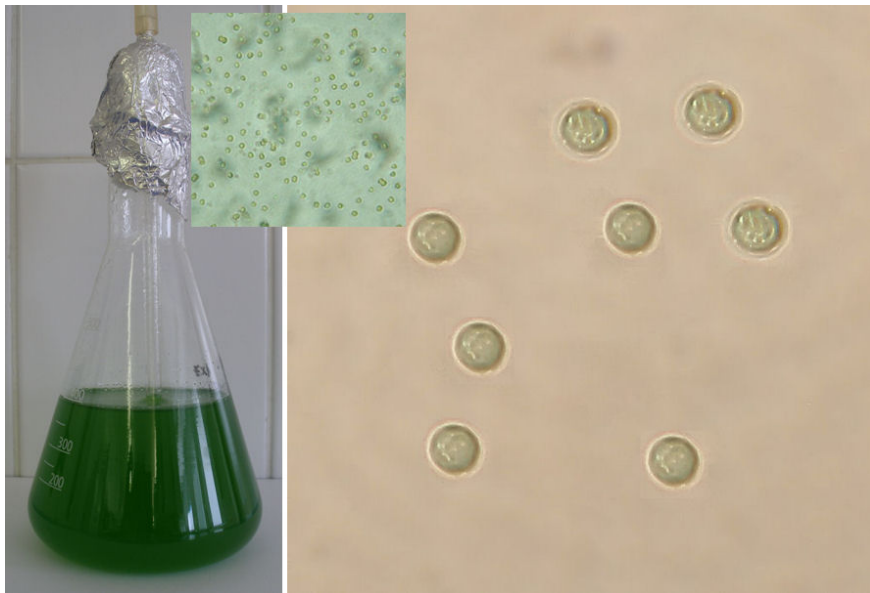
Sok megközelítési lehetőség van az allelopátia tanulmányozására, ezidáig nem született standard módszer. Az egyik módszer szerint egy donor alga sejtmentes kivonatát adják egy másik alga tenyésztéséhez. Frakcionált exudátumok, vagy tisztított allelokemikáliák alkalmazásával konkrétabb hatásvizsgálatokra van lehetőség (Legrand et al. 2003). A legtöbb allelokemikáliát cianobaktériumokból írták le, de néhány tengeri dinoflagelláta toxinja és számos cianotoxin is rendelkezik allelopatikus aktivitással. Az allelokemikáliák hatásmechanizmusa rendkívül változatos, leggyakrabban sejtlízist vagy a növekedés (osztódás) gátlását okozzák (Legrand et al. 2003).

2.2. A *Microcystis aeruginosa* és interakciós kapcsolatai

2.2.1. A *M. aeruginosa* faj bemutatása

Az *M. aeruginosa* a Chroococcales rendbe, azon belül is a Microcystaceae családba tartozó cianobaktérium faj. A Microcystaceae családba sorolt cianobaktériumok kolóniaképző élőlények; a nyálkás kolónia alakja lehet szabályos, vagy szabálytalan. Általánosan jellemző, hogy kocsonyás burok boríthatja az egyes sejteket is, azonban a *Microcystis* nemzetségbe tartozó sejteknek nincs külön kocsonyás burka, a kolóniát övező nyálkás hártya szintelen. A kolónia bizonyos, fajra jellemző sejtszám fölött kettéhasad (Komárek 1999).

A *M. aeruginosa* kolóniák mikroszkopikusak, vagy makroszkopikusak (elérhetik a 600-900 μm -t, vagy akár a 8 mm-t is) többé-kevésbé gömbölyűek, lencseszerűek, vagy enyhén hosszúkásak. A sejtek gömbölyűek, osztódás előtt azonban enyhén hosszúkásak. A színük kékes-zöld, a sejtekben gázvakuólum található. Megtalálhatók édes-, valamint brakk vizekben, a víztestek eutróf zónájában a fitoplankton részét képezik, kozmopoliták (Komárek 1999). Tenyészetben gyakran eltűnik a kolóniás szerveződés, és a sejtek magányosan fordulnak elő, ahogyan ez a kísérletekhez alkalmazott izolátum esetén is megfigyelhető.



1. ábra. a.) *Microcystis aeruginosa* tenyészet, b.-c.) *M. aeruginosa* sejtek.

2.2.2. A mikrocisztinek és egyéb bioaktív vegyületek

Mindenekelőtt érdemes tisztázni, mit értünk a következő fogalmak alatt: bioaktív vegyületek, allelokemikáliák és toxinok.

- A bioaktív vegyületek biológiai hatásai rendkívül széleskörűek: többek között antibakteriális, antivirális, immunszuppresszáns,

rákellenes és gyulladáscsökkentő vegyületek tartoznak ide (Mundt et al. 2001, Jaiswal et al. 2008).

- Ahogy a 2.1.2.2. fejezetben olvasható, az allelokemikáliák olyan másodlagos anyagcseretermékek, amelyek gátló hatást fejtenek ki az azt termelő szervezet környezetében élő más taxonok (pl. kompetítorok, ragadozók) életfolyamataira (Legrand et al. 2003, Leflaive és Ten-Hage 2007). Az allelokemikáliák termelése nem taxonhoz kötött, hatásmechanizmusuk igen változatos, ökológiai szerepük az esetek többségében világos (Leflaive és Ten-Hage 2007).

- A toxinok, melyek szintén másodlagos anyagcseretermékek, mérgezőek a termelő szervezettel közvetlen kapcsolatban nem álló organizmusokra is. Toxintermeléssel édesvizekben elsősorban a cianobaktériumok körében találkozunk (3. táblázat). A toxinok elsősorban enzim inhibitorok, vagy membránreceptorokhoz kötődnek, ökológiai szerepük nem tisztázott (Leflaive és Ten-Hage 2007).

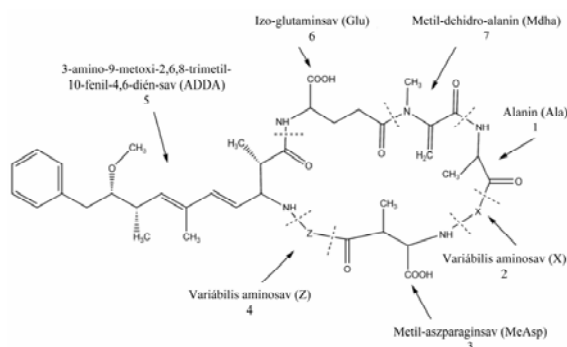
3. táblázat Az egyes cianobaktérium genuszok körében leggyakrabban előforduló cianotoxinok és azok hatásai (Ferraio-Filho és Kozlowsky-Suzuki 2011 nyomán).

Toxin	Hatás	Molekula típusa	Termelő szervezet
Mikrocisztinek	Protein foszfatázok (PP1 és PP2A) gátlása	Ciklikus peptid	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Planktothrix</i>
Nodularinok	Protein foszfatázok (PP1 és PP2A) gátlása	Ciklikus peptid	<i>Nodularia</i>
Saxitoxinok	Az idegsejtek nátrium-csatornáinak blokkolása	Alkaloid	Dinoflagelláták: <i>Protogonyaulax</i> <i>Alexandrium</i> <i>Gymnodinium</i> <i>Pyrodinium</i> Cianobaktériumok: <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i>
Anatoxinok	Irreverzibilis kapcsolódás a nikotínerg acetilkolin-receptorokhoz.	Alkaloid	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Microcystis</i>

Toxin	Hatás	Molekula típusa	Termelő szervezet
Anatoxin-a(s)	Az acetilkolin-észteráz aktivitás gátlása	Alkaloid	<i>Anabaena</i>
Cilindrospermopszin	A fehérjeszintézis gátlása, a DNS irreverzibilis károsítása	Alkaloid	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Anabaena</i>
Lipopoliszacharidok	Irritáló hatás, gyulladásos tünetek az érintett szöveteken	Lipopoliszacharidok	A cianobaktériumok sejtfalának alkotórészei

A *Microcystis aeruginosa*, és általában a *Microcystis* fajok interakciós kapcsolatainak tárgyalásánál elkerülhetetlen említést tenni arról, hogy a genuszba tartozó fajok jó része számos biológiailag aktív vegyületet termel. Ezek közül legismertebbek, és talán a legalaposabban kutatott cianobakteriális bioaktív vegyületek a mikrocisztinek.

A mikrocisztinek hepatotoxikus ciklikus peptidek; a nodularinokkal rokon vegyületek. Molekulatömegük ~800-1000 Da, hét aminosavból állnak. Felépítésükben nemcsak L- és D aminosavak, hanem ritka aminosav-származékok is részt vesznek (Chorus és Bartram 1999). Napjainkig 60-80 mikrocisztin variáns szerkezetét azonosították. Ez a rendkívüli szerkezeti változatosság annak köszönhető, hogy a 2-es (X) és a 4-es (Z) pozícióban többféle aminosav szerepelhet, valamint a másik 5 aminosavnak is többféle szerkezeti variánsa lehet jelen a molekulában (Lawton és Edwards 2001). A 2. ábrán a mikrocisztinek általános szerkezete látható, 60 mikrocisztin variáns szerkezetét és molekulatömeg adatait pedig a 4. táblázat foglalja össze (Lawton és Edwards 2001, Sharma et al. 2012).



2. ábra A mikrocisztinek általános szerkezete (Sharma et al. 2012 nyomán).

4. táblázat 60 ismert mikrocisztin szerkezete a molekulatömegek feltüntetésével, illetve a dolgozatban alkalmazott *M. aeruginosa* törzs által termelt mikrocisztin variánsok kiemelésével. A Z variábilis aminosavak alatt az adott mikrocisztin variánsban jelen lévő aminosav változatok is fel vannak tüntetve. Rövidítések és egyéb jelölések: Ala: Alanin; Arg: Arginin; Glu: Glutaminsav; Leu: Leucin; Phe: Fenilalanin; Try: Triptofán; Tyr: Tirozin; Val: Valin; (A; R; E; L; F; W; Y; V): az adott aminosavat adott pozícióban tartalmazó mikrocisztin variáns elnevezésénél használt betűjelzések; ^h: az adott betűvel jelzett aminosav homo variánsa; t: tetrahidrotirozin; ADMAdda: *O*-Acetyl-*O*-demetil-Adda; DMAdda: *O*-demetil-Adda; (6Z)-Adda: az Adda sztereoizomere a D-kettős kötésnél; Dha: dehidroalanin; Dhb: dehidrobutirin; MeSer: *N*-metilszerin; a felső indexben feltüntetett számok az adott aminosav molekulában elfoglalt pozícióját jelölik (Lawton és Edwards 2001 nyomán).

Z variábilis aminosav X →	Ala (A)	Arg (R)	Glu (E)	Glutaminsav- metilészter	Homo-izoleucin	Leu (L)	Methionin-S- oxid	Phe (F)	Try (W)	Tyr (Y)	Val (V)
Ala (A)						909				959 (MCY-YA)	
Aminoisovalinsav						923					
Arg (R)	952	1037 (MCY-RR)			1008	994 (MCY-LR)	1028	1028	1067	1044, 1048 ^h , 1058 ^{hY} (MCY-YR)	
D-Asp ³ , Dha ⁷		1009				966				1062 ^{hY}	
D-Asp ³		1023				980					
Dha ⁷		1073				980		1014, 1078 ^{hF}			
L-Ser ⁷		1041				998					
DMAdda ⁵						980					
D-Asp ³ , D-Glu(OCH ₃) ⁶						994					
(6Z)-Adda ⁵		1037				994					
D-Asp ³ , ADMAdda ⁵						1008, 1028 ^{hE}					
D-Glu(OCH ₃) ⁶						1008					
D-Asp ³ , ADMAdda ⁵ , Dhb ⁷		1052				1009				1073 ^{hY}	
L-MeSer ⁷						1012					
D-Asp ³ , L-MeSer ⁷		1041									
ADMAdda ⁵						1022, 1036 ^{hR}					
D-Ser ⁷ , ADMAdda ⁵						1038					
D-Glu-OC ₂ H ₄ (CH ₃)OH ⁶						1052					
ADMAdda ⁵ , MeSer ⁷						1040					
N-Metillanionin						1115					
Glutaminsav-metilészter											
D-Asp ³ , Dha ⁷			969	983							
Dha ⁷			983	997							
L-Ser ⁷			1001	1015							
D-Asp ³ , Ser ⁷				1001							
Leu (L)						951					
Methionin S-oxid										1035	
Phe (F)						985					971
Try (W)						1024					
Tyr (Y)						1001					

A mikrocisztinek vízzoldhatók, ebből kifolyólag nem képesek közvetlenül áthatolni a sejtmembránon (néhány hidrofób csoportban igen gazdag mikrocisztin izomer kivételével). A sejtekbe való bejutásukat olyan transzporterek végzik, melyek egyébként esszenciális vegyületek szállításában vesznek részt. A mikrocisztinek toxicitásának alapja, hogy erősen képesek kötődni a protein-foszfatazokhoz, vagyis protein-foszfataz inhibitorok (Chorus és Bartram 1999).

A mikrocisztinek a környezetbe jövarészt csak a sejtek lízise után kerülnek ki, aktív kiválasztásuk csak ritkán fordul elő. A növekedés logaritmikus fázisában a tenyészetek extracelluláris toxinmennyisége csupán a teljes toxin-tartalom 0,8-10, de maximum 20%-a (Sivonen és Jones 1999, Ha et al. 2009, Zhang et al. 2010). A természetben,

vízvirágzás kezdetekor az extracelluláris toxinmennyiség csupán 0,0001-0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ez az érték azonban a vízvirágzás összeomlásakor elérheti a 3-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ értéket is (Lindholm és Meriluoto 1991, Jones és Orr 1994). Ezeknek a vegyületeknek a kémiai stabilitása igen nagy, semleges pH-n extrém módon képesek ellenállni a hidrolízisnek és az oxidációnak. Természetes vizekben hónapokig, vagy évekig is jelen lehetnek. Erős napfényen lassan fotodegradálódnak, ehhez azonban vízzoldható pigmentek, fikobiliproteinek jelenlétére van szükség. Ilyen körülmények között a mikrocisztinek 90%-a 2-6 hét alatt elbomlik (Chorus és Bartram 1999).

A mikrocisztineken túl további fontos biológiailag aktív anyagcseretermékek még a következők: aeruginozinok, mikrogininek, anabaenopeptinek, cianopeptolinok, ciklamidok, mikroviridinek, critoficinek és egyéb vegyületek (Welker és von Döhren 2006). Ezen anyagcseretermékek pontos biológiai szerepe, termelésük oka nem teljesen tisztázott, hosszú ideje vita tárgyát képezi. Allelopatikus szerepük nem egyértelműen bizonyított, ennek legfőbb oka, hogy míg egyes törzseknél aktív kibocsátás figyelhető meg a növekedés exponenciális fázisában, addig más esetekben nem mérhető a bioaktív anyagok extracelluláris jelenléte, csak a populáció összeomlásakor, a sejtek szétesése során (Welker és von Döhren 2006).

A mikrocisztinokkal kapcsolatban – mint ahogy azt az alábbiakban látni fogjuk – több elmélet látott napvilágot funkciójukat illetően, szerepük azonban a fitoplankton együttesek fajösszetételének kialakulásában, szabályozásában nem tisztázott. Ezért fontos minden olyan laboratóriumi és/vagy terepi vizsgálat, amely segíthet a vegyületcsoport szerepének megértésében.

Keating már 1978-ban kimutatta, hogy a mikrocisztinek gátolják bizonyos eukarióta algák (*Chlamydomonas* spp., *Haematococcus* spp., *Navicula* spp. és *Cryptomonas* spp.) növekedését. Azóta több laboratóriumi cianobaktérium és eukarióta alga törzs esetében vizsgálták különböző mikrocisztin variánsok hatását.

Zöldalgák

Nagyszámú eredmény létezik arra vonatkozóan, hogy a mikrocisztinek gátolják a zöldalgák növekedését, életműködéseit. Escoubas és munkatársai (1995) a *Dunaliella tertiolecta* zöldalga klorofilltermelésének gátlását írták le MC-LR-rel való kezelés hatására.

Christoffersen (1996) a *Nephroselmis olivacea* zöldalga növekedésének enyhe gátlását figyelte meg MC-LR kezelés hatására. MC-RR kezelés a *Chroococcus minutus* zöldalga gátlását vagy stimulációját is kiválthatja a fényintenzitástól függő módon. A *Coelastrum microporum* esetén a növekedés gátlása volt megfigyelhető, de csak magasabb koncentrációban (Sedmak és Kosi 1998). Pietsch és munkatársai (2001) a peroxidáz és a glutation szintetáz aktivitás emelkedését írták le tisztított MC-LR-rel kezelt *Scenedesmus armatus* tenyészetekben. A sejtmentes kivonat gátolta a glutation szintetázt és a fotoszintézist. Kearns és Hunter a *Chlamydomonas reinhardtii* tenyészet növekedésének gátlását, valamint a sejtek paralízisét figyelték meg MC-kezelést tartalmazó kivonaton, illetve tisztított MC-LR-rel való kezelés hatására (Kearns és Hunter 2000, 2001). *Scenedesmus quadricauda* zöldalga esetében azt figyelték meg, hogy minél nagyobb volt a sejtek száma a tenyészetben, a 4 sejtből álló cönóbiumok laza aggregálódása egyre kifejezettebb lett mikrocisztinek hatására. A toxin-kezelt sejtek térfogata a 2-4 napon szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll sejteké. A toxin-kezelt sejtek autofluoreszcenciája megnőtt a kontroll sejtekhez képest, és ez nem csak a sejt növekedésének, hanem a kloroplaszt növekedésének is köszönhető. A sejtek klorofill tartalma jelentősen megnőtt a toxinkezelések hatására. A növekvő autofluoreszcencia és a klorofill-tartalom növekedés intenzívebb metabolizmusra utal, ami egyfajta stressz jelenségnek is tekinthető (Sedmak és Elersek 2005).

Az eddig tárgyalt inhibíciós jelenségekkel ellentétben Babica és munkatársai (2007) kísérleteinek eredményei azt mutatják, hogy bizonyos Chlorophyta fajok nem mutatnak nagy érzékenységet mikrocisztinokkal szemben. Kísérleteik során öt zöldalga faj (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella kesslerii*, *Pediastrum duplex*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*) tenyészetét kezelték mikrocisztin-RR-rel és -LR-rel. A *Chla. reinhardtii*, *Chlo. kesslerii*, *Pe. duplex* növekedését erőteljesebben befolyásolta a MC-RR mint az MC-LR, bár meg kell jegyezni, hogy a környezetben is gyakran előforduló koncentrációk (0,001-0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nem okoztak szignifikáns eltérést a tenyészetek növekedésében (Babica et al. 2007). 0,1-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mikrocisztin (-RR és -LR) sem okozott gátlást a legtöbb faj esetében, kivéve a *Ps. subspicata*-t, amelynél 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -nél magasabb mikrocisztin koncentrációk jelentős gátlást okoztak a növekedésben. A legkisebb érzékenység a *S. quadricauda* esetében

mutatkozott, csupán $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ -nél magasabb mikrocisztin koncentráció mellett volt kimutatható hatás.

Hasonló eredmények születtek egy *Klebsormidium* faj *Geitlerinema splendidum* cianobaktériummal való „együttnevelése” során: bár volt kimutatható MC a mediumban ($0,0001 \mu\text{g mL}^{-1}$), az nem gátolta a *Klebsormidium* növekedését (Valdor és Aboal 2007). A faj $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-RR-re sem volt érzékeny. A *Klebsormidium* ellenállóságával kapcsolatban azt feltételezik, hogy filogenetikailag közel áll az edényes növényekhez, amelyeknél detoxifikációs rendszer jelenléte lehetséges (Pflugmacher 1998a-b, 1999, Beattie et al. 2003).

Bartova és munkatársai (2011a) a *Pseudokirchneriella subcapitata* zöldalga esetében azt tapasztalták, hogy sem a *M. aeruginosa* extraktum, sem a sejtmentes médium, sem $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR és -RR nem volt hatással a növekedésre. A tisztított mikrocisztinek a glutation reduktáz aktivitásának növekedését okozták, de nem voltak hatással más detoxifikációs enzimekre. A *M. aeruginosa* extraktum nem volt semmilyen hatással, míg a sejtmentes médium a glutation-S-transzferáz aktivitásának emelkedését okozta. A rövidtávú tesztek (3-24 óra) oxidatív stresszre utaló eredményekkel zárultak, míg hosszú távon (10 nap) nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a kontrolltól.

Dinoflagelláták

Sukenik és munkatársai (2002) a *Peridinium gatunense* dinoflagelláta növekedésének és fotoszintézisének gátlását írták le mikrocisztinek hatására. Vardi és munkatársai (2002) a *Peridinium gatunense* és a *Microcystis aeruginosa* együttnevelése során megállapították, hogy az iniciáló sejtszámoknak nagy jelentősége van a gátló hatások tekintetében. 200 sejt mL^{-1} *P. gatunense* növekedését $10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ *Microcystis* teljesen meggátolta még akkor is, ha többlet tápanyagot juttattak a tenyészetbe. 560 sejt mL^{-1} -nél már „csak” 60%-os volt a gátlás, míg $2300 \text{ sejt mL}^{-1}$ esetén már alig volt kimutatható hatása a *Microcystis* jelenlétének. A *Microcystis* növekedését az $1000 \text{ sejt mL}^{-1}$ *Peridinium* sejtszám alatti iniciálás nem befolyásolta, ezzel szemben az ennél magasabb értékek már igen, még nagyobb tápanyag-koncentráció mellett is (Vardi et al. 2002). A *Peridinium* sejtekben a reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyisége már fél órával a *Microcystis* sejtek hozzáadása után szignifikánsan megnőtt, az első csúcsot a hozzáadás utáni első órában érte el, majd 24 óra elteltével megfigyeltek egy

második maximumot, ezt követően pedig csökkent a ROS mennyisége. A tisztított MC-LR-rel kezelt *P. gatunense* tenyészetek esetében az előzőhöz nagyon hasonló kétszűcsű görbét figyeltek meg azzal az eltéréssel, hogy itt a második maximumot sokkal hamarabb érte el a ROS mennyisége. Ezzel szemben a nem-toxintermelő *Microcystis* sejtek hozzáadása alig okozott ROS növekedést, továbbá nem volt kimutatható második csúcs sem. A ROS maximumot az is befolyásolta, milyen korú volt a *Microcystis* tenyészet, amit a *Peridinium* tenyészetekhez adtak: Az idősebb tenyészet hozzáadása lerövidítette a két csúcs közti időt, továbbá az idősebb *Microcystis* sejtek kb. 30%-os *P. gatunense* sejtpusztulást okoztak, míg a fiatalabb *Microcystis* tenyészet hozzáadása alig okozott pusztulást (Vardi et al. 2002). A MAP kináz enzimes család az, ami a cianobaktérium vagy toxinjának az észlelésében szerepet játszhat, továbbá a hozzájuk kapcsolódó szignál transzdukciós folyamatok befolyásolják a ROS akkumulációját. A *Microcystis* sejtek, vagy mikrocisztinek hozzáadása, a ROS akkumulációján keresztül programozott sejtelhaláshoz vezethet, mégis a túlélő sejtek esetében stimulálja a sejtosztódást. Abban az esetben, ha a tenyészeteket előkezelték *Microcystis* szűrlettel, akkor kb. nyolcszorosára nőtt a sejtek tiamin tartalma, ami fokozott DNS szintézisre utal. Ez a jelenség nem volt kimutatható, ha tisztított MC-LR-rel kezelték a tenyészetet (Vardi et al. 2002). A protein-kináz (PK) aktivitás nem-toxikus, ill. toxikus *Microcystis* sejtek, szűrlet, ill. tisztított MC-LR hatására is nőtt az első fél órában. 22 óra elteltével megvizsgálva a toxikus *Microcystis* sejtek PK aktivitásra gyakorolt hatását, megfigyelték, hogy az a kontroll (fél órással) szintjére csökkent le. A toxikus *Microcystis* sejtek és a szűrlet sokkal nagyobb aktivitást eredményezett, mint maga a tisztított toxin. Egyre kisebb molekulatömegű kinázok felé haladva nőtt azok aktivitása az összes vizsgálat során (Vardi et al. 2002).

Chrysophyták

Chrysophyta fajokban a növekedés stimulációját, fokozott szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitást és lipid peroxidációt, valamint a glutation pool nem szignifikáns változásait írták le MC-LR és -RR hatására (Ou et al. 2005). A sejtsztruktúra változásai (vakuolizáció, a kloroplasztok duzzadása), valamint a programozott sejthalálhoz hasonló jelenségek is megfigyelhetők voltak. A mikrocisztinek biodegradációját

is megfigyelték, valamint kimutatták, hogy a sejtek nem akkumulálják a toxint (Ou et al. 2005).

Cryptophyták

A mikrocisztinek Cryptophytákra gyakorolt hatásairól nagyon kevés adat található az irodalomban, pedig e csoport nagy jelentőséggel bír a zooplankton táplálkozásában (Twombly és Burns 1996, Tessier és Bizina 2001), így mikrocisztinekkel szembeni érzékenységüknek a planktonközösségek egésze szempontjából jelentősége lehet. MC-RR kezelés a *Cryptomonas ovata* gátlását vagy stimulációját is kiválthatja a fényintenzitástól függő módon. A MC-RR alacsony fényintenzitáson ($4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) gátolta a *Cryptomonas erosa* növekedését (Sedmak és Kosi 1998).

Cianobaktériumok

Annak ellenére, hogy a mikrocisztinek leginkább az eukarióta protein foszfatázokra gyakorolt gátló hatásukról ismertek, anticianobakteriális hatásokat is leírtak. Singh és munkatársai (2001) egy *Anabaena* törzs és egy *Nostoc muscorum* törzs $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR-rel való kezelése során figyelték meg a növekedésgátlás mellett a fotoszintetikus oxigéntermelés, a CO_2 felvétel, valamint a nitrogénáz aktivitás gátlását. Kimutatták, hogy mindkét faj sötétben és világosban is felveszi a toxint (Singh et al. 2001).

Synechococcus elongatus cianobaktériumban a növekedés gátlásán túl a klorofill-tartalom csökkenését, a fotoszintézis és a nitrát reduktáz aktivitás változását, valamint a fehérje- és szénhidráttartalom változását figyelték meg MC-RR-rel való kezelés hatására (Hu et al. 2004).

A kutatási eredmények azt mutatják, hogy a termelő szervezet maga sem érzékeny a mikrocisztinekre: a *M. aeruginosa* esetében csak $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentráció mellett volt kimutatható növekedésgátlás (Babica et al. 2007).

Geitlerinema splendidum cianobaktériumot együtt nevelve a *Nostoc* sp., *Pseudocapsa* sp., és *Scytonema* sp. cianobaktérium fajokat azt tapasztalták, hogy bár volt kimutatható MC a mediumban ($0,0001 \mu\text{g mL}^{-1}$), mégis minden faj nőtt. Ugyanezen cianobaktériumokat *Oscillatoria* sp., *Rivularia biasoletiana*, *Rivularia haematites*, *Geitlerinema splendidum*, *Phormidium* sp., *Tolypothrix distorta* és *Scytonema myochrous* cianobaktériumok kivonataival kezelve a

következőket tapasztalták: A *Scytonema* faj növekedését 4 napos inkubálás után az *R. biasolettiana* kivételével minden kivonat gátolta. Nyolc nap elteltével pedig csak az *Oscillatoria* kivonat gátolta teljesen a növekedést, míg a többi esetben „csak” növekedés csökkenést tapasztaltak (Valdor és Aboal 2007). Igaz, hogy ezek a vizsgálatok bentikus fajokra irányultak, azonban az általuk termelt másodlagos anyagcseretermékek szerepet játszhatnak a fitoplankton életében is (pl. kiüledés, nyugvó alakok).

Érdekes eredmények születtek a mikrocisztinek fonalas cianobaktériumokra gyakorolt hatásának vizsgálata során. A *Trichormus variabilis* fonalas cianobaktériumnál 0,00067-0,037 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC hatására a heterociszta frekvencia emelkedését tapasztalták, míg magasabb MC koncentráció a heterociszta-frekvencia csökkenéséhez vezetett, valamint gátolta az akinéták differenciálódását. A sejtdifferenciálódásban bekövetkező defektusokért feltételezhetően a szerin-típusú proteázok gátlása felelős (Bartova et al. 2011b).

A kutatási eredmények tehát azt mutatják, hogy a protein foszfatázokra gyakorolt gátló hatás bizonyos cianobakteriális enzimek esetében is érvényesülhet (Zhang 1993, Potts et al. 1993, Zhang et al. 1998, Singh et al. 2001, Bartova et al. 2011a,b). Meg kell jegyezni, hogy egyes *Microcystis* fajokból izolált protein foszfatázok rezisztensek a mikrocisztinekre (Shi et al. 1999). A mikrocisztinek mikroalgákra kifejtett toxikus hatásai a protein kinázokkal és foszfatázokkal való interakció (Vardi et al. 1999, Vardi et al. 2002) mellett oxidatív stresszben, a ROS mennyiségének növelésében nyilvánulnak meg (Hu et al. 2005).

A mikrocisztinek lehetséges funkciója a fitoplankton közösségekben

A fent tárgyalt eredmények azt mutatják, hogy a mikrocisztinek hatása faj- és rokonvegyület specifikus – azaz a különböző mikrocisztinek hatása eltérő lehet ugyanazon faj esetében, valamint a különböző fajok nagyon eltérő módon reagálhatnak ugyanazon mikrocisztin variáns jelenlétére. Az eredmények egy része nem támasztja alá azt a hipotézist, mely szerint a közvetlen allelopatikus hatás a mikrocisztinek természetes funkciója, legalábbis a növekedés közvetlen gátlása tekintetében (Babica et al. 2007). Meg kell jegyezni, hogy az említett vizsgálatok egy része, amelyekben növekedésgátlás

mutatkozott, a természetben általánosan megfigyelhető mikrocisztin koncentrációknál ($>0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) magasabb MC koncentrációk ($0,01-57 \mu\text{g mL}^{-1}$) mellett zajlott. Ebből következően kérdéses, hogy a mikrocisztinek elsődlegesen mint allelopatikus vegyületek szerepelnek a vízi ökoszisztémákban (Babica et al. 2006).

A mikrocisztinek interspecifikus interakciókban való részvételére utal, hogy bizonyos fitoplankton fajok jelenléte, vagy exudátuma hatással van a mikrocisztintermelésre: a *Clamydomonas reinhardtii* exudátuma gátolta egy *Anabaena flos-aquae* törzs mikrocisztin termelését (Kearns és Hunter 2002). Ellenkező esetre is van példa: egy *Oscillatoria agardhii* törzs mikrocisztin termelése fokozódott *Spirogyra* zöldalgák jelenlétében (Mohamed 2002). Egy *M. aeruginosa* törzs esetében a mikrocisztin termelés fokozódása volt megfigyelhető nem toxikus *Planktothrix agardhii* tenyésztettel, vagy annak tápoldatával való kezelés hatására (Engelke et al. 2003). Vardi és munkatársai (2002) a McyB géntermék mennyiségének emelkedését tapasztalták *Peridinium gatunense* vagy *Clamydomonas reinhardtii* exudátumának hatására; Schatz és munkatársai (2007) számos más stressz-tényező hatására figyelték meg ezt a jelenséget. A McyB mennyiségének emelkedése volt megfigyelhető mikrocisztinek, mikroginin vagy mikropeptin hatására is. A szerzők feltételezik, hogy az öregedő tenyészetekben a sejtek lízise során felszabaduló peptidek a mikrocisztinek fokozódó termelését idézik elő az életben maradó sejtekben (Schatz et al. 2007).

A mikrocisztinek funkciója a termelő szervezetekben tehát nem világos. Egyes szerzők szerint feltételezhető, hogy olyan funkciót látott el a sejtben, amely mára elveszett (Carmichael 1994). A toxin termelésének magas költsége viszont azt a nézetet erősíti, miszerint a toxin aktuális funkcióval is rendelkezik.

A mikrocisztinek funkciójával kapcsolatos kutatások egyik fontos kérdése, hogy megfigyelhető-e a toxin aktív kibocsátása a termelő sejtek által, vagy sem. Egyes esetekben mikrocisztinokat mutattak ki a sejtfal illetve a tok környékéről, ami utalhat a toxin intakt sejtekből való aktív kibocsátására (Shi et al. 1995). Rohrlack és munkatársai (2007) radioaktív jelölést alkalmazva követték nyomon az intracelluláris mikrocisztin sorsát egy *M. aeruginosa* törzs esetében, és azt tapasztalták, hogy a toxin nem kerül ki az extracelluláris térbe, függetlenül a nevelési körülményektől (alacsony vagy magas fényintenzitás). Az intracelluláris bomlás hiánya azt sugallja, hogy a toxin nem vesz részt a celluláris

anyagcsere-folyamatokban sem. Ezek alapján a vizsgált törzs esetében a mikrocisztinek szerepére vonatkozó kérdés továbbra is megválaszolatlan marad.

A mikrocisztinek nagy affinitása vas, réz vagy cink ionokhoz azt sugallja, hogy e molekulák sziderofórokként funkcionálhatnak (Humble et al. 1994). Ezt a feltételezést támaszthatja alá az a megfigyelés, hogy alacsony vaskoncentrációjú környezetben magasabb toxintartalmat figyeltek meg (Lukac és Aegerter 1993). Ellenkező esetre is van példa: magas vaskoncentráció mellett az intracelluláris toxin a vas megkötésével védelmi szerepet is betölthet alacsony szinten tartva a magas vaskoncentráció során egyébként fokozódó szabad gyöökképződést (Utkilen és Gjølme 1995).

Sedmak és Kosi (1998) szerint a mikrocisztineknek növekedésszabályozó funkciója van, amely segíti a sejtosztódást. 0,104-0,519 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-RR-rel való kezelés nem toxikus *M. aeruginosa* tenyészeteken fokozta a sejtosztódást. Hasonló hatást figyeltek meg *Chroococcus minutus* cianobaktérium esetében is, bár megjegyzendő, hogy a MC-RR aktiváló hatása erősen fényfüggő volt, a sejtosztódást aktiváló hatás meghatározott fényintenzitás ($4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mellett volt kimutatható. E fényintenzitás mellett a *Monoraphidium contortum* és a *Scenedesmus quadricauda* osztódásának fokozódását is megfigyelték. Meg kell jegyezni, hogy a sejtosztódás aktiválása csak néhány napig (max. egy hétig) állt fenn, a továbbiakban gátlás mutatkozott (Sedmak és Kosi 1998). A növekedésben, illetve a sejtdifferenciálódásban betöltött szerepet látszanak megerősíteni Bartova és munkatársainak (2011b) fentebb tárgyalt eredményei is.

Bizonyos kutatási eredmények azt sugallják, hogy a mikrocisztinek 3-amino-9-methoxy-2-6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoil sav (Adda) aminosava a tilakoidokhoz kapcsolódik (ahol az intracelluláris mikrocisztinek nagy része lokalizálódik a sejtben, Shi et al. 1995), ezáltal szerepe lehet a kromatikus adaptációban. Ezt támasztja alá, hogy néhány esetben magas fényintenzitásnál a mikrocisztinek szintéziséért felelős gének nagyobb arányú expresszióját figyelték meg (Kaebernick et al. 2000). Némileg ellentmond e feltételezéseknek, hogy Kardinaal és munkatársai (2007) megfigyelései szerint a nem toxikus *M. aeruginosa* törzs túlnőtte a toxikus törzset akár 1 toxikus:1 nem toxikus, akár 9 toxikus:1 nem toxikus arányban iniciálták őket együttnevelés során. Különbségek mutatkoztak a toxint termelő és nem termelő törzsek

között, ill. az adott típuson belül a magas fényintenzitáson, ill. sötétben tartott tenyészetek között a fotoszintézisben, aminosavak termelésében, zsírsavtermelésben, egyéb sejtfolyamatokban szerepet játszó fehérjék akkumulálásában, ill. gátlásában, és a különböző izomerek megjelenésében (Zilliges et al. 2011).

Sedmak és Elersek (2005) nem toxikus *Microcystis* törzset kezeltek 0,1038-0,5192 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR, -RR, -YR variánsokkal. A toxinok hatására a sejtek nagy, laza aggregátumokat hoztak létre, valamint a kontrollhoz képest megnőtt a sejtek térfogata a toxinkezelést követően. Ha csak az 1. nap adtak a nem toxikus törzshöz toxint, akkor a 8. napra nőtt sejtek térfogata aztán visszacsökken a kontroll méretre. Abban az esetben, amikor a 11. napon újból adtak a már 1. napon kezelt tenyészethez toxint, akkor a sejtek térfogata újra megnőtt. Ezek azért fontos jelenségek, mert mind a méret növekedés, mind az aggregálódás szerepet játszhat a vertikális és a horizontális szétterjedésben, migrációban, így juttatva előnyhöz az adott populációt. A toxin-kezelt sejtek autofluoreszcenciája is megnőtt a kontroll sejtekhez képest. Ezt a jelenséget toxikus *Microcystis* törzseknél is megfigyelték. A toxikus és nem-toxikus *Microcystis* törzsnél is megfigyelték, hogy a toxinok hatására megnő a fikocianin tartalom, azonban a klorofill-koncentráció nem változott (Sedmak és Elersek 2005).

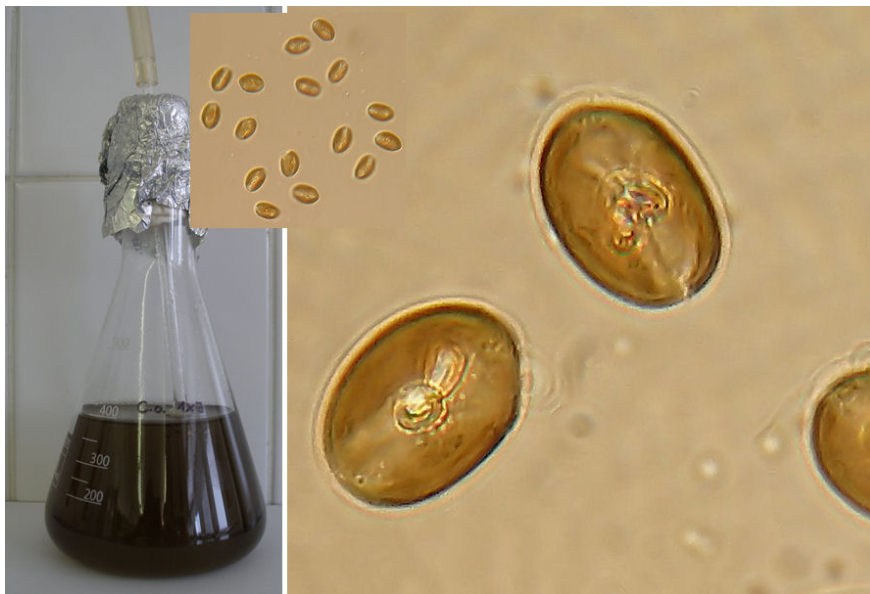
Mindebből látható, hogy a mikrocisztinek funkciójára vonatkozó kérdés megválaszolása még várat magára. Bár a mikrocisztinek kétséget kizárólag az egyik legpotensebb toxinok a vízi ökoszisztémában, azonban az eddigi vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy a sejtek elsősorban nem ezért termelik a toxint. Ezt támasztja alá az is, hogy az exponenciális szakaszban sincs akkora kibocsátás, amely igazán komoly, tartós veszélyt jelenthetne az élőlényekre. Az újabb kutatások (Davies 2006) inkább azt sugallják, hogy ezek az amúgy toxikus, de egyéb módon is bioaktív vegyületek a sejtek közti kommunikációban játszanak szerepet. Még messze vagyunk attól, hogy teljes mértékben megértsük a mikrocisztinek szerepét, egyre több olyan tényre derül fény, ami a mikrocisztinek oxidatív stressz esetén játszott sejten belüli szerepét támasztja alá. További kutatásokra van szükség az allelopatikus hipotézis végleges megerősítéséhez vagy elutasításához, valamint új információk szükségesek az evolúciós és a molekuláris biológia területéről a mikrocisztinek szerepének megválaszolására.

2.3. A *Cryptophyta* taxon és interakciós kapcsolatai

2.3.1. A *Cryptomonas ovata* faj ismertetése

A *C. ovata* a Cryptophyta divízióba, azon belül a Cryptomonadales rendbe, a Cryptomonadaceae családba tartozó eukarióta alga. A Cryptophyta taxon tagjaira jellemző, hogy unicellulárisak, és két flagellummal rendelkeznek. A Cryptomonadaceae családba tartozó élőlényekre jellemző, hogy a sejtek gyakran kocsonyás burokkal körbevett kolóniákat képeznek. A mozgó sejteknek két flagellumuk van. Periplasztidiális kompartmentjeik a két kloroplaszt, illetve a két pyrenoid, a sejtmag és az egyik pyrenoid körül elhelyezkedő két nukleomorf lehet (számuk fajoként változik). Mérsékelt övi „édesvizekben” fordulnak elő (Kugrens és Clay 2003).

A *C. ovata* sejtek ellipszoidak, vagy oválisak, és enyhén görbültek. A sejtek 20-80 μm hosszúak, 6-20 μm szélesek, és 5-18 μm „vastagok”. Sejtenként két kloroplasztjuk van pyrenoidokkal (3. ábra). Színük a zöldesbarna és a sötétbarna árnyalatai közt mozoghat (3. ábra). Az önálló sejtek kocsonyás burkot nem képeznek (Kugrens és Clay 2003).



3. ábra. a) *Cryptomonas ovata* tenyészet, b-c) *C. ovata* sejtek.

2.3.2. A Cryptophyta taxon inetarakciós kapcsolatai

A Cryptophyta taxon „édesvízi” tagjai nem toxikusak, bár egyes laboratóriumi törzsekről kimutatták, hogy metanolos sejtkivonatuk antibakteriális hatású (Kellam és Walker 1989). A taxonba tartozó fajok fontos szerepet játszanak a zooplankton táplálkozási szokásaival, az azt befolyásoló tényezők feltárásával foglalkozó kutatásokban (Twombly és Burns 1996, Tessier és Bizina 2001), továbbá vizsgálják más fajokkal szembeni kompetíciós képességeiket is (Rengefors és Legrand 2001, Suikannen et al. 2004, Tillmann et al. 2008).

A zooplankton szervezetek előfordulása, abundanciája, ill. az utódok száma és vitalitása jól korrelál a táplálékul szolgáló fitoplankton fajok előfordulásával, ill. egyedszámával (Infante és Abella 1985, George et al. 1990). A zooplankton taxonok táplálék preferenciája fajonként változó (Ahlgren et al. 1989, Wickham et al. 1993, Stutzman 2006), azonban általánosságban elmondható, hogy a vizsgált zooplankton fajok a különböző Cryptophyta fajokat más fajokhoz viszonyítva általában jobban, vagy nem kevésbé preferálták. Egy *Daphnia* faj predációs szokásait és kompetíciós kapcsolatait heterotróf csillósok (*Halteria grandinella*, *Strobilidium gyrans* és *Strobilidiumvelox*), a *Keratella cochlearis* és egy *Cryptomonas* faj jelenlétében vizsgáló tanulmány szerint a *Daphnia* egyedek életben maradását, az utódok számát leginkább a Cryptophyta faj jelenléte befolyásolta (Wickham et al. 1993). Egy másik tanulmány eredményei azt mutatták, hogy a *Daphnia pulicaria* életben maradása nem függ szignifikánsan a préda minőségétől, a *Daphnia oregonensis* egyedek viszont tovább maradtak életben a *Cryptomonas reflexa* és a *Pandorina* sp. jelenlétében. Mindkét zooplankton fajról elmondható, hogy mind az utódok teljes száma, mind az egyes egyedek utódszáma magasabb volt a *C. reflexa* jelenlétében, mint a zöldalga táplálék (*Pandorina* sp., *Sphaerocystis* sp.) esetén. A zooplankton fajok Cryptophyta fajokkal szembeni pozitív táplálékpreferenciájának egy lehetséges magyarázata lehet, hogy a Cryptophyta fajok különálló egyedei nem képeznek kocsonyás burkot (Kugrens és Clay 2003, Stutzman 2006), valamint egyik fő tartalék tápanyagukat a telített és telítetlen zsírok képezik (Kiss 2004).

A Cryptophyta fajok, azon túl, hogy a zooplankton kedvelt táplálékát jelentik, sok esetben szenvednek el allelopatikus hatásokat a fitoplankton más tagjaitól. Természetes vizekben a *Rhodomonas lacustris* a

Peridinium aciculiferum-mal együtt előfordul, annak kompetitora. A *P. aciculiferum* olyan biológiailag aktív anyagokat termel, amelyek hatástalanok potenciális ragadozóira, viszont allelopatikus hatást fejtenek ki a kompetítorra (a *R. lacustris* sejtek felpuffadnak, és lizálnak - Rengefors és Legrand 2001). *Alexandrium* fajok (*A. tamarense*, *A. ostenfeldii*, *A. lusitanicum*, *A. minutum*, *A. catenella*, *A. taylori*) olyan allelokemikáliákat termelnek, melyek segítségével jelentős előnyhöz tudnak jutni természetes kompetitoraikkal (többek közt a *Rhodomonas salina*-val) szemben (az általuk termelt allelokemikáliák hatására a kezelt sejtek lizáltak; Tillmann et al. 2008). Nemcsak eukarióta algák, de cianobaktériumok is gátolhatják Cryptophyta fajok szaporodását: egy tanulmány kimutatta, hogy a *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* és *Anabaena lemmermannii* cianobaktériumok sejtmentes kivonata gátolja egy *Rhodomonas* faj egyedszám-növekedését (Suikkanen et al. 2004).

Összességében tehát elmondható, hogy a Cryptophyta taxonok interakciós kapcsolatainak vizsgálata, az esetleges előfordulásukat negatívan befolyásoló tényezők feltárása elsődlegesen a táplálékláncban betöltött szerepük miatt jelentős.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. 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 kísérletek ideje alatti időszakban mind a *Cryptomonas ovata*, mind pedig a *Microcystis aeruginosa* törzseket (amelyekből az inokulálás is történt) buborékoltatva tartottuk fent a kísérletekkel megegyező körülmények között, az átoltásokra kéthetente került sor. Mindkét fajból 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban 50 ml végtérfogatú álló, ill. rázatott tenyészeteket is fenntartottunk, melyek átoltására 4-8 hetente került sor. Az álló tenyészeteket használtuk a rázatott tenyészetek inokulálásához, míg a rázatott tenyészetekből inokuláltuk a buborékoltatott tenyészeteket.

A kísérleteinkhez használt tápoldatot, fényintenzitást, hőmérsékletet az előkísérleteink tapasztalatai alapján választottuk ki (a dolgozatban nem bemutatott eredmények). A *C. ovata* tenyészeink számára egyértelműen ezen beállítások voltak a legoptimálisabbak, míg a *M. aeruginosa* tenyészetek növekedése gyorsabb volt 2-3°C-kal magasabb hőmérsékleten, és magasabb nitrát, ill. foszfát tartalmú tápoldatokban, azonban szignifikáns különbség nem volt kimutatható a kétféle beállítás között (a dolgozatban nem tárgyalt eredmények). Továbbá a *Microcystis* sejtek toxintartalma, ill. annak összetételét sem tért el a különböző beállítások hatására (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>; 5. táblázat), állandó fényintenzitáson (20 μmol m⁻² sec⁻¹), 22-23°C-on tartottuk fent. A vizsgálatok időtartalma 14 nap volt (kivéve a toxicitási tesztet, ld. később). A tenyészetekből naponta 1 × 10 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.

5. táblázat A kísérletek során használt Jaworski tápoldat összetétele.

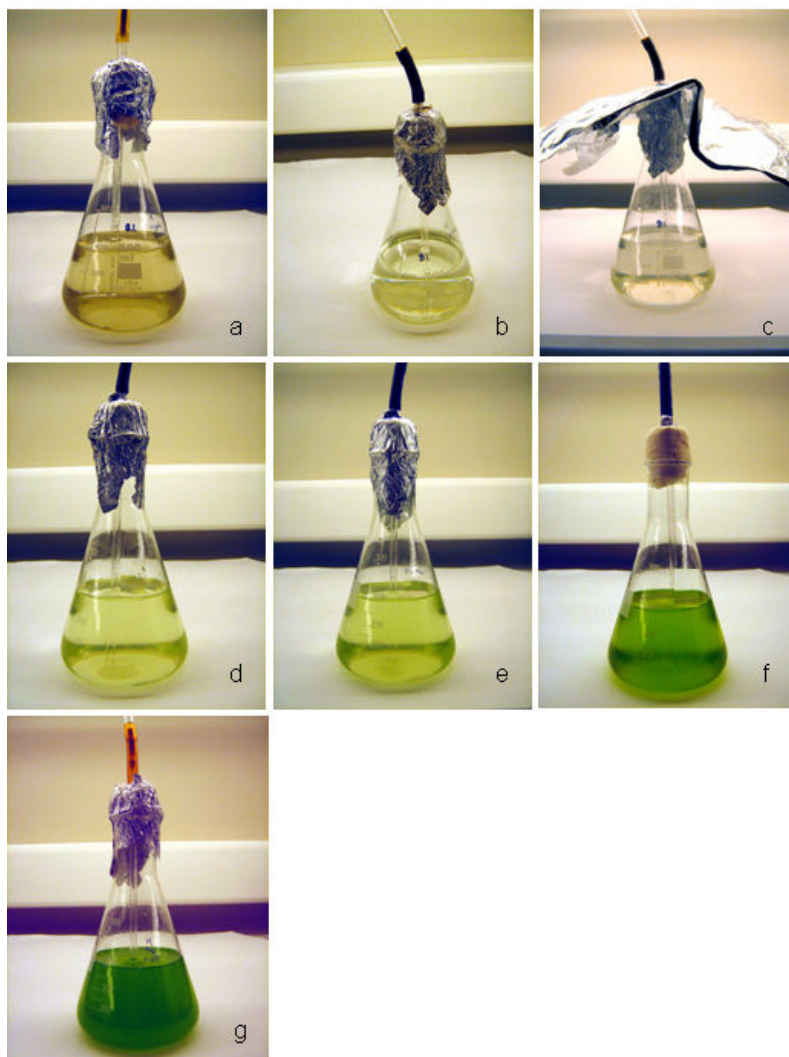
Vegyszer	g L⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	0,0124
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,05
NaHCO ₃	0,0159
FeNa-EDTA	0,00225
Na ₂ -EDTA	0,00225
H ₃ BO ₃	0,00248
MnCl ₂ × 4H ₂ O	0,00139
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O	0,001
Cyanocobalamin	0,00004
Thiamine-HCl	0,00004
Biotin	0,00004
NaNO ₃	0,08
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	0,036

3.2. Keverett tenyészetek (*C. ovata* és *M. aeruginosa* sejtek együtt nevelése)

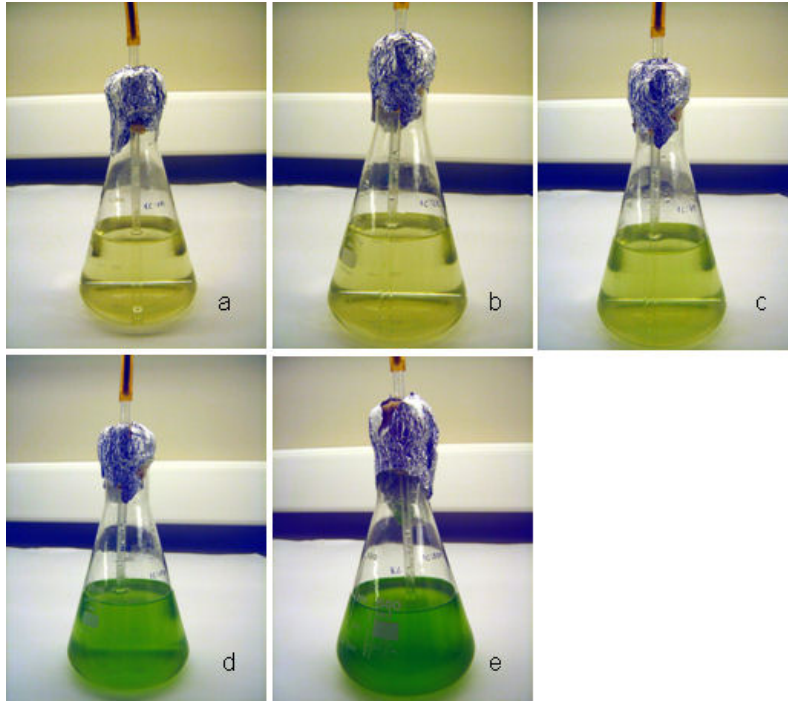
3.2.1. Egységnyi sejtszámú *C. ovata* együtt nevelése különböző sejtszámú *M. aeruginosa*-val

A *C. ovata* inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ volt a kontroll (4. ábra) és a kevert tenyészetekben (5. ábra). A *M. aeruginosa* sejtek száma a kevert tenyészetekben a kísérletek indításakor: $0,1 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ (1:1 arányú tenyészet); $0,2 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ (1:2 arányú tenyészet); $0,4 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ (1:4 arányú tenyészet); $2,5 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ (1:25 arányú tenyészet); 5×10^6 sejt mL⁻¹ (1:50 arányú tenyészet) (5. ábra). A kísérletek során alkalmazott *M. aeruginosa* kontroll tenyészetekben a sejtszámot a kevert tenyészetek *M. aeruginosa* sejtszámának

megfelelően állítottuk be (4. ábra). A $0,1 \times 10^6$ 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 (4. ábra).



4. ábra A kontroll tenyészetek az inokulálás napján. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* tenyészet; b. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* tenyészet; c. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} árnyékolt *M. aeruginosa* tenyészet; d. $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* tenyészet; e. $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* tenyészet; f. $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* tenyészet; g. 5×10^6 sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* tenyészet.



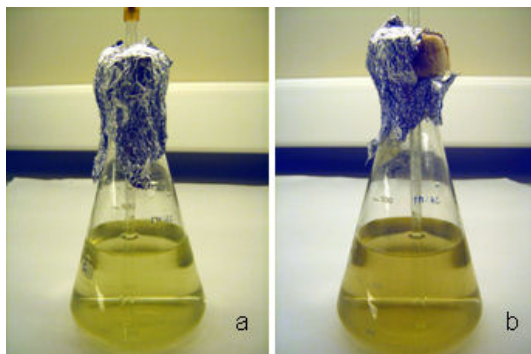
5. ábra A kevert tenyészetek az inokulálás napján. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; b. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; c. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; d. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; e. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és 5×10^6 sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*.

3.2.2. Egységnyi sejtszámú *M. aeruginosa* együttnevelése különböző sejtszámú *C. ovata*-val

A *M. aeruginosa* inokulálási sejtszáma $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt a kontroll, az árnyékolt kontroll és a kevert- tenyészetekben (6. ábra). A *C. ovata* sejtek száma a kevert tenyészetekben a kísérletek indításakor: $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:1 arányú tenyészet); $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (2:1 arányú tenyészet); $0,4 \times 10^6$ 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 10^6 sejt mL^{-1} egyedszámot (ami messze elmarad az 1:25 arányú tenyészet indításához szükséges $2,5 \times 10^6$, valamint az 1:50 arányú tenyészet indításához szükséges 5×10^6 sejt mL^{-1} egyedszámtól).

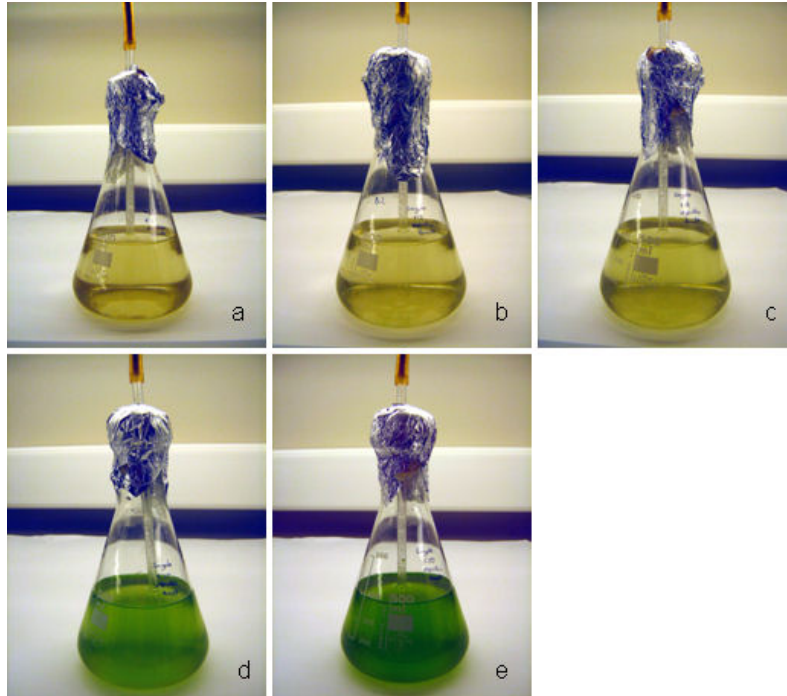


6. ábra A kevert tenyészetek az inokulálás napján. a. $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; b. $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*

3.3. Sejtkivonattal kezelt tenyészetek

3.3.1. *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 (7. ábra). A *C. ovata* kezelt tenyészetekhez a *M. aeruginosa* sejtkivonatából a 3.2.1. 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* kivonattát).



7. ábra A *M. aeruginosa* sejtkivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek az inokulálás napján. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* kivonattal kezelt; b. $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* kivonattal kezelt; c. $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* kivonattal kezelt; d. $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* kivonattal kezelt; e. 5×10^6 sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* kivonattal kezelt

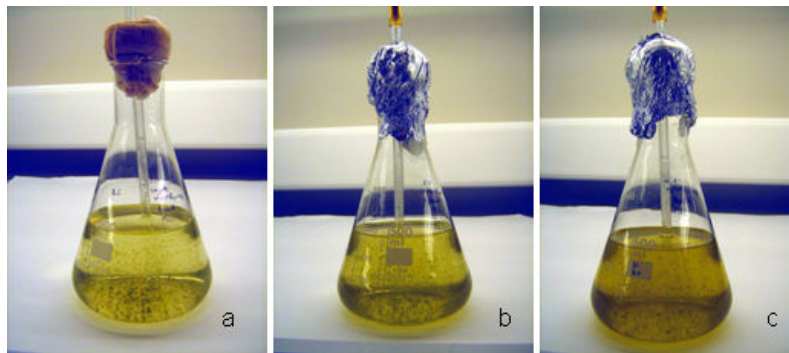
3.3.2. *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* kivonattal

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

A 3.2.1. 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 3.2.2. 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 3.2.2. 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* kivonattát; 8. ábra).



8. ábra A *C. ovata* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek az inokulálás napján. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* kivonattal kezelt; b. $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* kivonattal kezelt; c. $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* kivonattal kezelt

3.3.3. *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 3.2.1. 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 kivonattát).

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

3.4.1. 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 3.5.3. fejezetben bemutatott toxinmérések eredményei alapján számoltuk ki.

3.4.2. 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 időtartama 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; 10-10 μL mintát vettünk tenyészetenként, amit Jenaval fénymikroszkóppal 400-szoros nagyításon vizsgáltunk.

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

3.5.1. 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°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.

3.5.2. 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 °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.

3.5.3. 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 *Microcystis aeruginosa* sejteket centrifugáltuk, majd a pelletet 90%-os metanollal extraháltuk. A metanolos extraktumot 40 °C-on bepároltuk (Büchi) majd 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferben reszuszpendáltuk. A tisztítás DEAE-cellulóz oszlopon történt (2 × 25 cm; DE-52, Whatman), melyet 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 pufferrel ekvilibráltunk. Az oszlopot ezzel a pufferrel mostuk, majd sógrádienssel eluáltuk (0-0.2 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 pufferben). Az összegyűjtött frakciókat 239 nm-en fotometráltuk (Shimadzu UV-1601 UV/VIS spektrofotométer). A frakciók toxikusságát BGST teszttel vizsgáltuk (Vasas et al. 2002).

A toxikus frakciókat egyesítettük, a további tisztítás HPLC-vel történt (Készülék: Shimadzu LC-10AD VP HPLC; oszlop: SUPELCO Supelcosiltm LC-18 25 cm x 10 mm, 5 µm; detektor: diódasoros UV-VIS detektor). Az elkülönülő csúcsokat BGST-vel teszteltük. A frakciók újbóli kromatografálása után a tiszta MC-LR-t használtuk a kísérletekhez.

A tápfolyadék toxintartalmát micelláris elektrokinetikus kromatográfiával (MEKC) határoztuk meg a Vasas és munkatársai (2006) által megadott paraméterek alkalmazásával. (Készülék: Prince CEC-770; kapilláris: poliimid borítású kvarckapilláris (Supelco, átmérő: 60 cm × 50 µm, hossz: 52 cm); hidrodinamikus injektálás 100 mbar s⁻¹; 25 kV feszültség; 25 mM Na-tetraborát - 100 mM SDS puffer, pH: 9,3; detektálás: diódasoros detektorral 238 nm-en). Az elektroferogrammok kiértékeléséhez Dax 3D 8.1 szoftvert használtunk. A kimutatási határ mikrocisztinek esetén 3-4 µg mL⁻¹; kisebb toxintartalom esetén töményített mintákból történt a mérés.

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 (≥40°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.

3.6. 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 vizsgálat során a kimért 400 µL mintákhoz 40 µL nátrium-szalicilátot adtunk. Ezt követően az oldatokat 95 °C-on szárazra pároltuk (Memmert Model 400 szárítószekrény). A maradékhoz 40 µL tömény kénsavat adtunk, majd 10 perc várakozás után 300 µL desztillált vízzel egészítettük ki a mintákat, ezt követően 300 µL Seignette-sót adtunk hozzájuk. Alapos keverés, majd lehűlés után a mintákat 410 nm-en fotometráltuk. A tenyészetek nitrát-felvételét a tápoldatban mérhető nitrát-tartalom alapján számítottuk, a tápoldat eredeti nitrát-tartalmát tekintve 100%-nak.

3.7. 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).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Kevert tenyészetek

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

4.1.1.1. A *C. ovata* sejtszámának változása

A kontroll *C. ovata* tenyészetekben a sejtszám a 14 napos inkubációs idő alatt folyamatosan növekedett, a tenyésztési idő végére 13-szorosára nőtt (9. ábra). A kontroll tenyészet nitrát-felvétele az első napon igen alacsony volt (~1,9%), a 7. napon már a tápoldat nitrát-tartalmának közel 60%-át, a tenyésztés utolsó napjára pedig ~97%-át vették fel a sejtek (10. ábra).

Az 1:1 arányú kevert tenyészetekben a *C. ovata* sejtszáma a 3. napra közel megduplázódott, azonban a 4. naptól kezdve a sejtszám folyamatosan csökkent: a 14. napon a *C. ovata* sejtszáma kevesebb, mint 22%-a volt a kiindulási értéknek (9a. ábra). A kontroll és a kevert tenyészetek növekedésében megmutatkozó különbségeket természetesen a tenyészetek növekedési rátáján is nyomon lehet követni (1. melléklet). A vizsgált tenyészetek sejtszáma és növekedési rátája a tenyésztés teljes ideje alatt szignifikáns eltérést mutatott. A *C. ovata* sejtszáma már a *M. aeruginosa* azonos számban való jelenléte esetén is jelentős mértékben csökkent a kontroll tenyészet sejtszámához képest. A kevert tenyészetekben a nitrát-felvételi ráta az első napokban eltért a *C. ovata* kontroll tenyészet esetében tapasztaltaktól (10a. ábra): az első napon a tenyészet nitrát-felvétele ~25% volt, majd a 7. napra ~52%-ra emelkedett, a 14. napon pedig elérte a ~98 %-ot (10a. ábra).

Az 1:2 arányú kevert tenyészetekben a *C. ovata* sejtek száma a 2. napig emelkedett majd a tenyésztési idő végéig folyamatosan csökkent, s a 14. napra 100 sejt mL⁻¹ alá csökkent le (9b. ábra). A kevert tenyészetekben a *C. ovata* sejtek növekedési rátájának az értéke a 7. naptól már a negatív tartományba esett, vagyis a 7. napon már az inokulált sejtszám mennyiségét sem érte el a tenyészet sejtszáma (1. melléklet; 9b. ábra). A kevert tenyészet nitrát felvétele az 1. napon ~15%, a 7. napon 58%, míg a 14. napon közel 100% volt (10b. ábra).

Az **1:4 arányú kevert tenyészetekben** a *C. ovata* sejtek száma a 7. napig oszcillált, majd folyamatosan csökkent: a 14. napra csökkent 100 sejt mL⁻¹ alá (9c. ábra). A tenyészet nitrát-felvétele az 1. napon ~15%, a 7. napon ~57%, míg a 14. napon ~99% volt (10c. ábra).

Az **1:25 és 1:50 arányú kevert tenyészetekben** a *C. ovata* sejtek száma már a beoltást követő első napra 100 sejt mL⁻¹ alá csökkent le (9d. és 9e. ábra).

A kevert tenyészetek egyikében sem találtunk deformálódott *Cryptomonas* sejteket.

4.1.1.2. A *M. aeruginosa* sejtszámának változása

A **0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ kiindulási sejtszámú (1:1 arálynak megfelelő) *M. aeruginosa* kontroll tenyészetekben** az *M. aeruginosa* sejtek száma, a tenyészet növekedési rátája is folyamatosan csökkent (az 5. napra a sejtszám 100 sejt mL⁻¹ alá csökkent - 9a. ábra; 2. melléklet).

A **0,1 × 10⁶ sejt mL⁻¹ kiindulási sejtszámú (1:1 arálynak megfelelő) *M. aeruginosa* árnyékolt kontroll tenyészetekben** az *M. aeruginosa* sejtek száma - szemben az árnyékolás nélküli kontroll tenyészetrel - az első 7 napon lassan, de folyamatosan emelkedett, majd a tenyésztési idő végére a tenyészet *M. aeruginosa* sejtszáma 12,5-szeresére nőtt (9a. ábra). Az árnyékolt kontroll tenyészetben a nitrát-felvétel a következőképpen alakult: az első napon a tápoldat nitrát-tartalmának ~1,7%-át, a 7. napra ~18%-át, a 14. napra pedig több, mint 97%-át vették fel a sejtek (10a. ábra).

Az **1:1 arányú kevert tenyészetek** *M. aeruginosa* sejtszáma a tenyésztési idő alatt folyamatosan nőtt, (a 14. napra a kiindulási sejtszám 10,6-szeresére, 9a. ábra). Szignifikáns eltérést tapasztaltunk a 0,1 × 10⁶ sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészetben bekövetkező sejtszám-változások és az 1:1 arányú kevert tenyészetben az *M. aeruginosa* sejtek számának változása között (9a. ábra). A tenyészetek növekedési rátája a tenyésztés ideje alatt 0,2 körül mozgott, a legmagasabb értéket az 1. napon érte el (~0,6) (2. melléklet). Összességében elmondható a tenyészet növekedési üteméről, hogy a tenyésztési idő 4. napjától egyenletes mértékben változott a kísérlet végéig (2. melléklet). Az 1:1 arányú kevert tenyészetek és az árnyékolt kontroll tenyészetek *M. aeruginosa* sejtszáma közt a tenyésztési idő 14. napján lényeges eltérés

nem tapasztalható (9a. ábra), a tenyészetek között szignifikáns eltérés nincs.

A $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} kiindulási sejtszámú (1:2 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kontroll tenyészetek sejtszáma az első napra 38%-kal csökkent, majd a 2. naptól kezdve folyamatosan emelkedett, a 14. napra 43-szorosára nőtt (9b. ábra). A tenyészetek növekedési rátája az 1. napon bekövetkező csökkenést követően a 8. napig egyenletesen emelkedett, majd a 9. naptól értéke $\sim 0,24$ volt (2. melléklet). A kontroll tenyészet a tápoldatban lévő nitrát 4,4%-át vette fel az 1. napon, majd a felvétel a 7. napra $\sim 30\%$ -ra nőtt, míg a 14. napon 96% volt (10b. ábra).

Az 1:2 arányú kevert tenyészetekben az *M. aeruginosa* sejtek számának változása és a $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészetek sejtszám-változása közt szignifikáns eltérések mutathatók ki: az 1:2 arányú kevert tenyészetekben az *M. aeruginosa* sejtszáma folyamatosan növekedett, szemben a kontroll tenysézzel, ahol az 1. napra a sejtszám csökkent. További eltérés mutatható ki a kevert és a kontroll tenyészet 14. napon mért sejtszámában: a kevert tenyészetben a *Microcystis* sejtek száma csupán ~ 15 -szöröse volt a kiindulási értéknek, ami majdnem harmada annak a növekedésnek, amit a kontroll tenyészetben tapasztaltunk (9b. ábra). A kevert és kontroll tenyészetek sejtszáma közt a tenyésztés ideje alatt szignifikáns különbség van. A tenyészetek növekedési rátájában bekövetkező változások is eltértek a kontroll tenyészetben tapasztaltétól, a kevert tenyészetben a tenyésztés első 5 napján egyenletesen emelkedett, majd a tenyésztés 11. napjáig csökkent (értéke a 8. naptól $\sim 0,15$ körül mozgott), majd a tenyésztés végéig nőtt (2. melléklet).

A $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} kiindulási sejtszámú (1:4 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kontroll tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő végéig folyamatosan emelkedett és a tenyséztési idő végére $\sim 20,5$ -szörösére nőtt (9c. ábra). A kontroll tenyészet nitrát felvétele az 1. napon $\sim 4\%$, a 7. napon 81%, a 14. napon pedig $\sim 97\%$ volt (10c. ábra).

Az 1:4 arányú kevert tenyészet *M. aeruginosa* sejtszáma a tenyésztési idő alatt folyamatosan emelkedett, a 14. napra több mint 17-szerese a 0. napon mért sejtszámnak (9c. ábra), a kevert és a kontroll tenyészet sejtszámai között azonban még így is szignifikáns különbségek vannak (10c. ábra).

Az $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} kiindulási sejtszámú (1:25 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kontroll tenyészetben a sejtszám a

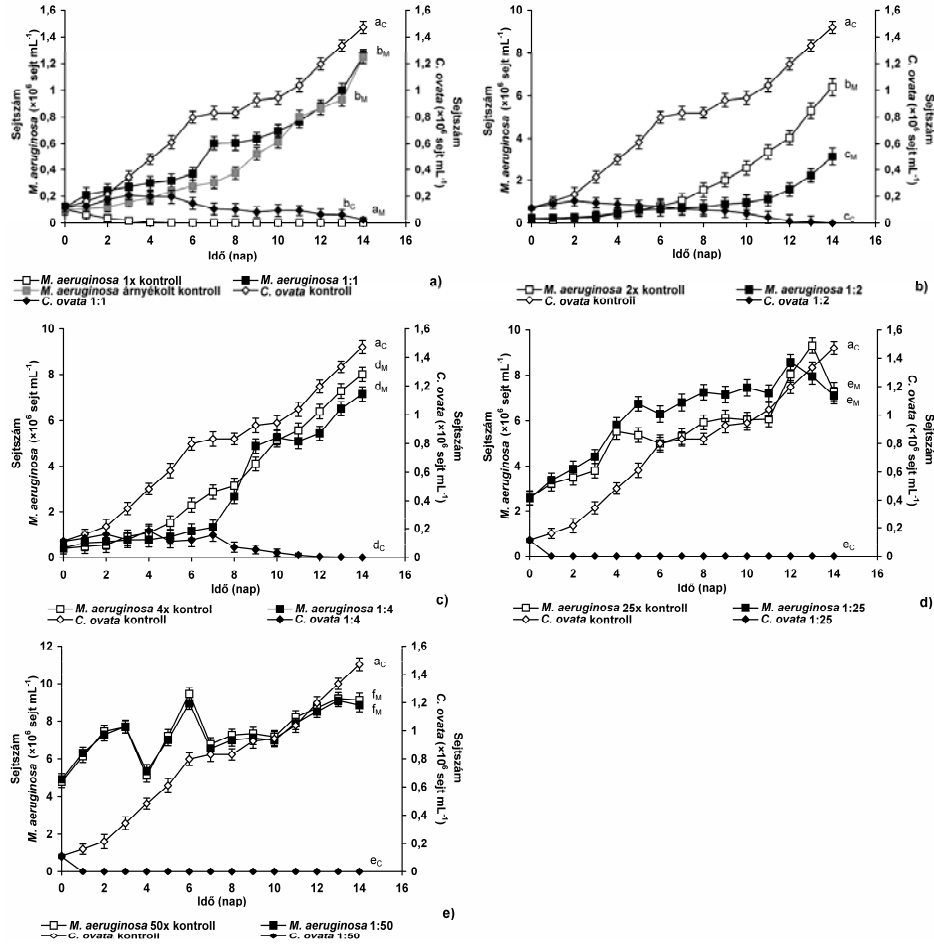
tenyésztési idő 13. napjáig folyamatosan emelkedett (~3,6-szoros növekedés), majd a 14. napra lecsökkent (9d. ábra). Az utolsó napon tapasztalt sejtszám-csökkenés feltehetően annak köszönhető, hogy a tenyészet elérte a stacioner állapotot, s egy - a tápanyag- tartalomnak megfelelő - közel állandó sejtszám-szintet vett fel. A tenyészet növekedési rátája az első héten ~0,15 körül mozgott, míg a tenyésztési idő második felében ~0,09 értéket ért el (2. melléklet). Ez a csökkenés is azt a feltevést látszik alátámasztani, miszerint a tenyészet a tenyésztési idő utolsó napjaiban megközelítette a rendelkezésre álló tápanyag-tartalomnak megfelelő sejtszámot.

Az **1:25 arányú kevert tenyészetekben** az *M. aeruginosa* sejtszáma az 5. napig folyamatosan emelkedett, majd a tenyésztési idő végéig hol emelkedve (maximális értéke a 12. napon volt), hol csökkenve (minimális értéke a 6. napon volt) a 14. napra közel 2,8-szorosára nőtt a kiindulási sejtszámnak (9d. ábra). A kevert és a kontroll tenyészet *M. aeruginosa* sejtszáma (9d. ábra) közt a 14. napon nem volt szignifikáns különbség.

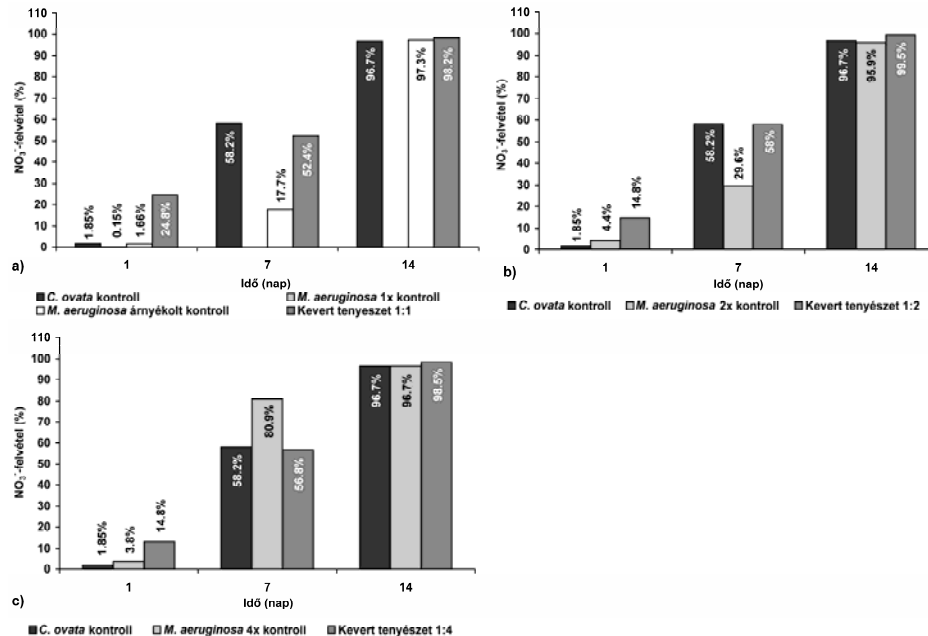
Az 5×10^6 sejt mL^{-1} kiindulási sejtszámú **(1:50 arálynak megfelelő) *M. aeruginosa* kontroll tenyészetben** a sejtszám az első 3 napon folyamatosan emelkedett, azonban a 4. naptól kezdődően a tenyésztési idő végéig lassú emelkedéseket és csökkenéseket figyelhattunk meg (9e. ábra). Az első héten a napi sejtszám-változásban tapasztalható nagy eltérések a tenyészet növekedési rátájában is jól kimutathatóak (2. melléklet), értékük 0,249 és 0,017 között mozgott.

Az **1:50 arányú kevert tenyészet** *M. aeruginosa* sejtszáma a kontroll tenyészet sejtszámához hasonló változásokon (csökkenések és növekedések) ment keresztül (9e. ábra). A növekedés jellegzetes lefutásának hátterében a magas inokulálási sejtszám állhat.

A tenyésztés ideje alatt sem a *M. aeruginosa* kontroll tenyészetekben, sem pedig a kevert tenyészetekben nem tudtunk kimutatni extracelluláris mikrocisztineket (nem bemutatott eredmény).



9. ábra A kevert tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; b. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; c. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; d. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; e. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és 5×10^6 sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató *C. ovata* (a_c - e_c), illetve *M. aeruginosa* (a_M - f_M) növekedési görbéket jelölik.



10. ábra A *C. ovata* és *M. aeruginosa* kontroll és kevert tenyészetek NO_3^- -felvételében bekövetkező változások a tenyésztési idő 1., 7. és 14. napján. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; b. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; c. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; az eredményeket a médiumból felvett nitrátmennyiség alapján %-ban adjuk meg, 100% a médium teljes nitráttartalma.

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

4.1.2.1. A *C. ovata* sejtszámának változása

A *C. ovata* kontroll illetve 1:1 arányú kevert tenyészetekben (11a. ábra) bekövetkezett *C. ovata* sejtszám-változások a 4.1.1.1. fejezetben olvashatók.

A $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} kiindulási sejtszámú (2:1 arálynak megfelelő) *C. ovata* kontroll tenyészet sejtszáma a tenyésztési idő alatt folyamatosan emelkedett, a 14. napra 3,4-szerese volt az inokulált sejtszámnak (11b. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája $\sim 0,09$ volt (3. melléklet). A kontroll tenyészet nitrát-felvétele a 14 napos

inkubációs idő alatt a következőképpen alakult: az 1. napra a sejtek a tápoldat nitrát-tartalmának 18%-át vették fel, a 7. napra ez az érték már meghaladta a 96%-ot, a 14. napon pedig ~98% volt az értéke (12b. ábra).

A **2:1 arányú kevert tenyészetben** a tenyészet *C. ovata* sejtszáma a tenyésztési idő alatt folyamatosan növekedett: a kiindulási sejtszám a 14. napra ~4,5-szörösére nőtt (8b. ábra). A tenyészet *C. ovata* sejtszáma a tenyésztési idő végére majdnem 30%-kal magasabb volt, mint a *C. ovata* kontroll tenyészet sejtszáma (11b. ábra). A kevert tenyészet átlagos növekedési rátája közel 0,14 volt (3. melléklet), ez az érték közel 40%-kal magasabb, mint a kontroll tenyészet növekedési rátája. A két tenyészetben a *Cryptomonas* sejtszámának növekedése szignifikánsan eltért egymástól. A kevert tenyészet nitrát-felvétele az első héten jelentős mértékben eltért a kontroll tenyészetétől: a táptalaj nitrát tartalmának az 1. napon ~29%-a, a 7. napon 61,5%-a, míg a 14. napon ~99%-a volt a felvett nitrát mennyisége (12b. ábra).

A **$0,4 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ kiindulási sejtszámú (4:1 aránynak megfelelő) *C. ovata*** kontroll tenyészet sejtszáma a tenyésztési idő végére közel kétszeresére nőtt (11c. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája ~0,09 volt (3. melléklet). A tenyészet nitrát-felvétele a következő módon változott a tenyésztés ideje alatt: 1. napon ~29%, a 7. napon 94,5%, a 14. napon pedig 97% volt (12b. ábra).

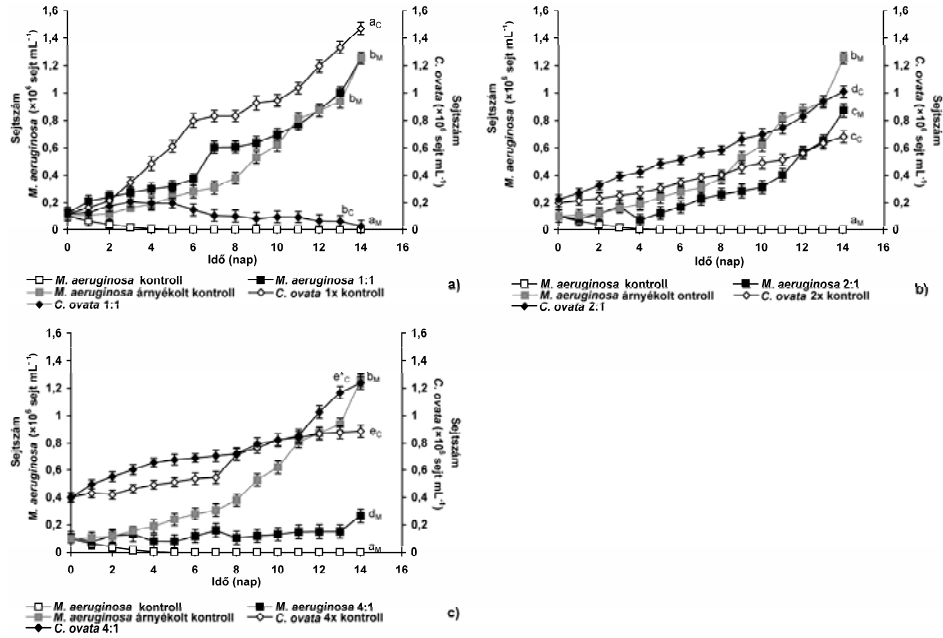
A **4:1 arányú kevert tenyészet** *C. ovata* sejtszáma, a 2. napra bekövetkező csökkenést követően, folyamatosan emelkedett: a tenyésztés végére több mint 3-szorosára nőtt (11c. ábra). A tenyészet *C. ovata* sejtszámában bekövetkező csökkenés (2. nap) egybeesett a tenyészet *M. aeruginosa* sejtszámának aznapi növekedésével (11c. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája ~0,11 volt (3. melléklet). Összehasonlítva a 4:1 arányú kevert tenyészet *C. ovata* sejtszámát a kontroll *C. ovata* tenyészet sejtszámával, megállapítható, hogy a kontroll tenyészet sejtszáma a 14. napon csupán 70%-a a *C. ovata* kevert tenyészetben mért *C. ovata* sejtszámnak (11c. ábra), a tenyészetek növekedési rátája közti különbség 20%. A kevert tenyészet nitrát-felvétele is eltért a *C. ovata* kontroll tenyészetétől: az első napra a táptalaj nitrát-tartalmának több mint 53%-a, a 7. és 14. napra ~83 és ~100%-a került felvételre (12c. ábra).

4.1.2.2. A *M. aeruginosa* sejtszámának változása

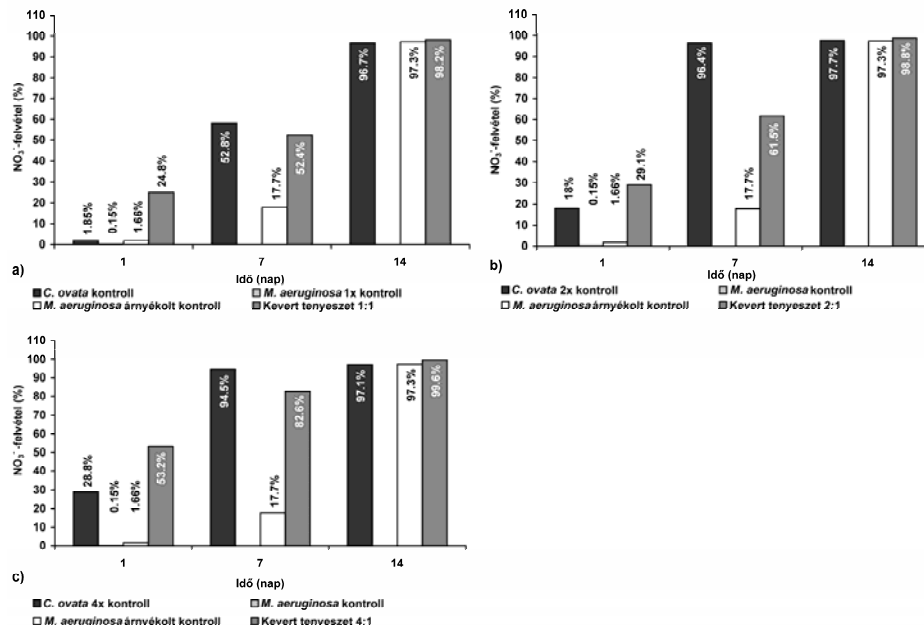
Az *M. aeruginosa* kontroll, árnyékolt kontroll, illetve 1:1 arányú kevert tenyészetekben bekövetkezett *M. aeruginosa* sejtszám-változások és a tenyészetek nitrát-felvételének változásai a 4.1.1.1. fejezetben olvashatók.

A 2:1 arányú kevert tenyészetben az *M. aeruginosa* sejtszáma a 2. napra közel 21%-al csökkent, majd a 3. napon újra emelkedett, ezt követően pedig a 4. és 5. napon újabb sejtszám-csökkenés ment végbe a tenyészetben (11b. ábra). A 7. naptól kezdve azonban a tenyészetben az *M. aeruginosa* sejtek száma folyamatosan emelkedett, a 14. napra elérte kiindulási érték 8,8-szorosát (11b. ábra). Az első héten a tenyészet sejtszámában végbemenő sejtszám csökkenések és emelkedések természetesen a tenyészet növekedési rátájában is nyomon követhetők (4. melléklet). A 8. naptól a tenyésztési idő végéig a tenyészet átlagos növekedési rátája 0,13 volt (4. melléklet). A kevert tenyészet *M. aeruginosa* sejtszám-változása és a kontroll *M. aeruginosa* tenyészet sejtszám-változása közti legfeltűnőbb különbség, hogy kevert tenyészetben a *M. aeruginosa* sejtek életben maradtak (11b. ábra). Bár a kevert tenyészet *M. aeruginosa* sejtszáma a tenyésztés első hetében oszcillált, mégis a *M. aeruginosa* sejtek száma növekedésnek indult a tenyészetben. A kevert tenyészet *M. aeruginosa* sejtszám változását összehasonlítva az árnyékolt kontroll tenyészetben tapasztalt változásokkal az mondható el, hogy az árnyékolt kontroll tenyészet sejtszáma szignifikánsan magasabb, mint a kezelt tenyészeté (közel ~45%-kal) (11b. ábra).

A 4:1 arányú kevert tenyészet *M. aeruginosa* sejtszáma a tenyésztési idő első 8 napján oszcillált, a tenyésztési idő 9. napjától kezdve azonban értéke folyamatosan emelkedett: a 14. napra a kiindulási érték 2,4-szeresére nőtt (11c. ábra). A tenyészet sejtszámában végbemenő változások jól követhetők a tenyészet növekedési rátájával is (4. melléklet). A tenyészet *M. aeruginosa* sejtszám-csökkenése a 8. napon egybeesett a tenyészet *C. ovata* sejtszámának hirtelen bekövetkező közel 25%-os sejtszám-növekedésével (11c. ábra). A kevert és árnyékolt kontroll tenyészetben a sejtszám növekedése szignifikánsan eltért egymástól (11c. ábra).



11. ábra A kevert tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *M. aeruginosa*; b. $0,2 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *M. aeruginosa*; c. $0,4 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *M. aeruginosa*. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató *C. ovata* (a_C-e_C), illetve *M. aeruginosa* (a_M-d_M) növekedési görbéket jelölik. e*: csak a 0-4 nap között van szignifikáns eltérés az e jelzésű $0,4 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ *C. ovata* tenyészet növekedésétől.



12. ábra A *C. ovata* és *M. aeruginosa* kontroll és kevert tenyészetek NO_3^- -felvételében bekövetkező változások a tenyésztési idő 1., 7. és 14. napján. a. $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; b. $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; c. $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa*; az eredményeket a médiumból felvett nitrátmennyiség alapján %-ban adjuk meg, 100% a médium teljes nitráttartalma.

4.2. Sejtkivonatokkal kezelt tenyészetek

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

A kontroll *C. ovata* tenyészetben bekövetkezett sejtszám-változások a 4.1.1.1. fejezetben olvashatók.

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:1 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő végére közel 16-szorosára emelkedett (13. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája $\sim 0,28$ volt (5. melléklet). A kezelt tenyészet sejtszáma a 14. napon közel 7%-kal volt magasabb a kontroll tenyészetben számolt sejtszámnál, míg átlagos növekedési rátája 4%-kal.

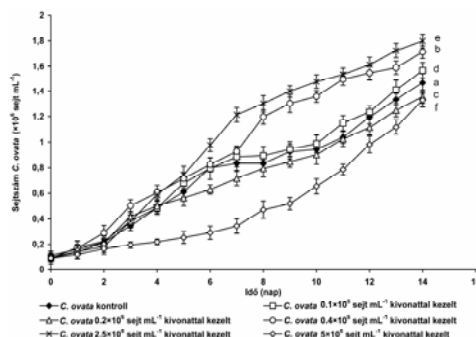
A $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:2 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő végéig folyamatosan emelkedett, a 14. napon elérte a kiindulási érték 14,5-szeresét (13. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája $\sim 0,31$ volt (5. melléklet), ami $\sim 11\%$ -val magasabb, mint a kontroll tenyészeté.

A $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:4 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszáma a 14. napon az inokulált sejtszámhoz képest 18-szorosára emelkedett (13. ábra), szemben a kontroll tenyészettel, melynél csupán 13-szoros növekedést tapasztaltunk (13. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája több, mint 25% -kal magasabb, mint a kontroll tenyészeté, értéke $0,36$ volt (5. melléklet).

A $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:25 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő végéig folyamatosan emelkedett (14. nap: 19,5-szeres növekedés; 13. ábra). A tenyészet sejtszáma $\sim 23\%$ -val volt magasabb, mint a kontroll tenyészeté. A tenyészet átlagos növekedési rátájáról (értéke $0,36$ volt) elmondható, hogy a kontroll tenyészet átlagos növekedési rátájához viszonyítva értéke közel 25% -kal volt magasabb. Bár ezen tenyészetnél volt a legnagyobb az eltérés a kiindulási és a 14. napon mért érték között ($19,5$ -szörös), azonban az első napokban a tenyészet növekedési rátája alacsonyabb volt, mint a $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és a $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* sejtkivonattal kezelt tenyészetek esetében (5. melléklet).

Az 5×10^6 sejt mL^{-1} (1:50 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszáma a 14. napra $1,3 \times 10^6$ sejt mL^{-1} értéket ért el (13. ábra). Ez a kiindulási egyedszámhoz képest több, mint 14-szeres növekedést jelent. A tenyészet átlagos növekedési rátája $0,2$ volt. Ez az érték $\sim 23\%$ -kal kevesebb, mint a kontroll tenyészeté. Így elmondható, hogy bár a tenyészet 14. napon mért sejtszáma a tenyészet indításakor mért sejtszámhoz képest arányaiban magasabb (kontroll tenyészet: $12,8$; kezelt tenyészet: $14,2$), mint a kontroll tenyészet esetében (13. ábra) a tenyészet növekedési rátája alatta maradt a kontroll tenyészetének (5. melléklet).

A *M. aeruginosa* kivonattal kezelt tenyészetek egyikében sem találtunk megváltozott morfológiájú *C. ovata* sejteket.



13. ábra A *M. aeruginosa* sejtkivonatával kezelt *C. ovata* tenyészetek, valamint a *C. ovata* kontroll tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató növekedési görbéket jelölik.

4.2.2. *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* sejtkivonattal

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

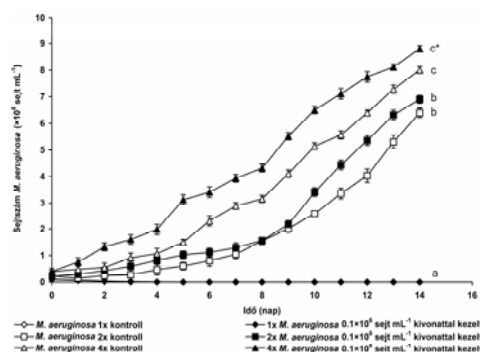
Az egységnyi ($0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámnak megfelelő) *C. ovata* kivonatával kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek vizsgálatai során csak az 1:1, 1:2 és 1:4 arányú kevert tenyészetnek megfelelő (inokulálási) sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetet kezeltünk *C. ovata* kivonattal. Ennek az oka az volt, hogy a kevert tenyészetekkel végzett vizsgálatok során csak ezen sejtszámarányoknak megfelelő tenyészetekben figyelhettünk meg hosszú távon (több napon keresztül tartó) interakciót a két faj között. Az ennél nagyobb sejtszámarányú kevert tenyészetekben a *C. ovata* sejtszáma már az első napon kimutatási határ alá csökkent, így a *C. ovata* sejtek nem befolyásolták tovább az *M. aeruginosa* sejtek növekedését (9. ábra).

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:1 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* kivonattal. Az egyszeres sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészet sejtszáma az 5. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent. A *C. ovata* sejtkivonattal kezelt egyszeres sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma az 5. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent (14. ábra). A tenyészet sejtszám-csökkenése jól egybevethető a *M.*

aeruginosa kontroll tenyészet sejtszám-csökkenésével (14. ábra), attól szignifikánsan nem tért el (6. melléklet).

A $0,2 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ (1:2 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* kivonattal. A kétszeres sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészet sejtszáma az első napra 36%-al csökkent, majd a 2. naptól kezdve folyamatosan emelkedett, a tenyésztési idő végére több, mint 28-szorosára nőtt (14. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája ~0,15 volt (6. melléklet). A *C. ovata* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészet sejtszáma a 14. napra ~33-szorosára emelkedett. A tenyészet átlagos növekedési rátája ~0,3 volt (6. melléklet). Összehasonlítva a kontroll tenyészet és a *C. ovata* sejtkivonattal kezelt tenyészet sejtszámának változását, valamint növekedési rátáját, elmondható, hogy bár a kivonattal kezelt tenyészet növekedési üteme gyorsabb volt, mint a kontroll tenyészeté, szignifikánsan mégsem különböztek egymástól (14. ábra).

A $0,4 \times 10^6$ sejt mL⁻¹ (1:4 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése *C. ovata* kivonattal. A négyszeres sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészet sejtszáma a tenyésztési idő végéig folyamatosan emelkedett (~20,6-szorosára; 8. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája ~0,25 volt (6. melléklet). A *C. ovata* sejtkivonatával kezelt négyszeres sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek 14. napon mért sejtszáma közel 22,3-szor volt magasabb az inokulált sejtszámnál (10. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája 0,36 volt (6. melléklet). A *C. ovata* kivonattal kezelt tenyészet a tenyésztési idő első napjaiban intenzívebben növekedett, mint a kontroll tenyészet, viszont a tenyésztési idő végén csupán 9% volt az eltérés a két tenyészet sejtszáma között a kezelt tenyészet javára (14. ábra).



14. ábra A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek, valamint az *M. aeruginosa* kontroll tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató növekedési görbéket jelölik. c*: csak a 0-5 nap között van szignifikáns eltérés a c jelzésű $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* tenyészet növekedésétől.

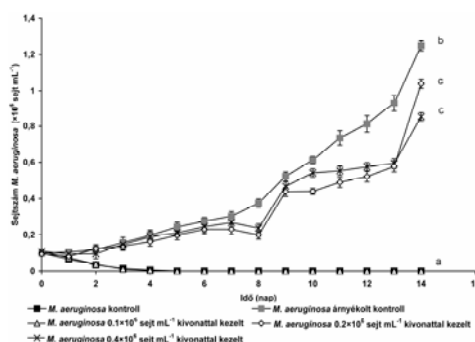
4.2.2.2. Egységnyi inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* tenyészetek kezelése különböző mennyiségű *C. ovata* kivonattal

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:1 aránynak megfelelő) *C. ovata* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma, hasonlóan az árnyékolás nélküli kontroll tenyészetéhez az 5. napra a kimutatási határ alá (100 sejt mL^{-1}) csökkent (15. ábra).

A $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (2:1 aránynak megfelelő) *C. ovata* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetekben az árnyékolás nélküli kontroll tenyésztettől eltérően a sejtek életben maradtak (15. ábra), növekedésük a tenyésztési idő első napjaiban (0-8. nap) szignifikánsan alacsonyabb, mint az árnyékolt kontroll tenyészet esetében tapasztalt (15. ábra). A kontroll tenyészetéhez viszonyított első 8 napban bekövetkezett növekedés-csökkenés a növekedési rátákkal is jól nyomon követhető (7. melléklet).

A $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (4:1 aránynak megfelelő) *C. ovata* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetekben a *Microcystis* sejtek, hasonlóan az előzőekhez, szintén életben maradtak. Azonban ezen tenyészet esetében is igaz, hogy a tenyésztési idő végére a kezelt tenyészetekben a sejtek száma alatta maradt az árnyékolt kontroll tenyészetének, annak csupán 68%-a (15. ábra). Ezen kezelés során már a

tenyésztés teljes ideje alatt szignifikánsan alacsonyabb a sejtszám változás az árnyékolt kontroll tenyészetben mért értékekhez képest (15. ábra, 7. melléklet).



15. ábra 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} *C. ovata* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek, valamint az *M. aeruginosa* kontroll tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató növekedési görbéket jelölik.

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

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészet sejtszáma a 4.1.1.2. fejezetben leírtak szerint alakult, az 5. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent.

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámú árnyékolt *M. aeruginosa* kontroll tenyészet sejtszáma a 4.1.1.2. fejezetben leírtak szerint változott.

A $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:1 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma a 14. napra több, mint 33-szorosára nőtt (16. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája 0,25 volt. A kezelt tenyészet sejtszámában bekövetkező változásokat összehasonlítva az árnyékolt kontroll tenyészetben végbemenő változásokkal elmondható, hogy a kezelt tenyészetben a *M. aeruginosa* sejtek növekedése szignifikánsan magasabb, mint az árnyékolt kontroll tenyészetben.

A $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:2 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma a 14. napra a kiinduláskor mért sejtszámhoz képest ~42-szeresére nőtt (16. ábra). A

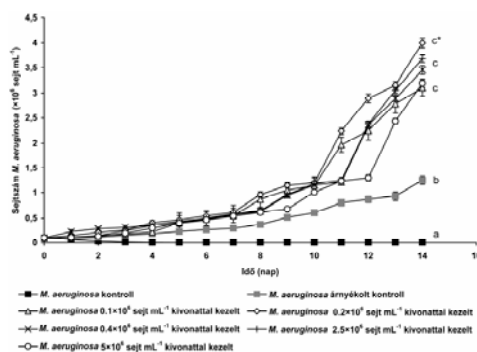
tenyészet átlagos növekedési rátája $\sim 0,31$ volt. A kezelt tenyészet és az árnyékolt kontroll tenyészet közti szignifikáns különbségek már a tenyésztési idő első napjaiban megmutatkoztak, s a tenyésztés teljes ideje alatt megfigyelhetők voltak: a kezelt tenyészet sejtszáma a 14. napon több, mint háromszorosa az árnyékolt kontroll tenyészet sejtszámának. A tenyészet sejtkivonattal történő kezelése tehát az első napokban megnöveli a sejtek szaporodási rátáját, és hatással van a sejtek hosszú távú növekedési ütemére is (pozitívan befolyásolja azt; 8. melléklet).

A $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:4 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma a 14. napon több, mint 34-szer volt magasabb, mint a kiindulási sejtszám (16. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája 0,32 volt. Szembetűnő az inkubációs idő első napjaiban, valamint a tenyésztés teljes ideje alatt a szignifikáns eltérés az árnyékolt kontroll tenyészet növekedéséhez képest: a kezelt tenyészet átlagos növekedési rátája 52%-kal nagyobb, mint az árnyékolt kontroll tenyészeté (8. melléklet). A két tenyészet első két napra vonatkoztatott átlagos növekedési rátája között több mint tízszeres különbség van (az árnyékolt kontroll tenyészeté 0,06, míg a sejtkivonattal kezelt tenyészeté 0,66), a tenyészetek 14. napon mért sejtszáma közt pedig közel 2,8-szoros az eltérés (a kezelt tenyészeté a nagyobb, 16. ábra). Ezek alapján elmondható, hogy a sejtkivonattal való kezelés ennél a tenyészetnél is jelentős rövid-, és hosszú távú sejtszám-növekedéshez vezetett a kontroll tenyészetekhez képest.

A $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} (1:25 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő végére közel 38-szorosára nőtt (16. ábra). Összehasonlítva a kezelt tenyészet és az árnyékolt kontroll tenyészet növekedési rátáját, valamint sejtszám-változását a következők mondhatók el: A kezelt tenyészet növekedési rátája (mind az átlagos, mind a napi) szignifikánsan magasabb volt az árnyékolt kontroll tenyészeténél (8. melléklet). A sejtkivonattal kezelt tenyészet 14. napon mért sejtszáma messze meghaladta az árnyékolt kontroll tenyészetét (közel háromszor magasabb volt, 14. ábra).

Az 5×10^6 sejt mL^{-1} (1:50 aránynak megfelelő) *M. aeruginosa* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszáma a 14. napon ~ 32 -szer volt magasabb a 0. napon mért sejtszámnál (16. ábra). A tenyészet átlagos növekedési rátája 0,2 volt. A kezelt tenyészet

növekedési rátáját összehasonlítva az árnyékolt kontroll tenyészetével elmondható, hogy a kezelt tenyészet növekedési rátája (mind az 1 napra vonatkoztatott, mind pedig az átlagos növekedési ráta) magasabb volt, mint az árnyékolt kontroll tenyészeté (8. melléklet). A kezelt tenyészet 14. napon mért sejtszáma is közel 2,6-szor magasabb volt az árnyékolt kontroll tenyészeténél (16. ábra). Összehasonlítva ezen tenyészet növekedési jellemzőit az eddig bemutatott kivonattal kezelt tenyészetekével, az látható, hogy sem a tenyészet átlagos növekedési rátája, sem pedig 14. napon mért sejtszáma nem haladta meg a többi tenyészetét, azok közt a tenyésztés teljes ideje alatt szignifikáns különbségek nem mutathatók ki; sőt, az átlagos növekedési ráta ezen kezelés hatására volt a legalacsonyabb.



16. ábra Az *M. aeruginosa* sejtkivonatával kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek, valamint az *M. aeruginosa* kontroll és árnyékolt kontroll tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató növekedési görbéket jelölik. c*: csak a 0-3 nap között van szignifikáns eltérés a c jelzésű $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} -nek megfelelő mennyiségű kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészet növekedésétől.

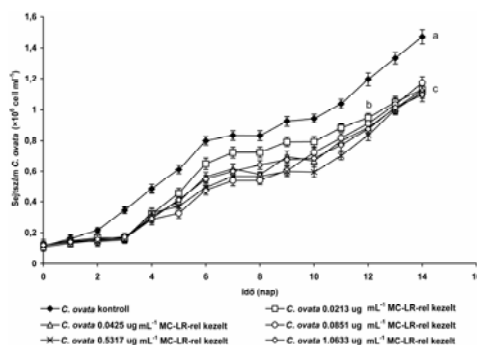
4.3. A *M. aeruginosa* tisztított toxinjával kezelt tenyészetek

4.3.1. *C. ovata* tenyészetek kezelése MC-LR-rel

Ezen kísérletek alkalmával $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} sejtszámú *C. ovata* tenyészeteket kezeltünk $0,0213 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,0425 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,0851 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,532 \mu\text{g mL}^{-1}$ valamint $1,063 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR toxinnal. Ezek a toxinmennyiségek megfeleltek az 1:1, 1:2, 1:4, 1:25 és 1:50

sejtszámarányú kevert tenyészetek (és a *M. aeruginosa* sejtkivonatával kezelt *C. ovata* tenyészetek) toxintartalmának. A toxinnal kezelt tenyészetek növekedési rátája, valamint sejtszáma mind az első napokban, mind pedig a 14 napos inkubáció végére szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll tenyészet esetében tapasztalható sejtszám (17. ábra). A kezelt tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő 72. órájára a kontroll tenyészetek sejtszámához viszonyítva több mint 50%-al csökkent, majd a tenyészetek „regenerációja” volt megfigyelhető, bár a sejtszám a kezelés végére sem érte el a kontrollban mérhető értéket. Meg kell jegyezni, hogy a $0,0425 \mu\text{g mL}^{-1}$ és az ennél magasabb toxinmennyiséggel kezelt tenyészetek között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (17. ábra, 9. melléklet); valamint, hogy a legmagasabb MC-LR koncentráció kisebb mértékben gátolta a *C. ovata* tenyészet növekedését, mint az 1:50 aránynak megfelelő mértékben alkalmazott sejtkivonat (13. és 17. ábra).

A toxinnal kezelt tenyészetekben nem tapasztaltunk változást a *C. ovata* sejtek morfológiájában.

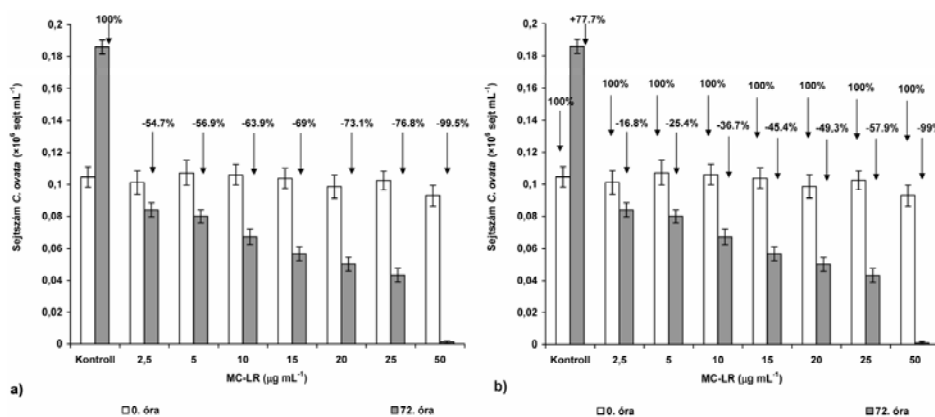


17. ábra Az MC-LR-rel kezelt *C. ovata* tenyészetek, valamint a *C. ovata* kontroll tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az idő függvényében. Az eltérő kisbetűk a szignifikáns különbséget mutató növekedési görbéket jelölik.

4.3.2. A toxikológiai teszt eredményei

A *C. ovata* tenyészetek növekedésében bekövetkező változásokat 72 órával a kezelést követően detektáltuk. A *C. ovata* tenyészetek 72 órás toxin-kezelésének eredményei alapján megállapítható, hogy az inkubációs idő végére már a $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ toxin-mennyiség is több mint

50%-al csökkentette a toxinkezelt tenyészet sejtszámát a kontroll tenyészetéhez képest (18a. ábra). A toxin-koncentrációk növekedésével egyre nő a kezelt tenyészetek 3. napon mért sejtszáma és a kontroll tenyészetek 3. napon mért sejtszáma közt a különbség (18a. ábra). 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ toxin-koncentráció hatására a *C. ovata* sejtek száma a 0. óránál számolt értékhez képest 99,04%-kal csökken a 3. napra (18b. ábra). A magas toxinkoncentrációk sem okoztak morfológia változást a *Cryptomonas* sejtekben.



18. ábra A 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ és 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ toxinnal kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszám-növekedése 72 órával a kezelés megkezdése után. a. A tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások a kontroll tenyészet 0. órán mért sejtszámához viszonyítva. b. A tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások az adott tenyészet 0. órán mért sejtszámához viszonyítva.

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

5.1. Keveret tenyészetek

5.1.1. 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. (9. ábra).

A $0,1 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészet és az 1:1 arányú kevert tenyészet *M. aeruginosa* sejtszáma közötti jelentős eltérés véleményünk szerint elsődlegesen a tenyészetben jelen lévő *C. ovata* sejtek okozta árnyékoló hatásnak köszönhető. Ezt a feltevést, az is alátámasztja, hogy a $0,1 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ sejtszámú árnyékolt *M. aeruginosa* kontroll tenyészetekben a sejtek életben maradtak. Az árnyékolt kontroll tenyészet inokulálási és nevelési körülményei megegyeztek a $0,1 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészetével, azzal a kivétellel, hogy a tenyészetet az inokulálás napján alufólia segítségével árnyékoltuk. Ezzel azt akartuk bizonyítani, hogy az árnyékolás nélküli *M. aeruginosa* kontroll tenyészetben a sejtek pusztulásának egyik fő oka az árnyékolás hiánya. 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 akár $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 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, Boumnich 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 ($0,1 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$

¹⁾ inokulált sejtek még a $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitást sem képesek elviselni.

A kevert tenyészetekben az *M. aeruginosa* sejtszámban 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. Ezt támasztja alá a következő megfigyelés is: a *C. ovata* sejtek nitrátfelvétele az első hét végén még a *M. aeruginosa* 2× kontroll tenyészetében mért értéknek is kétszerese, az ugyanolyan sejtszámú *M. aeruginosa* kontroll tenyészetének pedig több, mint háromszorosa. Bár szorosan nem ezen összeállítás-sorozathoz tartoznak a *C. ovata* 2× és 4× kontroll tenyészetek nitrátfelvételének eredményei, mégis itt hívnám fel a figyelmet arra, hogy összehasonlítva ezen tenyészetek nitrát-fogyásának eredményeit a *M. aeruginosa* 2× és 4x kontroll tenyészetekével, már az első napon látszanak a két faj tápanyagfelvétele közti jelentős különbségek: ugyanazon összeállítású tenyészetekben a *C. ovata* sejtek nitrátfelvétele négyszer, ill. nyolcszor magasabb, mint a *M. aeruginosa* sejté. 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, vagyis aktív mikrocisztin kiválasztás nem volt megfigyelhető a kontroll *M. aeruginosa* tenyészetekben sem, és *C. ovata* sejtek jelenlétében sem. A mikrocisztinek, szemben más cianotoxinokkal, többnyire csak igen kis mennyiségben választódhatnak 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 és munkatársai (1995) a sejtfal környékéről kimutatott mikrocisztinek jelenlétéből arra következtettek, hogy aktív toxinkibocsátásról lehet szó. Azonban Rohrlack és Hyenstrand (2007) radioaktív nyomkövetéssel végzett kísérletei során nem figyeltek meg extracellulárisan megjelenő toxinformákat.

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 törzsé, 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).

5.1.2. 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. (11a. ábra).

A 2:1 arányú kevert tenyészetekben, amelyekben az inokulált *C. ovata* sejtek száma kétszerese volt az *M. aeruginosa* sejtek számának, a tenyészet *C. ovata* sejtszáma magasabb volt, mint a kontroll tenyészetekben; növekedési rátája a kontroll tenyészetben mérhetőhöz megközelítő értéket ért el (11b. ábra). A sejtszám-változásban és a növekedési rátában megmutatkozó szignifikáns különbségek (3. melléklet) feltehetően annak köszönhetőek, hogy a tenyészetben jelenlévő *M. aeruginosa* sejtek száma az inkubációs idő első hetében hol emelkedett, hol pedig csökkent. A csökkenések alkalmával a sejtek lizálása lehetővé tette, hogy a *C. ovata* szaporodását serkentő vegyületek kerüljenek a tápoldatba. A kevert tenyészetekben a *M. aeruginosa* növekedése szignifikánsan alacsonyabb, mint az árnyékolt kontroll tenyészetekben a *Microcystis* növekedése (11b. ábra).

A 4:1 arányú kevert tenyészetekben a *C. ovata* sejtszáma és növekedési rátája magasabb, mint a kontroll tenyészeté (11c. ábra, 3. melléklet). Az *M. aeruginosa* sejtszáma jóval az árnyékolt kontroll sejtszáma alatt maradt a 4. naptól. Azokban az esetekben tehát, mikor a *C. ovata* 0. napon mért sejtszáma magasabb volt a *M. aeruginosa* sejtszámánál, a *M. aeruginosa* sejtek száma alatta maradt a *C. ovata* sejtszámának, illetve az árnyékolt kontroll *M. aeruginosa* tenyészetek sejtszámának (11b-c. ábra). Vagyis ebben az esetben is elmondható, hogy a *C. ovata* (negatív) hatással van a *M. aeruginosa* szaporodására, aminek egyik magyarázata lehet a *Cryptomonas* sejtek magasabb

tápanyag-felvételi rátája, valamint a Cryptophyták által termelt antibakteriális vegyületek jelenléte (Kellam és Walker 1989).

Összességében 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.

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 túlnövik a *Microcystis* sejteket. Vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy a *C. ovata* sejtek növekedési rátája a 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.

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.

5.2. Sejtkivonatokkal kezelt tenyészetek

5.2.1. 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 (13. ábra). 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* tenyésztett végzett kísérletek esetében csak a magas (1:50 arálynak megfelelő) *M. aeruginosa* sejtkivonat mennyiség esetén volt megfigyelhető ez a gátló hatás. Az 1:50 arálynak 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 (9. és 14. ábra). Ennek oka többféle, egymással akár összefüggő jelenséggel is magyarázható: (i) a sejtkivonat más mikrocisztin variánst (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 fikobilinekhez kötött, az alkalmazott MECK technikával nem kimutatható formában volt jelen (Jüttner és Lüthi 2008). A különböző mikrocisztin variánsok toxikussága pedig 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 sejtszamarányoknak 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), *Microcystis aeruginosa* nem-toxikus törzs (Cianobaktérium) taxonoknál figyelte meg a növekedés stimulálását. Bár esetükben, szemben a *C. ovata* tenyészetekben megfigyelttel, 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 *Poteroochromonas* sp. esetében figyeltek meg sejtszám-növekedést 0,1-4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR és MC-RR kezelés hatására. Az is ismert, hogy egyes cianobaktérium törzsek (*Calothrix* sp., *Phormidium animale*; *Nostoc* sp. és további 33 szabadon élő, ill. szimbióta cianobaktérium törzs; *Anabaena* sp., *Anabaenopsis* sp., *Calothrix* sp., *Chlorogloeopsis* sp., *Cylindrospermum* sp., *Gloeotheca* sp., *Nostoc* sp., *Plectonema* sp. és *Synechocystis* sp.; *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Chroococcidiopsis* sp. és *Synechosystis* 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).

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

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

Az egységnyi sejtszámú *Cryptomonas* kivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetekben tapasztaltak alapján elmondható, hogy ez a mennyiség a kis inokulálási sejtszámú *M. aeruginosa* sejtek életben maradását nem tette lehetővé, ezekben a tenyészetekben a kontroll tenyészetekhez hasonlóan a sejtek száma az 5. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent (14. ábra) Feltételezéseink szerint, az árnyékolt kontroll tenyészetek eredményeit figyelembe véve, ennél a kísérletnél a *C. ovata* kivonat nem biztosított elegendő árnyékolást a *Microcystis* sejteknek. 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 ez a mennyiségű *C. ovata*

kivonat már növelte azok sejtszámát, ill. ebből kifolyólag természetesen növekedési rátáját (88% és 47%-kal) is (14. ábra).

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.

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

A $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *Cryptomonas* sejtkivonattal 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 (15. ábra). Ezek az eredmények jól korrelálnak a hasonló beállítású kevert tenyészetek eredményeivel (11. ábra), 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.

Richard és munkatársai (1988), valamint 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.

5.2.3. 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. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent. A $0,1 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$, $0,2 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$, $0,4 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ sejtszámnak megfelelő mennyiségű sejtkivonattal kezelt tenyészetek növekedése szignifikánsan eltért az árnyékolt kontroll tenyészet növekedésétől is, annál magasabb sejtszámot értek el (16. ábra). 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 $2,5 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ és $5 \times 10^6 \text{ sejt mL}^{-1}$ 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.

5.3. 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 sejtszámarányú 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 sejtszámaránynak 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 (17. ábra). 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 mozgásképesége 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 mikrokörnyezet: ugyanaz a koncentráció lehet toxikusabb a mikrokörnyezettől és az adott alga érzékenységtől 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 az előzőekben már említett kontrollhoz viszonyított 50%-os növekedés gátlás mellett elviselni (14a. ábra). 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 (14b. ábra). Bár ezek a kísérletek 72 órák voltak, a 14 napos vizsgálatok eredményei alapján azt feltételezzük, hogy a *C. ovata* populációk még ezen igen magasnak mondható toxinmennyiségek egyszeri direkt hatása után is képesek

lennének regenerálódni. 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 µg 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, *Poterioochromonas* – Ou et al. 2005) figyelték meg. Ezek az eredmények azonban nehezen összevethetők az általunk végzett kísérletek eredményeivel, mivel mi a vizsgálataink során a populációsztintű 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. Ennek oka igen összetett (tápanyag-interakció, fénytűrés), a *M. aeruginosa* által termelt toxin azonban feltehetően csak másodlagos szerepet játszik benne, hisz ezeknél a tenyészeteknél nem volt jelen detektálható mennyiségű extracelluláris mikrocisztin.

Abban az esetben azonban, amikor a *C. ovata* sejtek inokulálási aránya volt a magasabb, a Cryptophyta sejtek minden esetben túlnőtték a *Microcystis* sejteket. Ebben, a további eredmények ismeretében, fontos szerepet játszhattak a *C. ovata* által termelt anticianobakteriális vegyületek, melyek nagymértékben gátolhatták a *M. aeruginosa* sejtek növekedését.

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

A *M. aeruginosa* sejtek a kevert tenyészetekben minden esetben életben maradtak, a kontroll tenyészetben nevelt sejtek, ill. a *C. ovata* sejtek növekedési üteméhez viszonyítva azonban jelentős eltérések tapasztalhatók. Az eredmények alapján az mondható el, hogy az egységnyi számban inokulált *C. ovata* sejtek az ugyanilyen sejtszámban beoltott *M. aeruginosa* sejtek növekedését és életben maradását elsődlegesen feltehetően az árnyékoló hatás miatt pozitívan befolyásolták a kontroll tenyészethez képest. Abban az esetben azonban, mikor a *Microcystis* sejtek nagyobb mennyiségben ($0,2-0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1}) voltak jelen a tenyészetekben, és az egyes cianobaktérium sejtekre kevesebb tápanyag jutott, mint az előzőekben, már jobban érvényesülhetett a *C. ovata* sejtek jelenlétének interakciós hatása. A $0,2-0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} inokulált *C. ovata* tenyészetekben, ahol a *M. aeruginosa* sejtek száma $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt a 0. napon, a *Cryptomonas* sejtek feltehetően azért tudták olyan jelentős mértékben túlnőni a cianobaktérium sejteket, mert ilyen inokulálási arányok mellett már érvényesülhetett a *C. ovata* sejtek feltételezhető anticianobakteriális hatása.

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 toxicitásról 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 *C. ovata* sejtekre gyakorolt növekedést serkentő hatása szemben a kevert tenyészetekben detektálási határ alá csökkenő *Cryptomonas* sejtszámmal; (iii) a 5×10^6 sejt mL^{-1} kivonat bár növekedést gátló hatással bírt az első napokban, 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?

Az egységnyi *C. ovata* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek növekedésében bekövetkező változások is azt támasztják alá, hogy a *Microcystis* sejtek számának emelkedése, vagy ennek visszafogott jellege ilyen Cryptophyta sejtszám/kivonat mellett elsősorban a tenyészetben jelenlévő élő *Cryptomonas* sejtek számától, az élő-élő sejtek közti interakciótól, nem pedig a *C. ovata* által termelt növekedést gátló vegyületektől függött.

Azonban nagyobb *C. ovata* sejtkivonat mennyiség mellett ez az anticianobakteriális hatás már fontos szerepet játszhatott a *Microcystis* sejtszámának gátolt növekedésében.

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 is 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?

Bár már az általunk használt legkisebb toxinkoncentráció ($0,0213 \mu\text{g mL}^{-1}$) hatására is szignifikánsan alacsonyabb volt a *C. ovata* sejtszámának növekedése a kontroll tenyészetekhez viszonyítva, ami azt jelzi, hogy már kis koncentrációban is érzékeny a *C. ovata* a MC-LR jelenlétére; az ebben a kísérletsorozatban használt tiszta toxinkoncentrációk növekedést gátló hatása között azonban nem volt szignifikáns különbség, ill. a populációk minden esetben életben maradtak. Vagyis bár érzékeny az általunk vizsgált *Cryptomonas* faj, azonban ha egyszeri hatásról van szó, a populáció képes regenerálódni ezen toxinkoncentráció határai belül.

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

A $2,5\text{--}5 \mu\text{g mL}^{-1}$ toxinkoncentrációkkal kezelt tenyészet sejtszáma szignifikánsan nem különbözött az alacsonyabb toxinmennyiségekkel kezelt tenyészetekétől. A kiindulási sejtszámhoz viszonyítva ~50%-os gátlás volt megfigyelhető a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ kezelt tenyészeteknél, ill. a *C. ovata* sejtek 99,5%-a pusztult el $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ toxinkoncentráció jelenlétében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Különböző fajok közti interakciós kapcsolatok vizsgálata több évtizedes múltra tekint vissza (Cloern 1976, 1978, Keating 1978, Sukenik et al. 2002, Legrand et al. 2003, Hedger et al. 2004, Suikannen et al. 2004, Suikannen et al. 2005). Az interakciós kapcsolatok feltárása segíthet megérteni - az abiotikus tényezők együttes ismeretével - az adott faj, adott víztérben való előfordulásának, vagy hiányának lehetséges okait. Több éves periódust felölelő vizsgálatok bizonyítják, hogy az abiotikus tényezők számottevő változása nélkül is egyes években bizonyos fajok viszonylag nagy számban fordulnak elő, míg más években csak kis egyedszámmal képviseltetik magukat, vagy elő sem fordulnak az adott víztérben (Cloern 1976, 1978, Keating 1978). Ilyen esetekben kerülnek a figyelem középpontjába az adott fajra ható biotikus tényezők, mint például a predáció, a toxicitás vagy a konkurencia.

A cianotoxinok emberekre, állatokra vagy növényekre kifejtett hatásai jól ismertek (Chorus és Bartram 1999), különösen a mikrocisztinek esetében (MacKintosh et al. 1990, Sivonen et al. 1990, Carmichael 1992, Runnegar 1995), az azonban, hogy a cianotoxinok allelopatikus vegyületeknek tekinthetők-e, vitatott kérdés.

Több módszerrel lehetséges a fitoplankton együttesek egyes fajai közötti interakciós kapcsolatok, köztük az allelopatikus hatások vizsgálata: (i) axenikus tenyészetek együttnevelése; (ii) axenikus tenyészetek teljes sejtkivonattal történő kezelése; (iii) axenikus tenyészetek tisztított toxinnal történő kezelése (Sommer 1994). Munkánk során – azért, hogy minél pontosabb képet kapjunk a *C. ovata* és a *M. aeruginosa* közti interakciós kapcsolatok mibenlétéről – elvégeztük a Sommer által 1994-ben leírt egymást kiegészítő vizsgálatokat.

Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

Kevert tenyészetek

A *C. ovata* sejtek száma minden alkalommal drasztikusan lecsökkent, ha a *M. aeruginosa* inokulálási sejtszáma meghaladta a *C. ovata* inokulálási sejtszámát. Különbség csak abban volt, mikorra csökkent a sejtszám 100 sejt mL⁻¹ alá (9. ábra). Az eredmények rávilágítanak arra, hogy az adott inokulálási körélmények az alacsony stressztűrésű *C. ovata* számára már nem tolerálhatóak; az *M. aeruginosa*,

mint jó stressz-tűrő faj, túlnőtte a *C. ovata*-t. Annak magyarázatára, hogy milyen tényezők (pl. allelopatikus hatások) állnak ennek hátterében, a további vizsgálatok eredményeiből következtethetünk.

Azokban a kevert tenyészetekben, melyekben a *C. ovata* inokulálási sejtszáma magasabb volt, mint a *M. aeruginosa* sejtek száma, a *C. ovata* életben maradt és túlnőtte az *M. aeruginosa*-t (11b-c ábra). 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.

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 tenyészetének, 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 (9b-c. ábra). Ezt támaszthatja alá az a megfigyelés is, hogy az 1x-es, 2x-es és 4x-se kontroll tenyészetekben a tápanyag-felvételi ráta minden esetben a *C. ovata* sejtek esetében volt magasabb (10. és 12. ábra). Az 1:25 és 1:50 arányú tenyészeteknél nem volt lényeges különbség a kontroll tenyészet növekedési rátája és a kevert tenyészetekben található *M. aeruginosa* sejtek növekedési rátája között, ami magyarázható azzal, hogy a *C. ovata* sejtek száma már az 1. napra 100 sejt mL^{-1} alá csökkent (9d-e ábra).

Sejtkivonatokkal kezelt tenyészetek

A *M. aeruginosa* sejtkivonattal kezelt *C. ovata* tenyészetek eredményei azt bizonyítják, hogy a *M. aeruginosa* sejtkivonata szignifikánsan befolyásolja a *C. ovata* növekedését. Növekedést serkentő és gátló hatások egyaránt megfigyelhetők voltak a sejtkivonat mennyiségétől függően (13. ábra), ahogyan az más eukarióta algacianobaktérium interakció alkalmával is megfigyelhető volt (Lam és Silver 1979). Abban az esetben, amikor a *M. aeruginosa* sejtkivonat mennyisége megegyezett, vagy kétszerese volt az inokulált *C. ovata*

sejtek számának, nem tapasztaltunk jelentős eltérést a kontroll tenyészetek és a kezelt tenyészetek sejtszámában, bár ez utóbbiak növekedési rátája magasabb volt (13. ábra). A $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és a $2,5 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* sejtkivonatával kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszáma a tenyésztési idő végére meghaladta a kontroll tenyészetek sejtszámát, ami egyrészt feltehetően a sejtkivonattal tápoldatba juttatott ásványi anyagoknak volt köszönhető. Másrészt, az irodalmi adatok tükrében (Sedmak és Kosi 1998, Ou et al. 2005) akár a tápoldatba jutott mikrocisztineknek is növekedést serkentő szerepe lehet. Ezzel szemben az 5×10^6 sejt mL^{-1} *M. aeruginosa* sejtkivonat azonban már gátolta a *C. ovata* sejtek növekedését a kontroll tenyészetekéhez képest (13. ábra).

Az *M. aeruginosa* sejtkivonattal kezelt *M. aeruginosa* tenyészetek növekedése szignifikánsan eltért az árnyékolt kontroll tenyészet növekedésétől, annál magasabb sejtszámot értek el. Véleményünk szerint a kezelt tenyészetek és kontroll tenyészet fejlődésében megmutatkozó különbség oka egyrészt az árnyékoló hatásban keresendő (ahogy az a sejtkivonattal kezelt és az árnyékolás nélküli kontroll tenyészet közt megfigyelhető különbségek elsődleges oka lehetett), továbbá a sejtkivonattal tápoldatba juttatott ásványi anyagoknak, egyéb szaporodást serkentő vegyületeknek is köszönhető. Sedmak és Kosi (1998) eredményei alapján feltételezhetjük, hogy akár maguknak a *Micocystis* sejtek által termelt toxinoknak is lehet növekedést serkentő hatása. A magas arálynak megfelelő mennyiségű sejtkivonattal való kezelés mérsékelt gátló hatása a túlzott árnyékolásnak, és nem az öntoxikusságnak köszönhető.

A *M. aeruginosa* sejtkivonatokkal végzett kísérleteink eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az *M. aeruginosa* sejtkivonata csak nagy koncentrációban gátolja a *C. ovata* növekedését (ez a gátlás erősebb a tiszta toxin gátló hatásánál is (13. ábra), feltehetően összetett allelopatikus hatásnak tekinthető). Nagy mennyiségben a *M. aeruginosa* kivonat az *M. aeruginosa* tenyészetek növekedését is gátolja, ez a csekély mértékű gátlás minden bizonnyal az árnyékoló hatásnak köszönhető. Az alacsonyabb arányoknak megfelelő mennyiségű sejtkivonat növekedést serkentő hatása feltehetően azzal magyarázható, hogy a sejtek kivonatával ásványi anyagokat és más szaporodást serkentő vegyületet juttattunk a tápoldatba.

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 (14. ábra). Ha a *C. ovata* kivonat mennyisége alacsonyabb sejtszámnak felel meg, mint a kezelt *Microcystis* sejtek száma, akkor serkenti a *Microcystis* sejtek szaporodását, míg magasabb sejtszámnak megfelelő mennyiségű *Cryptomonas* kivonatok szignifikáns *M. aeruginosa* sejtszám csökkenést okoznak a kontroll tenyészetekhez képest (15. ábra). 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.

MC-LR-rel kezelt tenyészetek

A tiszta toxinnal kezelt tenyészetek és a toxikológiai tesztek eredményei alapján megállapítható, hogy a *C. ovata* mikrocisztinekre vonatkoztatva nem tekinthető érzékeny fajnak. A tiszta toxinnal való kezelés során alkalmazott toxinkoncentrációk ($0,02\text{--}1,1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) mérsékelt és visszafordítható változásokat okoztak a kezelt *C. ovata* tenyészetek sejtszámában (17. és 18. ábra). A toxikológiai tesztek azt mutatták, hogy a *C. ovata* sejtek EC_{50} értéke összevetve azt egyes vízinövények érzékenységeivel (Pflugmacher 2002) viszonylag magasnak mondható ($2,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Meg kell jegyezni azonban, hogy viszonylag széles koncentráció-tartományban hasonló érzékenységet tapasztaltunk. Ezek alapján, valamint annak ismeretében, hogy a vizsgált *M. aeruginosa* törzs nem bocsát ki detektálható mennyiségben mikrocisztineket, azt mondhatjuk, hogy a mikrocisztineknek csak másodlagos szerepe lehet a *M. aeruginosa* *C. ovata* növekedésére kifejtett erős gátló hatásában.

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 nyerskivonatóval 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 képezik.

Az eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fizikai környezet hatásai elsődlegesen 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.

7. SUMMARY

Studies of interactions between different species date back several decades (Cloern 1976, 1978, Keating 1978, Sukenik et al. 2002, Legrand et al. 2003, Hedger et al. 2004, Suikannen et al. 2004, Suikannen et al. 2005). The exploration of relationships among phytoplankton taxa can help us to understand - together with the knowledge of abiotic factors - the possible reasons of the presence or absence of a given species. Studies covering a period of several years have shown that certain species occur in relatively large numbers in some years, while only a small number of individuals represented, or may not occur in other years in the same water body, without a significant change of abiotic factors (Cloern 1976, 1978, Keating 1978). In such cases, biotic factors such as predation, competition or toxicity are in the focus of interest.

The effects of cyanotoxins on humans, animals or plants are well-known (Chorus and Bartram 1999), especially in the case of microcystins (MacKintosh et al. 1990, Sivonen et al. 1990, Carmichael 1992, Runnegar 1995). However, the question if cyanotoxins can be considered as allelochemicals is controversial.

There are many possible approaches to study allelopathy between phytoplankton species: (i) co-culturing of axenic strains; (ii) treatment of axenic strains with crude extracts of an other strain; (iii) treatment of axenic strains with purified allelochemicals/toxins (Sommer 1994). In order to get a more accurate view of the interactions of the eukaryote cryptomonad *C. ovata* and the cyanobacterium *M. aeruginosa*, the three complementary method described by Sommer (1994) were carried out during our work. Our results can be summarized as follows:

Mixed cultures

The number of *C. ovata* cells has been drastically decreased in all cases, when *M. aeruginosa* inoculation cell number was higher than *C. ovata* inoculation cell number. The only difference was the time, when the number of cells reduced below 100 cells mL⁻¹ (Fig. 9). The results highlight that the given inoculating circumstances are not favorable for the low stress-tolerant *C. ovata*. *M. aeruginosa*, as a good stress-tolerant organism outgrew *C. ovata*. It can be possible to explain on the basis of the results of further experiments, what factors (e.g. allelopathic effects) are behind this phenomenon.

C. ovata survived and outgrew *M. aeruginosa* in mixed cultures, in which *C. ovata* inoculation cell number was higher than that of *M. aeruginosa* (Fig. 9b-c). 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.

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 (Fig. 9b-c). 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 (Fig. 10 and 12). There were no significant differences among *M. aeruginosa* growth rates in 1:25 and 1:50 mixed cultures and control cultures, which can be explained by the fact that *C. ovata* cell numbers fell below 100 cells mL⁻¹ already on the first day (Fig. 9d-e).

Crude extract treated cultures

The results of *C. ovata* cultures treated with the crude extract of *M. aeruginosa* show that the crude extract of the cyanobacterium significantly affects the growth of the cryptomonad. Both growth stimulatory and inhibitory effects were observed depending on the amount of cell extracts (Fig. 13), as it was observed in interactions of other eukaryotic algae and cyanobacteria (Lam and Silver 1979). When *M. aeruginosa* cell extracts were in the same amount, or twice of the inoculated number of *C. ovata* cells, there were no significant differences observed between control and treated cultures, although the growth rate of the latter was higher (Fig. 13). Cell numbers of *C. ovata* cultures treated with 0.4×10^6 cells mL⁻¹ and 2.5×10^6 cells mL⁻¹ *M. aeruginosa* crude extracts exceeded the numbers of cells in the control cultures at the end of the experiments, probably due to the minerals added to the culture medium with the extract. On the other hand, in the light of literary data (Sedmak and Kosi 1998, Ou et al. 2005)

microcystins also could have a role in growth stimulation. In contrast, the 5×10^6 cells mL⁻¹ *M. aeruginosa* crude extract, however, inhibited *C. ovata* growth compared to control cultures (Fig. 13).

The growth of *M. aeruginosa* cultures treated with its own crude extracts differed significantly from growth of the shaded control cultures, they reached higher cell numbers. In our opinion, the differences between treated and control cultures were due to shading effects (as it could be the primary reason of the differences observed between the crude extracts treated and unshaded control cultures). Furthermore, minerals and other stimulatory compounds also could cause increased growth. It can be also assumed that toxins produced by *Microcystis* themselves could have growth-enhancing effect, based on the results of Sedmak and Kosi (1998). The high inhibitory effect of high amounts of crude extract can be related to over-shading, and not due to self toxicity.

Summarizing the results of our experiments we can conclude that crude extract of *M. aeruginosa* inhibits the growth of *C. ovata* only in high concentration (the inhibitory effects were stronger than in the case of pure toxin (Fig. 13), presumably complex allelopathic effects can be considered). Large quantities of cyanobacterial extracts inhibited the growth of *M. aeruginosa* cultures; this slight inhibition is probably due to the shading effect of the extract. The growth stimulating effect of extracts adequate to lower rates probably can be explained by minerals and other stimulating compounds content of the extracts.

The growth of *M. aeruginosa* cultures treated with *C. ovata* crude extract was not affected, when the amount of crude extract was adequate to the cell number of the cyanobacterium (Fig. 14). *C. ovata* extract corresponding to lower cell number stimulated the growth 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 (Fig. 15). 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.

MC-LR treated cultures

The results of pure toxin-treated cultures and toxicology tests showed that *C. ovata* can not be considered as sensitive species to microcystins. The used toxin concentrations in pure toxin treatments (0.02 to $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) caused moderate and reversible changes in the cell numbers of treated *C. ovata* cultures (Fig. 17 and 18). 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 (Pflugmacher 2002). It should be noted, however, that similar sensitivity was observed in a relatively wide range of concentrations. Based on these data, and knowing that the tested *M. aeruginosa* strain do not emit detectable amounts of microcystins, we can say that these toxins could have only a secondary role in the strong inhibition of *C. ovata* growth.

Nowadays experiments modeling 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.

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Grigorszky Istvánnak és Prof. Dr. Borbély Györgynek irányomban tanúsított végtelen türelmükért és megértésükért. Bátran fordulhattam hozzájuk szakmai kérdéseimmel, a téma kidolgozása során felmerülő problémáimmal, aggályaimmal. Köszönöm Nekik, hogy biztosították számomra a kísérletek elvégzéséhez, és a megszületett eredmények „nyilvánosságra” hozatalához szükséges - mind szellemi, mind anyagi - háttérrel.

Köszönettel tartozom a Hidrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy a disszertációm zavarmentesen, baráti légkörben írhattam meg. Köszönöm a segítséget, a bátorítást és a bölcs gondolatokat Prof. Dr. Dévai Györgynek és Dr. Nagy Sándor Alexnek, akiknek mindig volt egy jó szava hozzám, s akikhez bátran fordulhattam mind szakmai, mind pedig nyelvtani kérdésekben.

Külön köszönöm a segítséget Dr. Mikóné Dr. Hamvas Mártának, akinek mindig volt egy perce meghallgatni engem, átolvasni a feljegyzéseimet, és a helyes útra téríteni kusza gondolataimat. Köszönöm Dr. Vasas Gábornak a lényegre törő, gyakran zavarba ejtő, de mindig elgondolkodtató kérdéseit. Köszönöm Dr. Jámbrik Katalinnak a szakmai jellegűnek álcázott baráti beszélgetéseket, továbbá, hogy a legnagyobb elfoglaltsága idején is volt mindig arra ideje, hogy meghallgasson és bátorítson, hogy menjek tovább a megkezdett úton. Köszönettel tartozom Havelant Katalinnak, aki mindig mindent megtett, amit csak kértem tőle, és mindig volt ideje egy kis lélekápolásra.

Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Ács Évának, Prof. Dr. Kiss Keve Tihamérnak és Dr. Borics Gábornak, akik segítettek nekem eligazodni az algák igen bonyolult és mégis nemesen egyszerű világában. Továbbá köszönöm Dr. Várbíró Gábornak, hogy segített eligazodni a statisztika útvesztőjében.

Köszönöm a Nemaform Kft. valamennyi dolgozójának – Dr. Tóth Tímeának, Dr. Lakatos Tamásnak és Somogyi Istvánnak - a sok-sok türelmet, amit irányomban tanúsítottak.

Utoljára, de nem utolsó sorban pedig köszönöm a szeretetet, türelmet férjemnek, és egyben munkatársamnak, Dr. Bácsi Istvánnak, hugaimnak, „szüleimnek”, és sógorkámnak, akik mindig ott álltak mögöttem, mikor szükség volt rájuk.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ács, É., K. Szabó, K. T. Kiss & F. Hindák (2003) Benthic algal investigations in the Danube river and some of its main tributaries from Germany to Hungary. *Biologia* 58: 545-554.
- Ács, É., A. K. Borsodi, É. Kiss, K. T. Kiss, K. É. Szabó, P. Vladár, G. Várbíró & Gy. Záray (2008) Comparative algological and bacteriological examinations on biofilms developed on different substrata in a shallow soda lake. *Aquatic Ecology* 41: pp. 11
- Ahlgren, G., L. Lundstedt, M. Brett & C. Forsberg (1990) Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *Journal of Plankton Research* 12: 809-818.
- 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.
- Bartova, K., K. Hilscherova, P. Babica & B. Marsalek (2011b) Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology* 23: 967–973.
- Beattie, K. A., J. Ressler, C. Wiegand, E. Krause, G. A. Codd, C. E. W. Steinberg & S. Pflugmacher (2003) Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic Toxicology* 62: 219–226.
- 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* Kützinger (Cyanobacteria) species. Archive für Hydrobiologie Supplement 161: 405-415.
- B-Béres, V., I. Grigorszky, G. Vasas, G. Borics, G. Várbiro, 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* Kützinger isolated from the El Kansera (Morocco) eutrophic impoundment. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 37: 191-198.
- Buric, Z., K. T. Kiss, É. Ács, D. Vilicic, K. C. Mihalic & M. Caric (2007) The occurrence and ecology of the centric diatom *Cyclotella choctawhatcheeana* Prasad in a Croatian estuary. *Nova Hedwigia* 84: 135-153.
- Byth, S. (1980) Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia* 2: 40-42.
- Carmichael, W. W. (1992) Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445-459.
- Carmichael, W.W. (1994) The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78-86.
- 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.
- Christoffersen, K. (1996) Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35: 42–50.
- 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.
- Davies, J. (2006) Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 496–499.
- Dokulil, M. & J. Padisák (1994) Long-term compositional response of phytoplankton in a shallow, turbid environment, Neusiedlersee, Austria/Hungary. *Hydrobiologia* 275/276: 125-137.
- 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* Kutzing on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. *Allelopathy Journal* 26: 275-289.
- Engelke, C. J., L. A. Lawton & M. Jaspars (2003) Elevated microcystin and nodularin levels in cyanobacteria growing in spent medium of *Planktothrix agardhii*. *Archiv für Hydrobiologie* 158: 541–550.
- 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.
- Fahnenstiel, G. L., H. J. Carrick & R. Iturriaga (1991) Physiological, characteristics and food-web dynamics of *Synechococcus* in lakes Huron and Michigan. *Limnology and Oceanography* 36: 219-234.
- 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.
- Ferrao-Filho, A. S. & B. Kozlowsky-Suzuki (2011) Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs* 9: 2729-2772.
- Francis, G. (1978) Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11-12.

- George, D. G., D. P. Hewitt, J. W. G. Lund & W. J. P. Smyly (1990) The relative effects of enrichment and climate change on the long-term dynamics of *Daphnia* in Esthwaite Water, Cumbria. *Freshwater Biology* 23: 55-70.
- Grigorszky, I., G. Borics, J. Padisák, B. Tóthmérész, G. Vasas, S. A. Nagy & Gy. Borbély (2003) Factors controlling the occurrence of Dinophyta species in Hungary. *Hydrobiologia* 506: 203-207.
- Gross, E. M., S. Hilt, P. Lombardo & G. Mulderij (2007) Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton—state of the art and open questions. *Hydrobiologia* 196: 77-88.
- Ha, J. H., T. Hidaka & H. Tsuno (2009) Quantification of toxic microcystis 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.
- Hardin, G. (1960) The competitive exclusion hypothesis. *Science* 131: 1292-1297.
- 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.
- Hu, Z. Q., Y. D. Liu, D. H. Li & A. Dauta (2005) Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia* 534: 23-29.
- Huisman, J. & F. J. Weissing (1994) Light-limited growth and competition for light in well-mixed aquatic environments: an elementary model. *Ecology* 75: 507-520.

- Huisman, J. & F. J. Weissing (1999) Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature* 402: 407-410.
- Huisman, J. & F. J. Weissing (2001) Biological conditions for oscillations and chaos generated by multispecies competition. *Ecology* 82: 2682–2695.
- Humble, A., G. M. Gadd & G. A. Codd (1994) Polarographic analysis of the interactions between cyanobacterial microcystin (hepatotoxin) variants and metal cations. In: VIII International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Florence pp. 82.
- Hussain, A., M. Krischke, T. Roitsch & S. Hasnain (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Current Microbiology* 61: 361-369.
- Hutchinson, G. E. (1961) The paradox of the plankton. *American Naturalist* 95: 137–145.
- Inderjit & K. M. M. Dakshini (1994) Algal allelopathy. *Botanical Review* 61: 28–44.
- Infante, A. & S. E. B. Abella (1985) Inhibition of *Daphnia* by *Oscillatoria* in Lake Washington. *Limnology and Oceanography* 30: 1046-1052.
- Jaiswal, P., P. K. Singh & R. Prasanna (2008) Cyanobacterial bioactive molecules-an overview of their toxic properties. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 701–717
- 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.
- Jones, G.J. & P. T. Orr (1994) Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibitory assay. *Water Research* 28: 871-876.
- Jüttner, F. & H. Lüthi (2008) Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806. *Toxicon* 51: 388-397.
- Kaebernick, M., B. A. Neilan, T. Borner & E. Dittmann (2000) Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3387–3392.

- Kardinaal, W. E. A., L. Tonk, I. Janse, S. Hol, P. Slot, J. Huisman & P. M. Visser (2007) Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful Cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2939–2946.
- Kearns, K. D. & M. D. Hunter (2000) Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology* 2: 291–297.
- 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.
- Kearns, K. D. & M. D. Hunter (2002) Algal extracellular products suppress *Anabaena flos-aquae* heterocyst spacing. *Microbial Ecology* 43: 174–180.
- Keating, K. I. (1977) Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake. *Science* 196: 885–886.
- Keating, K. I. (1978) Blue-green algal inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic to eutrophic community structure. *Science* 199: 971–973.
- 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.
- Kersting, K. (1985) Properties of an aquatic micro-ecosystem. V. Ten years of observations of the prototype. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 22: 3040–3045.
- Kiss, K. T. (2004) Cryptophyta divízió. In: Ács, É. & K. T. Kiss (eds) *Algológiai praktikum*. ELTE Eötvös Kiadó. Budapest p. 185–188.
- Kolodny, N. H. D. Bauer, K. Bryce, K. Klucevsek, 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.
- Komárek, J. & K. Anagnostidis (1999) Süßwasserflora von Mitteleuropa. 19/1 – Cyanoprokaryota, Chroococcales. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin pp. 548.

- Kromkamp, J. (1987) Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 457-465.
- Kugrens, P. & B. L. Clay (2003) Cryptomonads. In: Wehr, J., J. Thorp & R. Sheath (eds.) *Freshwater Algae of North America*. Elsevier Science. New York. p. 715-755.
- 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.
- Lawton, L. A. & C. Edwards (2001) Purification of microcystins. *Journal of Chromatography A* 912: 191–209.
- Leao, P. N., M. T. S. D. Vasconcelos & V. M. Vasconcelos, 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 35: 271-282.
- Leflaive, J. & L. Ten-Hage (2007) Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52: 199–214.
- Legrand, C., K. Rengefors, G. O. Fistarol & E. Graneli (2003) Allelopathy in phytoplankton—biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42: 406–419.
- Lindholm, T. & J. A. O. Meriluoto (1991) Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 48: 1629-1634.
- Lippy, E. C. & J. Erb (1976) Gastrointestinal illness at Sewickley, P.A. *Journal of American Water Work Association* 68: 606-610.
- Lukac, M. & R. Aegerter (1993) Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31: 293-305.
- MacKintosh, C., K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen & G. A. Codd (1990) Cyanobacterial MCY-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264: 187-192.
- 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. Tímár & 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.
- McElhiney, J., L. A. Lawton & C. Leifert (2001) Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. Toxicon 39: 1411-1420.
- 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.
- Mohamed, Z. A. (2002) Allelopathic activity of *Spirogyra* sp.: stimulating bloom formation and toxin production by *Oscillatoria agardhii* in some irrigation canals, Egypt. Journal of Plankton Research 24: 137-141.
- Mundt, S. S. Kreitlow, A. Nowotny & U. Effmert (2001) Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. International Journal of Hygiene and Environmental Health 203: 327-334.
- 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 *Anabeana 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 *Anabeana 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., C. S. Reynolds & U. Sommer (1993) Intermediate disturbance hypothesis in phytoplankton ecology. Developments in Hydrobiology 81. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 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., C. Wiegand, A. Oberemm, K. A. Beattie, E. Krause, G. A. Codd & C. E. W. Steinberg (1998) Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. Biochimica et Biophysica Acta 1425: 527–533.
- Pflugmacher, S., C. Wiegand, K. A. Beattie, G. A. Codd & C. E. W. Steinberg (1998) Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin

- microcystin-LR by aquatic macrophytes. *Journal of Applied Botany* 72: 228–232.
- Pflugmacher, S., G. A. Codd & C. E. W. Steinberg (1999) Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environmental Toxicology* 14: 111–117.
- Pflugmacher, S. (2002) Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystem. *Environmental Toxicology* 17: 407–413.
- 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.
- Potts, M., H. Sun, K. Mockaitis, P. J. Kennelly, D. Reed & N. K. Tonks (1993) A protein- tyrosine/serine phosphatase encoded by the genome of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. *Journal of Biological Chemistry* 268: 7632–7635.
- Prepas, E. E., B. G. Kotak, L. M. Campbell, J. C. Evans, S. E. Hrudey & 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.
- Rengefors, K. & C. Legrand (2001) Toxicity in *Peridinium aciculiferum* – an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 46: 1990–1997.
- Reynolds, C. S. (1984) Phytoplankton periodicity: The interaction of form, function and environmental variability. *Freshwater Biology* 14: 111–142.

- Reynolds, C. S., J. Padisák & U. Sommer (1993) Intermediate disturbance in the ecology of phytoplankton and the maintenance of species diversity: a synthesis. *Hydrobiologia* 249: 183– 88.
- Reynolds, C. S. (ed.) (2006) *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge pp. 535.
- Rohrlack, T. & P. Hyenstrand (2007) Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia* 46: 277-283.
- Runnegar, M., N. Berndt, S. M. Kong, E. Y. C. Lee & L. F. Zhang (1995) In-vivo and in-vitro binding of microcystin to protein phosphatase-1 and phosphatase-2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 162-169.
- 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.
- Schatz, D., Y. Keren, A. Vardi, A. Sukenik, S. Carmeli, T. Borner, E. Dittmann & A. Kaplan (2007) Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9: 965–970.
- Scheffer, M. (1991) Should we expect strange attractors behind plankton dynamics: and if so, should we bother? *Journal of Plankton Research* 13: 1291–1305.
- Scheffer, M., S. Rinaldi, J. Huisman & F. J. Weissing (2003) Why plankton communities have no equilibrium: solutions to the paradox. *Hydrobiologia* 491: 9–18.
- Sedmak, B. & G. Kosi (1998) The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research* 20: 691-708.
- Sedmak, B. & T. Elersek (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.
- Sharma, V. K., T. M. Triantis, M. G. Antoniou, X. He, M. Pelaez, C. Han, W. Song, K. E. O'Shea, A. A. de la Cruz, T. Kaloudis, A. Hiskia & D. D. Dionysiou (2012) Destruction of microcystins by

- conventional and advanced oxidation processes: a review. *Separation and Purification Technology* 91: 3-17.
- Shi, L., W. W. Carmichael & I. Miller (1995) Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology* 163: 7-15.
- Shi, L., W. W. Carmichael & P. J. Kennelly (1999) Cyanobacterial PPP family protein phosphatases possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10039-10046.
- 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.
- Sivonen, K., W. W. Carmichael, M. Namikoshi, K. L. Rinehart, A. M. Dahlem & S. I. Niemeka (1990) Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain-152. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2650-2657.
- Sommer, U. (1982) Vertical niche separation between two closely related planktonic flagella species (*Rhodomonas lens* and *Rhodomonas minuta* var. *nanoplanctica*). *Journal of Plankton Research* 4: 137-142.
- Sommer, U. (1985) Comparison between steady state and non-steady state competition: experiments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 30: 335-346.
- 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.
- Stutzman, P. (2006) Food quality of gelatinous colonial chlorophytes to the freshwater zooplankters *Daphnia pulicaria* and *Diaptomus oregonensis*. *Freshwater Biology* 34: 149-153.

- Suikkanen, S., G. O. Fistarol & E. Granéli (2004) Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 308: 85–101.
- Suikkanen, S., G. O. Fistarol & E. Granéli (2005) Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. *Marine Ecology Progress Series* 287:1–9.
- 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.
- Takamo K., S. Igarashi, H. Mikami & S. Hino (2003) Causation of reversal simultaneity for diatom biomass and density of *Phormidium tenue* during the warm season in eutrophic Lake Barato, Japan. *Limnology* 4: 73–78.
- 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.
- Tessier, A. J. & E. V. Bizina (2001) Grazer–resource interactions in the plankton: Are all daphniids alike? *Limnology and Oceanography* 46: 1585–1595.
- Tillmann, U., T. Alpermann, U. John & A. Cembella (2008) Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful Algae* 7: 52–64.
- Tilman, D. (1982) Resource competition and community structure. Princeton University Press, Princeton. Twombly, S. & C. W.

- Burns (1996) Effects of food quality on individual growth and development in the freshwater copepod *Boeckella triarticulata*. *Journal of Plankton Research* 18: 2179-2196.
- 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.
- Utkilen, H. & N. Gjølme (1995) Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 797–800.
- 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., I. Berman-Frank, T. Rozenberg, O. Hadas, A. Kaplan & A. Levine (1999) Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Current Biology* 9: 1061–1064.
- 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., A. Gáspár, Gy. Surányi, Gy. Batta, Gy. Gyémánt, M. M-Hamvas, Cs. Máthé, I. Grigorszky, E. Molnár & Gy. Borbély (2002) Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum* by plant test (Blue- Green Sinapis Test) *Analytical Biochemistry* 302: 95-103.
- 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.
- Vörös, L. (1995) A kéalgák elszaporodását befolyásoló tényezők és toxicitásuk kutatása (Factors affecting growth and toxicity of cyanobacteria). Ministry for Environment and Regional Affairs, Budapest, Research Report. p. 204.
- Welker, M. & H. von Döhren (2006) Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 530–563.
- Wickham, S. A., J. J. Gilbert & U. G. Berninger (1993) Effects of rotifers and ciliates on the growth and survival of *Daphnia*. *Journal of Plankton Research* 15: 317-334.
- Wiegand, C. & S. Pflugmacher (2005) Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 201–218.
- 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, C. C. (1993) A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 11840-11844.
- Zhang, C. C., A. Friry & L. Peng (1998) Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein

- phosphatase 1/2A/2B homolog and a protein kinase homolog in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *Journal of Bacteriology* 180: 2616-2622.
- 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 *Poteroochromonas* 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.
- Zilliges, Y., J. C. Kehr, S. Meissner, K. Ishida, S. Mikkat, M. Hagemann, A. Kaplan, T. Borner & E. Dittmann (2011) The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* 6(3), e17615.
- 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.

10. MELLÉKLETEK

1. melléklet A *C. ovata* kontroll és kevert tenyészeinek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k <i>C. ovata</i> kontroll	0,34	0,283	0,183	0,270
k <i>C. ovata</i> 1:1 kevert	0,086	- 0,013	- 0,11	0,033
k <i>C. ovata</i> 1:2 kevert	0,274	-0,008	—	0,014
k <i>C. ovata</i> 1:4 kevert	0,182	0,048	—	-0,033
k <i>C. ovata</i> 1:25 kevert	—	—	—	—
k <i>C. ovata</i> 1:50 kevert	—	—	—	—

2. melléklet A *M. aeruginosa* kontroll, árnyékolt kontroll és kevert tenyészeteknek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k M. <i>aeruginosa</i> 1:1 kontroll	-0,426	—	—	-0,579
k M. <i>aeruginosa</i> 1:1 árnyékolt kontroll	0,063	0,160	0,181	0,159
k M. <i>aeruginosa</i> 1:1 kevert	0,575	0,233	0,169	0,233
k M. <i>aeruginosa</i> 1:2 kontroll	-0,479	0,217	0,238	0,153
k M. <i>aeruginosa</i> 1:2 kevert	0,113	0,170	0,193	0,165
k M. <i>aeruginosa</i> 1:4 kontroll	0,200	0,286	0,216	0,246
k M. <i>aeruginosa</i> 1:4 kevert	0,422	0,163	0,203	0,223
k M. <i>aeruginosa</i> 1:25 kontroll	0,212	0,101	0,073	0,118
k M. <i>aeruginosa</i> 1:25 kevert	0,267	0,138	0,072	0,145
k M. <i>aeruginosa</i> 1:50 kontroll	0,249	0,050	0,046	0,088
k M. <i>aeruginosa</i> 1:50 kevert	0,251	0,041	0,042	0,081

3. melléklet A *C. ovata* kontroll és kevert tenyészeinek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k <i>C. ovata</i> 1:1 kontroll	0,283	0,284	0,182	0,266
k <i>C. ovata</i> 1:1 kevert	0,081	-0,013	-0,110	0,032
k <i>C. ovata</i> 2:1 kontroll	0,081	0,093	0,088	0,086
k <i>C. ovata</i> 2:1 kevert	0,183	0,131	0,107	0,137
k <i>C. ovata</i> 4:1 kontroll	0,225	0,082	0,081	0,105
k <i>C. ovata</i> 4:1 kevert	0,067	0,44	0,056	0,085

4. melléklet A *M. aeruginosa* kontroll, árnyékolt kontroll és kevert tenyészeteknek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k M. <i>aeruginosa</i> 1:1 kontroll	-0,431	—	—	-0,594
k M. <i>aeruginosa</i> 1:1 árnyékolt kontroll	0,065	0,159	0,180	0,158
k M. <i>aeruginosa</i> 1:1 kevert	0,575	0,233	0,169	0,236
k M. <i>aeruginosa</i> 2:1 kevert	-0,233	0,118	0,155	0,080
k M. <i>aeruginosa</i> 4:1 kevert	-0,337	0,052	0,062	-0,011

5. melléklet A *C. ovata* kontroll és *M. aeruginosa* sejtkivonataival kezelt tenyészeteknek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k <i>C. ovata</i> kontroll	0,344	0,283	0,182	0,271
k <i>C. ovata</i> 1x kezelt	0,147	0,313	0,198	0,282
k <i>C. ovata</i> 2x kezelt	0,406	0,291	0,191	0,304
k <i>C. ovata</i> 4x kezelt	0,588	0,326	0,207	0,363
k <i>C. ovata</i> 25x kezelt	0,642	0,368	0,212	0,360
k <i>C. ovata</i> 50x kezelt	0,267	0,186	0,190	0,210

6. melléklet A *M. aeruginosa* kontroll és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* sejtkivonataival kezelt tenyészeinek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$], ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k <i>M. aeruginosa</i> 1x kontroll	-0,422	—	—	-0,597
k <i>M. aeruginosa</i> 1x kezelt	-0,404	—	—	-0,649
k <i>M. aeruginosa</i> 2x kontroll	-0,437	0,219	0,239	0,154
k <i>M. aeruginosa</i> 2x kezelt	0,294	0,258	0,247	0,286
k <i>M. aeruginosa</i> 4x kontroll	0,199	0,286	0,216	0,246
k <i>M. aeruginosa</i> 4x kezelt	0,639	0,328	0,222	0,361

7. melléklet A *M. aeruginosa* kontroll és $0,1 \times 10^6$ sejt mL^{-1} , $0,2 \times 10^6$ sejt mL^{-1} és $0,4 \times 10^6$ sejt mL^{-1} *C. ovata* sejtkivonataival kezelt tenyészeteknek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k <i>M. aeruginosa</i> kontroll	-0,420	—	—	-0,140
k <i>M. aeruginosa</i> árnyékolt kontroll	0,05	0,185	0,194	0,143
k <i>M. aeruginosa</i> 1x kezelt	-0,400	—	—	-0,133
k <i>M. aeruginosa</i> 2x kezel	-0,160	0,147	0,184	0,057
k <i>M. aeruginosa</i> 4x kezelt	-0,130	0,150	0,158	0,059

8. melléklet A *M. aeruginosa* kontroll, árnyékolt kontroll és *M. aeruginosa* sejtkivonataival kezelt tenyészeinek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$], ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k <i>M. aeruginosa</i> kontroll	-0,406	—	—	-0,605
k <i>M. aeruginosa</i> árnyékolt kontroll	0,045	0,156	0,182	0,155
k <i>M. aeruginosa</i> 1x kezelt	0,139	0,254	0,250	0,248
k <i>M. aeruginosa</i> 2x kezelt	0,414	0,266	0,266	0,306
k <i>M. aeruginosa</i> 4x kezelt	0,799	0,246	0,252	0,322
k <i>M. aeruginosa</i> 25x kezelt	0,022	0,257	0,260	0,253
k <i>M. aeruginosa</i> 50x kezelt	0,065	0,241	0,250	0,220

9. melléklet A *C. ovata* kontroll, 0,0213 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, 0,0425 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, 0,0851 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$, 0,532 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ és 1,063 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ MCY-LR toxinnal kezelt tenyészeinek egy napra vonatkoztatott és átlagos növekedési rátája [$k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$], ahol k az 1 napra vonatkoztatott növekedési ráta, N_2 a tenyészet egyedszáma t_2 időpontban, N_1 a tenyészet egyedszáma t_1 időpontban, t_1 az inokulálás időpontja]

	1. nap	7. nap	14. nap	Átlagos növekedési ráta
k				
<i>C. ovata</i> kontroll	0,239	0,231	0,164	0,235
k				
<i>C. ovata</i> 0,0213 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ toxinnal kezelt	0,131	0,209	0,144	0,174
k				
<i>C. ovata</i> 0,0425 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ toxinnal kezelt	0,103	0,197	0,149	0,169
k				
<i>C. ovata</i> 0,0851 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ toxinnal kezelt	0,072	0,164	0,150	0,144
k				
<i>C. ovata</i> 0,532 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ toxinnal kezelt	0,129	0,171	0,150	0,148
k				
<i>C. ovata</i> 1,063 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ toxinnal kezelt	0,051	0,177	0,151	0,149

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. Schnitcher, 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* Kützinger (Cyanobacterium) tenyészetek nyerskivonatának hatása a *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) tenyészetek növekedésére. *Hidrológiai Közöny* 88: 21-23.
- Béres, V.**, I. Bácsi, Gy. Surányi, G. Vasas, M. M-Hamvas, Sz. Tóth, Cs. Máthé, K. T. Kiss, Gy. Borbély, Cs. Schnitcher & I. Grigorszky (2007) The interaction between *Cryptomonas ovata* Ehrenberg (Cryptophyta) and *Microcystis aeruginosa* Kützinger (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. Schnitcher & 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., Schnitcher 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 vízjárású 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 nitrogénellátottságú 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., Várbíró G., G. Budai T., **Béres V.**, Krasznai E., Schnitch 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 tőzegmohalápban. Hidrológiai Közlöny 87. (6) 41-44.

Grigorszky, I., G. Borics, K.T. Kiss, Cs. Schnitch, **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. Schnitch, 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* Kützinger (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 of a dinoflagellate 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., Jámbrík 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. Schnitcher, **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. Owsianny & 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. Schnitcher, **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.
- Schnitcher, 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., Schnitcher Cs., **Béres V.** & Borbély Gy.: Szerves anyag tartalom változása egy eutróf holtágban. XLVI. Hidrobiológus Napok. 2004. október 6-8. Tihany, Magyarország.