

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Cilindropermopszin tartalmú cianobakteriális  
kivonatok algaközösségekben betöltött lehetséges  
szerepe**

Dobronoki Dalma

Témavezető: Dr. Bácsi István



DEBRECENI EGYETEM  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A cianobaktériumokat (Cyanobacteria) bolygónk legősibb élőlényei között tartjuk számon. Kiemelkedő szerepet töltöttek be a mai oxigéndús légkör kialakításában. A cianobaktériumok számukra kedvező körülmények között igen nagy tömegben elszaporodhatnak (jelentős vízvirágzások okozói lehetnek), az ökológiai egyensúly felborulását eredményezhetik, ezáltal nagymértékű kárt okozhatnak a vízi ökoszisztémákban (Campos et al., 2013). A figyelem középpontjába állítja őket, hogy számos biológiailag aktív metabolitot termelnek, köztük a cianotoxinokat. Az eukarióta algák és a toxintermelésre képes cianobaktériumok interakciós kapcsolatainak feltérképezése, továbbá a cianotoxinok, mint szekunder metabolitok vízi életközösségekben betöltött funkciója az algológiai kutatások nagy érdeklődésre számot tartó témái közé tartoznak. Az eukarióta algák és cianobaktériumok közötti kölcsönhatás mélyebb megértése és megismerése elengedhetetlen lenne a víztestekben tapasztalt vízvirágzások prevenciójához és kontrolljához (Zhang et al., 2017).

A cilindrospemoszin (CYN) a mikrocisztinek (MCs) után a második legjobban kutatott és ismert cianobaktériális toxin. A fő CYN termelő nemzetségek a kozmopolita Oscillatoriales és a Nostocales rendek képviselői közül kerülnek ki (Chorus és Bartram, 1999) A toxin termelésének okáról, biológiai funkciójáról, a termelő sejtben, illetve az algaközösségekben betöltött szerepéről azonban még mindig viszonylag kevés, és sok esetben egymásnak ellentmondó információ áll rendelkezésünkre.

Munkánk fő irányvonalát adta, hogy közelebb kerüljünk a toxin biológiai szerepének megértéséhez. Fontosnak tartottuk megválaszolni, hogy miképpen befolyásolja a toxin az algafajok abundanciáját, és hogyan hat az egyik legfontosabb esszenciális tápelem, a foszfor felvételére, mely elem jelenléte vagy hiánya meghatározó jelentőséggel bír a primer producensek élettani folyamataiban. Újabb irodalmi adatok a CYN algafajok foszfatáz enzim aktivitására gyakorolt hatására mutatnak rá (Bar-Yosef et al., 2010). Ezért munkánk központi részét képezte a foszfor anyagcserében nélkülözhetetlen szerepet játszó foszfatáz enzimek aktivitásában bekövetkezett változások vizsgálata is. Nem utolsó sorban pedig tudomásunk szerint nem áll rendelkezésre irodalmi adat arról, hogy a toxin hogyan befolyásolhatja a bizonyos algafajok életciklusának fontos részét képező kitartóképlet-képzést és az ezzel gyakran együtt járó specifikus anyagcsere-termékek felhalmozását.

Kísérleteink során három, részben eltérő ökológiai igényű zöldalga (Chlorophyta) faj (*Scenedesmus obtusus*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum* sp.) laboratóriumi

izolátumait alkalmaztuk. A tenyészeteket különböző mennyiségű és CYN koncentrációjú cianobakteriális kivonatokkal kezeltük, célunk az volt, hogy kísérleteink eredményeinek értelmezésével közelebb kerüljünk a CYN algaközösségekben betöltött biológiai funkciójának megértéséhez.

A *Scenedesmus obtusus*-szal végzett kísérletek során viszonylag magas toxin koncentrációk ( $1,0 - 2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) alkalmazása mellett vizsgálni kívántuk, hogyan hat a toxin tartalmú kivonat a zöldalga cönóbiumszám változásaira, foszfát felvételére, valamint a savas és alkalikus foszfatáz enzimek aktivitására. A CYN-tartalmú *Chrysoosporum (Aphanizomenon) ovalisporum* kivonattal történő kezelések mellett nem CYN-termelő *Aphanizomenon* törzsből előállított kivonatot is alkalmaztunk kísérleteink során, valamint úgynevezett kiegészítéses kezelések is történtek, amelyekben a nem toxikus kivonatot a toxikus kivonat CYN-tartalmának megfelelő mennyiségű CYN-nel egészítettük ki. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Az egyes kezeléstípusok és a kezeléstípusokban alkalmazott koncentrációk hogyan hatnak az *S. obtusus* cönóbiumszám változásaira?
- Hogyan alakul az egyes tenyészetek foszfát felvételének dinamikája?
- Milyen hatással vannak a cianobakteriális kivonatok a foszfatáz enzimek aktivitására?
- Van-e számottevő különbség az eltérő kezeléstípus során tapasztalt változások között? A CYN irodalmi adatok alapján feltételezett alkalikus foszfatáz aktivitást fokozó hatása (Bar-Yosef et al., 2010) kizárólag a toxinnak, vagy a CYN-tartalmú kivonatban jelenlévő más anyagcseretermékeknek is köszönhető?

Alacsonyabb toxin koncentrációk ( $0,025 - 0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) alkalmazása mellett vizsgáltuk a *H. pluvialis* zöldalga növekedésben, tápanyagfelvételben és foszfatáz enzim aktivitásában bekövetkezett változások mellett, hogy milyen hatással van a CYN-tartalmú kivonat az algasejtek morfológiájára, a kitartóképletek kialakulására és a sejtek színanyag felhalmozására. A *H. pluvialisra* irányuló vizsgálatainkban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen változások következnek be a zöldalga sejtek morfológiájában a CYN-tartalmú kivonattal történő kezelés hatására?
- Hogyan változik az egyes sejtípusok aránya a kezelt tenyészetekben?

- Befolyásolja-e a *C. ovalisporum* kivonat a tenyészetek tisztasodási folyamatait illetve hatást gyakorol-e a sejtek szénanyag felhalmozási folyamataira?
- Hatással van-e a cianobakteriális kivonat az alga sejtek foszfát felvételére valamint foszfatáz enzim aktivitására?

A fentiek mellett kutatómunkánk során *Chlorococcum* sp. tenyészeteket kezeltünk teljes (minden sejtörmeléket tartalmazó) és centrifugált (sejtörmelék mentes) cianobakteriális sejtkivonattal. Vizsgálni kívántuk, van-e különbség a teljes és a centrifugált cianobakteriális kivonattal kezelt a *Chlorococcum* sp. tenyészetekben bekövetkezett változásokban. Ezen kísérletsorozatban a következő kérdéseket terveztük megválaszolni:

- Milyen hatással van a teljes és a centrifugált cianobakteriális sejtkivonat a *Chlorococcum* sp. tenyészetek növedésére az egyes kezelések során?
- Milyen változások következnek be a zöldalga foszfát felvételében?
- Különbözik-e számottevően a két típusú kivonat a kifejtett hatások tekintetében?

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. Az alkalmazott taxonok

Kísérleteinket a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen) fenntartott *Scenedesmus obtusus* (Meyen) (ACCDH-UD1310), *Haematococcus pluvialis* (Flotow) (ACCDH-UD1205) *Chlorococcum* sp. (Meneghini) ACCDH-UD1002) alगतörzsekkel végeztük. A cianobakteriális sejtkivonat elkészítéséhez CYN-termelő *Chrysochloris* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* törzset (Forti, Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp, Janecek) (ACCDH-UD1001; C+) és nem CYN-termelő *Aphanizomenon* sp. törzset (ACCDH-UD1304; C-) használtunk.

## 2.2. Nevelési körülmények

A *Scenedesmus obtusus* nevelése Jaworski tápoldatban (CCAP Media Recipes n.d.), 50 mL végtérfogatban, 14 óra megvilágítás ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 10 óra sötét fotoperiódus alkalmazásával, 24°C-on, rázatott tenyészetekben történt. A kísérletek időtartama 14 nap volt.

A *Haematococcus pluvialis* nevelése Optimised Haematococcus Medium-ban (OHM, Fabregas et al., 2000), 200 ml végtérfogatban, 14 óra megvilágítás ( $80 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 10 óra sötét fotoperiódus alkalmazásával, 24°C-on, steril levegővel buborékolgatott tenyészetekben történt. A kísérletek időtartama 12 nap volt.

A *Scenedesmus obtusus* és a *Haematococcus pluvialis* izolátumok esetében a foszfát-éheztetett tenyészetek nevelése megegyező körülmények között, de foszfátmentes tápoldatokban történt. A cisztaképzés indukálására beállított *H. pluvialis* tenyészetek tápoldatához nátrium-acetát és hidrogén-peroxid került hozzáadásra (45 illetve 0,01 mM végkoncentráció; Kobayashi et al., 1993).

A *Chlorococcum* sp. nevelése „Jaworski tápoldatban, 400 ml végtérfogatban, folyamatos megvilágítás mellett ( $80 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 24°C-on, steril levegővel buborékolgatott tenyészetekben történt. A kísérletek időtartama 14 nap volt.

## 2.3. A cianobakteriális sejtkivonatok előállítása

A kivonatok elkészítéséhez 14 napos cianobaktérium (C+ és C-) tenyészeteket centrifugáltuk ( $6000 \times g$ , 10 perc, Beckman Avanti J-25). A felülúszó eltávolítását követően a cianobaktérium sejteket háromszori fagyasztás-olvasztással valamint szonikálással (15 perc) tártuk fel. Az így előállított szuszpenziót neveztük teljes sejtkivonatnak. A *Chlorococcum* sp. kezelésénél alkalmazott ún. centrifugált sejtkivonatot a teljes cianobakteriális sejtkivonat centrifugálásával (Heraeus Fresco 17, 13000 rpm, 5 perc) állítottuk elő. A CYN tartalmú kivonat toxin koncentrációját kapilláris elektroforézissel határoztuk meg (PrinCE-C 700 készülék, poliimid borítású szilika kapilláris, 80 cm teljes hossz, 50  $\mu\text{m}$  belső átmérő, 0,15 perc hidrodinamikus injektálás, 100 mbar, +25kV feszültség, 20 perc futtatási idő).

## 2.4. A kísérletek kivitelezése

### 2.4.1. Különböző cianobakteriális sejtkivonatok *Scenedesmus obtusus* zöldalgréa gyakorolt hatásainak vizsgálata

Vizsgálataink során a *Scenedesmus obtusus* tenyészeteket CYN tartamú (C+) valamint CYN-t nem tartalmazó (C-) cianobakteriális kivonattal kezeltünk. Ezek mellett beállításra kerültek úgynevezett kiegészítéses kísérletek, mely során a *S. obtusus* tenyészetekhez C- kivonat és tisztított CYN került hozzáadásra (C++C). Annyi CYN-tartalmú cianobakteriális sejtkivonat, illetve a kiegészítéses kísérleteknél tisztított CYN került hozzáadásra, hogy az egyes kezelések végső toxin koncentrációja 1; 1,5; 2 és 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  legyen. A toxinmentes kezelések előállításához a *S. obtusus* tenyészetekhez a toxin tartalmú kezelések során felhasznált cianobakteriális sejtkivonattal ekvivalens mennyiségű C- sejtkivonatot adtunk, az ekvivalens mennyiség meghatározása a CYN-tartalmú kivonatra jellemző cianobaktérium sejtszámot alapul véve történt.

Az adott kezeléseknek megfelelő ún. negatív kontroll tenyészetek is összeállításra kerültek. A negatív kontroll tenyészetek zöldalgréát nem, csak a cianobakteriális sejtkivonatot tartalmazták. A negatív kontroll tenyészetek az egyes kezelésekben mért értékek korrekciójául szolgáltak. Ezek mellett a foszfátáz enzimek indukciójának tesztelésére beállításra kerültek foszfát éheztetett tenyészetek is.

A kísérletek minden második napján történt mintavétel cönóbiumszám meghatározáshoz (10  $\mu\text{l}$ , 400 $\times$  nagyítás, Olympus BX50F-3 mikroszkóp), valamint további 1 ml mintát centrifugáltunk, (16200  $\times\text{g}$ , 5 perc, Heraeus Fresco 17). A különválasztott felülúszót a foszfátfelvétel meghatározására, az alga-biomasszát a klorofill koncentráció mérésére használtuk fel. A kísérletek 0., 7. és 14. napján további 4  $\times$  400  $\mu\text{l}$  mintát vettünk savas és alkalikus foszfátáz mérésekhez.

### 2.4.2. A CYN tartalmú cianobakteriális sejtkivonatok *Haematococcus pluvialis* zöldalgréa gyakorolt hatásainak vizsgálata

Munkánk során *Haematococcus pluvialis* tenyészetekhez olyan mennyiségben adtuk hozzá a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatot, hogy az egyes kezelések végső toxin koncentrációja 0,025; 0,05; 0,1 és 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  legyen. Csak

cianobakteriális kivonatot tartalmazó ún. negatív kontroll tenyészetek itt is beállításra kerültek, melyek fő célja az egyes kezelésekben tapasztalt változások korrekciója volt.

Ezekon kívül beállításra kerültek indukált (a cisztaképzés serkentéséhez speciális tápoldatba oltott) és foszfát éheztetett tenyészetek is. Minden második napon történt mintavétel sejtszámolásra (10 µl, 400× nagyítás, Olympus BX50F-3 mikroszkóp). Vegetatív sejteknek az ostorral rendelkező sejteket tekintettük, míg az ostorukat elvesztett, jellegzetesen átalakult sejtfalú sejteket cisztáknak tekintettük. Külön számolásra kerültek a zöld és zöld-piros vegetatív sejtek (ZV, ill. ZPV), a zöld és zöld-piros ciszták (ZC, ill. ZPC), valamint a teljesen piros ciszták, az érett aplanospórák (PC). A tenyészetek foszfát koncentrációinak meghatározásához 1 ml mintát centrifugáltunk (16200 ×g, 5 perc, Heraeus Fresco 17), a felülúszót feldolgozásig -20°C-on tároltuk. Ezen kívül a kísérletek 0., 7. és 14. napján további 4 × 400 µl mintát vettünk savas és alkalikus foszfátáz aktivitás mérésekhez.

#### 2.4.3. CYN tartalmú cianobakteriális sejtkivonatok *Chlorococcum* sp. zöldalga kifejtett hatásainak vizsgálata

A *Chlorococcum* sp. tenyészetekhez a zöldalga sejtszámmal azonos (1:1), valamint kétszeres (1:2) és négyszeres (1:4) *Chrysosporium ovalisporum* sejtszámmal megfelelő mennyiségű teljes és centrifugált cianobakteriális sejtkivonatot adtunk (11. ábra). Az összeállított 1:1 kezelésben 0,04 µg ml<sup>-1</sup>, az 1:2-ben 0,09 µg ml<sup>-1</sup>, az 1:4 kezelésben pedig 0,17 µg ml<sup>-1</sup> volt a CYN koncentrációja a kísérlet kezdetekor. Minden második napon vettünk mintát sejtszám meghatározásra (10 µl, 400× nagyítás, Olympus BX50F-3 mikroszkóp), továbbá a felülúszó tápanyag tartalmának meghatározására (1 ml; centrifugálás: 16200 ×g, 5 perc, Heraeus Fresco 17, tárolás feldolgozásig: -20°C).

### 2.5. A klorofill koncentráció meghatározásának menete

A klorofill koncentráció meghatározásához az egyes kezelésekből vett 1 ml minta centrifugálása, és a felülúszó eltávolítása után maradt alga-biomassza került felhasználására.

A centrifugálással összegyűjtött sejtekhez 500 µl metanolt adtunk, majd homogenizálás után 70°C-os vízfürdőben első forrásig melegítettük. A forrás után további 500 µl metanol került hozzáadásra. Az így kapott elegyet centrifugáltuk

(16200 ×g, 5 perc, Heraeus Fresco 17), a felülúszót 653, 666 és 750 nm-en fotometráltuk (Hach Lange DR 6000 UV-VIS). Az egyes minták klorofill koncentrációit Felföldy (1987) alapján számítottuk, és  $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ben adtuk meg.

## 2.6. A foszfát koncentráció meghatározásának menete

A foszfát koncentráció meghatározásához az egyes kezelések 200  $\mu\text{l}$  sejtmentes felülúszója került felhasználásra. A szabad, reaktív foszfát mennyisége spektrofotometriásan (Hach Lange DR 6000 UV-VIS), foszfor-molibdenát módszerrel mértük (MSZ EN ISO 6878 2004). A mérés azon alapszik, hogy a reagensben található molibdenát ionok a mintákban lévő ortofoszfát ionokkal reagálva foszfor-molibdenát komplexet képeznek, mely kék színű vegyületté redukálódik kénsavas közegben. A redukálószer az aszkorbinsav, a folyamat katalizátora a kálium-antimonil-tartarát. A kialakult komplex elnyelési maximuma 885 nm hullámhosszon van. A kék szín intenzitása arányos a mintában lévő foszfát ionok koncentrációjával.

A *Scenedesmus obtusus* faj esetében a foszfát ionok koncentrációját egységnyi számú ( $10^6$ ) cönóbiumra vonatkoztatva,  $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ben adtuk meg. A *Haematococcus pluvialis* és *Chlorococcum* sp. esetében a tenyészetek tápoldatának foszfát koncentrációját  $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ben számoltuk, a változásokat %-os értékben adtuk meg, mely során a tápoldat 0. napon mért foszfát koncentrációját tekintettük 100%-nak.

## 2.7. A foszfatáz enzimek aktivitásának mérése

Előzetes vizsgálataink alapján a *Scenedesmus obtusus* foszfatáz enzimei pH5 és pH9, a *Haematococcus pluvialis* foszfatáz enzimeit pH5 és pH11 kémhatású közegben mutatnak maximális aktivitást, ezért vizsgálatainkat pH5, pH9 és pH11 pufferek alkalmazásával végeztük (pH5: 49 mM kálium-hidrogén-ftalát; pH9: 125 mM nátrium-tetraborát; pH11: 24,99 mM nátrium-hidrogén-karbonát).

A foszfatáz aktivitás *in situ* méréséhez Tabatabai és Bremner (1969) valamint Ihlenfeldt és Gibson (1975) kis mértékben módosított módszereit alkalmaztuk. A minták 400  $\mu\text{l}$ -éhez 500  $\mu\text{l}$  megfelelő kémhatású puffert adtunk (pH5/pH9/pH11). Az elegyeket 400  $\mu\text{l}$  para-nitro-fenil-foszfat oldattal (pNPP) egészítettük ki (végkoncentráció 8 mM), majd az összeállításokat 60 percig 24°C-on, sötétben inkubáltuk. A pNPP hozzáadásával kezdődött az enzimreakció, melyet 500  $\mu\text{l}$  „stop oldat”-tal állítottunk le. A „stop oldat” 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -ot tartalmazott 1 M NaOH-ban

feloldva. Az elegyeket centrifugáltuk ( $1000 \times g$ , 1 perc, Heraeus Fresco 17), és a reakció során a pNPP-ből átalakított pNP mennyiségét spektrofotometriásan (Hach Lange DR 6000 UV-VIS), 400 nm hullámhosszon határoztuk meg a reakció kezdetén „stop oldat”-tal leállított reakcióelegyekkel szemben. Az enzimaktivitást a *S. obtusus* esetében cönóbiumszámra vonatkoztatva,  $\mu\text{mol pNP } 10^6 \text{ cönóbium}^{-1} \text{ óra}^{-1}$  egységben, a *H. pluvialis* esetében sejtszámra vonatkoztatva,  $\mu\text{mol pNP } 10^5 \text{ sejt}^{-1} \text{ óra}^{-1}$  egységben adtuk meg.

## 2.8. Statisztikai elemzés

Minden kísérletet háromszoros ismétlésben végeztünk el. A . cönóbium- ill. sejtszámok tendenciáinak összehasonlításához és a foszfát felvételre vonatkozó adatok statisztikai elemzéséhez egyszempontos kovariancia analízist (ANCOVA) alkalmaztunk (Zar, 1996; Hammer et al., 2001). A foszfátáz aktivitásban, klorofill koncentrációban, az *S. obtusus* tenyészetek 14. napi cönóbiumszámában, és a *H. pluvialis* sejttypusainak arányaiban bekövetkezett változásokat egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztük. A statisztikai kiértékeléshez a PAST (Hammer etl., 2001) és SigmaPlot programokat használtuk.

## 3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 3.1. *Scenedesmus obtusus*

A *S. obtusus* zöldalga tenyészetek növekedésének tendenciájában nem mutatkozott szignifikáns különbség, csak a C+ kezelt tenyészetek 14. napi cönóbiumszámai voltak szignifikánsan alacsonyabbak a kontrollhoz képest. Növekedésgátlás sem a C-, sem a C+C tenyészetekben nem volt megfigyelhető a cönóbiumszámok alapján, a klorofill-tartalomban pedig egyik kezelés esetén sem mutatkozott gátlás. Hasonló jelenség volt megfigyelhető a foszfát-éheztetett tenyészetben is. Ezek alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált *S. obtusus* izolátum sem a CYN viszonylag magas koncentrációjára, sem pedig a foszfát hiányra nem érzékeny.

A foszfát-felvétel dinamikájában bekövetkezett változások azt sugallják, hogy a CYN más, a termelő sejtben jelenlévő metabolitokkal együtt fokozhatja a

cianobaktérium foszfát felvételét: a termelő cianobaktérium hiányában a jelenlévő fitoplankton foszfát felvételének mértékére fejt ki stimuláló hatást.

A CYN tartalmú kivonatok foszfatáz enzimekre gyakorolt hatásával kapcsolatban elmondható, hogy egy olyan zöldalga faj esetében is sikerült kimutatnunk a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonat hatására megnövekedett alkalikus foszfatáz enzim aktivitást, mely, ahogyan az fentebb is olvasható, sem a toxin relatíve magas koncentrációjára, sem pedig a foszfát hiányra nem érzékeny. Azt, hogy a tapasztalt változásokban jelentős szerepe van a CYN-nak, egyaránt alátámasztja a C<sup>-</sup> kezelések során a cönóbiumszám növekedés gátlásának elmaradása, sőt mi több a növekedés serkentése, illetve a foszfatáz-aktivitások szignifikáns növekedésének hiánya. A C<sup>-</sup>+C kísérletek során a növekedésgátlás elmaradása, valamint a C<sup>+</sup> tenyészetekhez viszonyított csupán kis mértékű foszfatáz aktivitás változás rámutatnak arra, hogy az egyes kezelésekben tapasztalt változások háttérében nem kizárólagosan a CYN áll. A termelő sejt extracelluláris mátrixában jelen vannak olyan metabolitok, melyek szinergista módon fokozzák a toxin hatását. Ezen anyagcseretermékek a toxint nem termelő sejtek mátrixából hiányoznak.

### **3.2. *Haematococcus pluvialis***

A *H. pluvialis*ra irányuló vizsgálatunkban a legfőbb hangsúlyt a zöldalga sejtek morfológiájában és kitartóképlet képzésében bekövetkezett változásokra helyeztük. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatok indukálják a cisztaképzést, ám gátolják az aplanospórák kialakulását, akadályozva a ciszták érését, a piros színanyagok felhalmozódását. Hangsúlyozandó továbbá, hogy a *H. pluvialis* tesztorganizmus esetében is igazoltuk a CYN-tartalmú kivonat alkalikus foszfatáz aktivitást és a tenyészet vegetatív sejtjeinek foszfátfelvételét indukáló hatását, tovább erősítve ezzel Bar-Yosef és munkatársai (2010) elméletét.

### **3.3. *Chlorococcum* sp.**

A *Chlorococcum* sp. zöldalga faj esetében a fő hangsúly arra helyeződött, van-e különbség a teljes extracelluláris mátrixot tartalmazó és a csak vízdoldható frakciót tartalmazó cianobakteriális kivonat hatásában az alga sejtszám változásait ill. tápanyagfelvételét tekintve. Annak ellenére, hogy a toxintartalom a különféle típusú kivonatokban azonos volt, a gátló hatások sokkal kifejezettebbek voltak a centrifugált kivonattal kezelt tenyészetek esetében, mint a teljes kivonattal kezeltéknél. A CYN

mellett más vízoldható bioaktív vegyületek is jelen lehetnek mindkét típusú nyers kivonatban. Lehetséges, hogy a vízben oldódó CYN és más vízoldható bioaktív vegyületek hatásai jobban expresszálódtak a centrifugált kivonatokban, mint a teljes kivonatokban. Ez utóbbiban a sejttörmelék ideiglenes kötő felületeként szolgálhat az oldott bioaktív vegyületek számára, így csökkent gátló hatásokat eredményezve. Ezen kívül a sejttörmelékben magasabb is lehet a részecskékhez kapcsolódó különböző jótékony vegyületek mennyisége (például tápanyagok és hormonszerű anyagok; Sergeeva et al., 2002; Stirk et al., 2002; Tsavkelova et al., 2006; Hussain et al., 2010), mint a centrifugált kivonatokban. Ezek a vegyületek kompenzálhatják a CYN negatív hatásait a teljes kivonattal kezelt tenyészetekben.

A *Chlorococcum* sp. tesztorganizmokkal végzett kísérleteinkben nem vizsgáltuk a CYN foszfát-aktivitásra gyakorolt hatását, de a foszfát-felvétel dinamikáját igen, és a CYN-re vonatkozóan számottevő hatás nem volt kimutatható, ami felveti, hogy a CYN foszfát-felvételre gyakorolt serkentő hatása nem tekinthető általános jelenségnek.

Összevetve cianobakteriális kivonatok különböző zöldalgákra kifejtett hatásait elmondható, hogy a vizsgálataink során alkalmazott algafajok, mint tesztorganizmusok eltérően reagálnak a toxin különböző koncentrációira. Amíg egyes fajok esetében (*S. obtusus*) nem okoz szignifikáns növekedésgátlást a CYN viszonylag magas koncentrációja ( $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) sem, addig más fajok esetében már ennél jelentősen alacsonyabb toxin koncentrációk (*H. pluvialis*,  $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; *Chlorococcum* sp.  $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a növekedés szignifikáns mértékű gátlását, a fiziológiai folyamatok megváltozását eredményezik. Ezen eredmények rávilágítanak a cianotoxinok, köztük a CYN algaközösségek összetételét, dinamikáját befolyásoló hatásaira, hangsúlyozzák a ezen másodlagos anyagcseretermékek közösségformáló jelentőségét vízi ökoszisztémákban.

#### 4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A *Scenedesmus obtusus* (Chlorophyceae, Sphaeropleales) zöldalgával kapcsolatos kutatás új tudományos eredményei az alábbiak:

- Kimutattuk, hogy a *S. obtusus* zöldalga sem a foszfát hiányra, sem pedig a CYN viszonylag magas koncentrációjára ( $1,0-2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) nem érzékeny, növekedésében szignifikáns gátlás nem mérhető.

- Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a CYN az élő cianobaktérium sejtek hiányában a jelenlévő zöldalga foszfát felvételét indukálja.
- CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatok hatására fokozódott alkalikus foszfatáz aktivitást sikerült kimutatnunk egy olyan zöldalga faj esetében, mely sem a toxin viszonylag magas koncentrációjára (ld. fentebb), sem pedig a foszfát hiányára nem érzékeny. Emellett a CYN szerepet játszik a *S. obtusus* savas foszfatáz aktivitásának megemelkedésében is.
- Rámutattunk, hogy CYN-termelő sejt extracelluláris mátrixában jelen vannak olyan metabolitok, melyek szinergista módon fokozzák a CYN hatását. Ezek az anyagcseretermékek a nem CYN-termelő sejtben nincsenek jelen.

A *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Chlamydomonadales) zöldalgával kapcsolatban az alábbi új tudományos eredményeket emeljük ki:

- Tudomásunk szerint ez az első tudományos vizsgálat arra vonatkozóan, hogyan befolyásolja egy cianotoxin, jelen esetben a CYN, egy fitoplankton faj kitartóképlet képzését és a kitartó képlet érési folyamatait.
- CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatok hatására szignifikánsan csökken a *H. pluvialis* tenyészetekben a vegetatív sejtek száma, indukálódik a cisztaképzés (mint általában környezeti stressz esetén).
- A CYN-tartalmú cianobakteriális kivonat gátló hatással van a cisztákérésére, nem indul meg a folyamatot jellemző színanyag-felhalmozás.
- A *H. pluvialis* modellszervezet esetében is igazolásra került a CYN-tartalmú kivonat alkalikus foszfatáz-aktivitást indukáló hatása.

A *Chlorococcum* sp. (Chlorophyceae, Chlamydomonadales) zöldalgával kapcsolatos kutatások során az alábbi új tudományos eredmények születtek:

- Mind a teljes, mind a centrifugált CYN-tartalmú cianobakteriális kivonat gátolja a *Chlorococcum* sp. tenyészetek növekedését, a növekedésgátlás mértéke nő a kivonatok mennyiségének növelésével.

- A *Chlorococcum* sp. foszfát-felvételére vonatkozóan számottevő hatás nem volt kimutatható egyik típusú kivonat esetén sem, vagyis a CYN foszfát-felvételre gyakorolt serkentő hatása nem tekinthető általános jelenségnek.
- A centrifugált cianobakteriális kivonattal kezelt *Chlorococcum* sp. tenyészetek sejtszám növekedésében nagyobb mértékű gátlás volt megfigyelhető, mint a teljes kivonattal kezelt tenyészetek esetében. Azaz a természetes vízvirágzások alkalmával is jelen lévő „felületek” (pl. a virágzás összeomlásakor jelen lévő cianobakteriális sejtörmelék) befolyásolják az „oldat” frakcióban jelen lévő bioaktív anyagok mennyiségét, hatását.



Nyilvántartási szám: DEENK/249/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dobronoki Dalma  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10055227

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Rektor, A., Nagy, S. A., Bácsi, I.: A cilindropermopszin cianobaktérium - alga interakcióban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata.  
*Hidrol. Közöny.* 94, 31-34, 2014. ISSN: 0018-1323.

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

2. **Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Potential role of the cellular matrix of Aphanizomenon strains in the effects of cylindropermopsin-an experimental study.  
*J. Appl. Phycol.* 31 (3), 1805-1817, 2019. ISSN: 0921-8971.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-018-1699-4>  
IF: 3.016
3. B-Béres, V., Vasas, G., **Dobronoki, D.**, Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Effects of cylindropermopsin producing cyanobacterium and its crude extracts on a benthic green alga - Competition or Allelopathy.  
*Mar. Drugs.* 13, 6703-6722, 2015. EISSN: 1660-3397.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md13116703>  
IF: 3.345





### További közlemények

#### Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

4. Lukács, Á., **Dobronoki, D.**: Kovaalga közösség kolonizációs vizsgálata egy alföldi kis vízfolyásban.

*Hidrol. Közlöny.* 95 (5-6), 45-48, 2015. ISSN: 0018-1323.

5. Lukács, Á., Rausz, Á., Uzonyi, Á., **Dobronoki, D.**: Ökológiai és taxonómiai csoportosítások alkalmazhatósága alföldi vízfolyások kovaalga összetételének értékelésében.

*Hidrol. Közlöny.* 95 (5-6), 49-52, 2015. ISSN: 0018-1323.

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

6. Figler, A., B-Béres, V., **Dobronoki, D.**, Márton, K., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates.

*Water.* 11, 1-17, 2019. EISSN: 2073-4441.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w11122527>

IF: 2.544

7. Bácsi, I., Deli, J., Gonda, S., Mészáros, I., Veréb, G., **Dobronoki, D.**, Nagy, S. A., B-Béres, V., Vasas, G.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs initiate morphological changes but inhibit carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis*.

*Algal Res.* 31, 1-13, 2018. ISSN: 2211-9264.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.007>

IF: 3.723

#### Egyéb folyóiratközlemények (1)

8. Nyeste, K. J., **Dobronoki, D.**, Molnár, J.: A Nagykunsági-főcsatorna kezdeti szakaszának halai.

*Halászat.* 110 (1), 14, 2017. ISSN: 0133-1922.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,628**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,361**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.08.28.



**Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)**

**Potential role of cylindrospermopsin-containing  
cyanobacterial extracts in algal assemblages**

by Dalma Dobronoki

Supervisor: Dr. István Bácsi



UNIVERSITY OF DEBRECEN  
Doctoral School of Pál Juhász-Nagy

Debrecen, 2020

## 1. INTRODUCTION

Cyanobacteria are among the most ancient organisms on Earth. They have played outstanding role in the formation of oxygen enriched atmosphere. Cyanobacteria are able to multiply in large numbers under favorable environmental conditions (they can cause water blooms), disturbing the ecological balance, hereby causing severe damage in aquatic ecosystem (Campos et al., 2013). Cyanobacteria produce a lot of biologically active metabolites, including cyanotoxins. Investigations of interactions between eukaryotic algae and toxin producer cyanobacteria, moreover the roles of cyanotoxins (as secondary metabolites) in the aquatic assemblages are topics of great interest in algological researches. Understanding and recognition of interaction between eukaryotic algae and cyanobacteria are essential in control and prevention of water blooms (Zhang et al., 2017).

Cylindrospermopsin (CYN) is the most well known and studied cyanotoxin after microcystins (MCs). The main producing genera are belonging to the cosmopolitan orders of Oscillatoriales and Nostocales (Chorus and Bartram, 1999). Nonetheless, only few and often contradictory data are available about the reasons of its production, biological functions, and the effects and roles of it in the producer organisms and in algal assemblages.

In this thesis, the main goal was to get closer to the understanding of the biological role of CYN. It was important to find answers to the question how CYN affects on abundance and on phosphorous uptake of algal species, since presence or absence of phosphorus has outstanding role in physiological processes of primary producers. Recent literature data suggest effects of CYN on phosphatase activity of algal species (Bar-Yosef et al., 2010). Therefore, central part of our experiments was the investigation of changes of phosphatase enzyme activities, which play essential role of phosphorus metabolism. Last but not least, according to our knowledge there are no scientific literature data, how can affect the toxin on cyst formation of phytoplankton species and on the accumulation of specific metabolites.

In this thesis, effects of different cyanobacterial extracts on three green algae strains (*Scenedesmus obtusus*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum* sp.) with partly different ecological requirements were investigated. Cultures were treated with different amounts and CYN concentration of cyanobacterial extracts. Understanding of biological function of CYN in algal assemblages was the main aim of our work.

In case of *Scenedesmus obtusus*, relative high toxin concentrations (1.0 – 2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were used. We investigated changes of growth, phosphate uptake and acidic and

alkaline phosphatase activity of the green alga. For treatments, CYN producer *Chrysochloris (Aphanizomenon) ovalisporum* crude extract (C+), non-CYN producer *Aphanizomenon* crude extract (C-), and non-CYN producer *Aphanizomenon* crude extract supplemented with CYN (C-+C) were applied. The main study questions were the followings:

- How can different types of treatments and the applied CYN concentrations affect the changes of coenobia numbers of *S. obtusus*?
- How change the dynamics of phosphate uptake of the differently treated cultures?
- How affect the cyanobacterial extracts on the phosphatase enzyme activities?
- Is there significant difference among the changes in the different treatments? The alkaline phosphatase activity-enhancing effect of CYN hypothesized based on literature data (Bar-Yosef et al., 2010) is due solely to the toxin or to other metabolites present in the CYN-containing extract?

In case of *Heamatococcus pluvialis*, effects of lower CYN concentrations (0.025 – 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) on growth, nutrient uptake, phosphatase enzyme activity and the changes of morphology and cyst formation were investigated (Chapter 4.2.). The main study questions were the followings:

- How can CYN-containing cyanobacterial crude extracts affect on the changes of morphology of green alga cells?
- How change the proportions of the different cell types in the treated cultures?
- Can the *C. ovalisporum* crude extract affects on the cyst formation maturation and pigment accumulation of the cultures?
- Has the cyanobacterial crude extract any effect on the phosphate uptake and phosphatasa enzyme activity of green algal cells?

In case of *Chlorococcum* sp., green algae cultures were treated with cell debris-containing and cell debris-free cyanobacterial crude extracts. The main aim was to investigate the possible differences between the effects of cell debris-containing and the cell debris-free crude extract on the treated green algal cultures (Chapter 4.3.). The main study questions were the followings:

- How affects the cell debris-containing and cell debris-free cyanobacterial crude extract on the growth of *Chlorococcum* sp.?
- How changes the phosphate uptake of the green alga?
- Are there significant differences between the effects of the two types of extracts?

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. The applied taxa

*Scenedesmus obtusus* (Meyen) (ACCCDH-UD1310), *Haematococcus pluvialis* (Flotow) (ACCCDH-UD1205) and *Chlorococcum* sp. (Meneghini) (ACCCDH-UD1002) are maintained in the Algal Culture Collection of the Department of Hydrobiology, University of Debrecen. CYN producer *Aphanizomenon* strain (*Chrysochlorium* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* (Forti, Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp, Janecek); ACCDH-UD1001; C+) and non-CYN producer *Aphanizomenon* strain (ACCCDH-UD1304; C-) were used for the preparation of cyanobacterial extracts.

### 2.2. Culturing conditions

The experiments of *Scenedesmus obtusus* were carried out in Jaworski's medium (CCAP Media Recipes n.d.), with 50 ml final volume. The cultures were kept in 14 h light ( $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 10 h dark photoperiod at 24°C in shaken cultures. The time of exposure was 14 days.

The experiments of *Haematococcus pluvialis* were carried out in Optimised *Haematococcus* Medium (OHM, Fabregas et al., 2000) with 200 ml final volume. The cultures were kept in 14 h light ( $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 10 h dark photoperiod at 24°C in sterile air bubbled cultures. The time of exposure was 12 days.

Phosphate starvation in case of *Scenedesmus obtusus* and *Haematococcus pluvialis* was achieved under the same conditions in phosphate lacking media. Induction of cyst formation of *Haematococcus pluvialis* was carried out by addition of sodium acetate and hydrogen peroxide (45 and 0.01 mM final concentration, respectively; Kobayashi et al., 1993).

The experiments of *Chlorococcum* sp. were carried out in Jaworski's medium with 400 ml final volume. The cultures were kept under continuous irradiation (80

$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) at 24°C in sterile air bubbled cultures. The time of exposure was 14days.

### 2.3. Preparation of cyanobacterial extracts

14 days old cyanobacterial cultures (C+ and C-) were centrifuged ( $6000 \times g$ , 10 min, Beckman Avanti J-25). Supernatants were removed, the cells were disrupted by freezing, thawing, and sonication (15 min) repeated three times. This suspension was called total or cell debris containing crude extract. In case of certain treatments of *Chlorococcum* sp. cultures, this cell debris-containing crude extract was centrifuged (Heraeus Fresco 17, 13000 rpm, 5 min), resulting the cell debris-free extract. CYN concentration of extracts were measured by capillary electrophoresis (PrinCE-C 700, fused silica capillary with 80 cm total length and 50  $\mu\text{m}$  i.d.; 100 mbar 0.15 min hydrodynamic injection, + 25 kV voltage, 20 min running time).

### 2.4. Experimental design

#### 2.4.1. Investigation of the effects of different cyanobacterial extracts on the green alga *Scenedesmus obtusus*

*Scenedesmus obtusus* cultures were treated with CYN-containing (C+) and non CYN-containing (C-) cyanobacterial extracts. In case of CYN-supplemented experiments, *S. obtusus* cultures were treated with C- extract to which purified CYN was added (C-+C). In the case of C- and C-+C treatments the amounts of C- crude extracts were equivalent to C+ extracts calculated on cyanobacterial cell number basis. C+ extracts in C+ treatments and purified CYN from stock solution with known concentration in C-+C treatments were added to reach 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  toxin concentrations.

So-called negative control cultures were also prepared, which did not contain the green alga, only cyanobacterial extract. Role of negative control cultures was the correction of measured values of each treatments. Phosphate starved cultures were prepared for the induction of phosphatase enzymes.

Samples were collected on every second days of the experiments for counting of coenobia numbers (10  $\mu\text{l}$ , 400 $\times$ , Olympus BX50F-3 microscope). Samples of 1 ml were centrifuged ( $16200 \times g$ , 5 min, Heraeus Fresco 17), the removed supernatans were used to measure phosphate uptake, the pellets were used to measure the

chlorophyll content. Samples of  $4 \times 400 \mu\text{l}$  were collected for measurements of acidic and alkaline phosphatases on the 0., 7. and 14. days of the experiments.

#### 2.4.2. Investigation of effects of CYN-containing cyanobacterial extracts on the green alga *Haematococcus pluvialis*

CYN-containing cyanobacterial crude extracts were added to the *Haematococcus pluvialis* cultures to reach toxin concentrations 0.025; 0.05; 0.1 and  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ . So-called negative control cultures were also prepared for the correction of measured values of each treatments.

Additionally, induced (inoculated to special medium for the induction of cyst formation) and phosphate starved cultures were also prepared. Samples were collected on every second days of the experiments for counting cell numbers ( $10 \mu\text{l}$ ,  $400\times$ , Olympus BX50F-3 microscope). Cells with flagella were considered as vegetative cells, cells without flagella and with characteristically transformed cell wall were considered as cysts. Green and green-red vegetative cells (GV; GRV); green and green-red cysts (GC, GRC), and the totally red cyst, the matured aplanospores (RC) were distinguished during counting. Samples of 1 ml were centrifuged ( $16200 \times g$ , 5 min, Heraeus Fresco 17), the removed supernatants were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further processing. Samples of  $4 \times 400 \mu\text{l}$  were collected for measurement of acidic and alkaline phosphatases on the 0., 7. and 14. days of the experiments.

#### 2.4.3. Investigation of effects of CYN-containing cyanobacterial extracts on the green alga *Chlorococcum* sp.

Cell debris-containing and cell debris-free cyanobacterial extracts were added to *Chlorococcum* sp. cultures in amounts containing the appropriate cell number of *C. ovalisporum* to reach 1:1, 1:2, and 1:4 ratios. Toxin concentration was  $0.04 \mu\text{g ml}^{-1}$  in 1:1 treatment,  $0.09 \mu\text{g ml}^{-1}$  in 1:2 treatment, and  $0.17 \mu\text{g ml}^{-1}$  in 1:4 treatment at the beginning of experiments. Samples were collected on every second days of the experiments for counting cell numbers ( $10 \mu\text{l}$ ,  $400\times$ , Olympus BX50F-3 microscope) of the cultures, and for the measurement of nutrient content of supernatants (1 ml centrifuged sample,  $16200 \times g$ , 5 min, Heraeus Fresco 17, stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further processing).

## 2.5. Measurement of chlorophyll content

Chlorophyll contents were measured from pellets collected by centrifugation of 1 ml samples.

Methanol in volume of 500  $\mu\text{l}$  was added to the collected biomasses, the samples were homogenized, and kept at 70°C in a laboratory water bath for first boiling. Thereafter, further 500  $\mu\text{l}$  methanol were added to the samples. These mixtures were centrifuged, and the removed supernatants were measured by spectrophotometer on 653, 666 and 750 wavelengths (Hach Lange DR 6000 UV-VIS). Chlorophyll contents of the samples were calculated according to Felföldy (1987), and the concentrations were given in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

## 2.6. Measurement of phosphate content

Phosphate contents were measured from 200  $\mu\text{l}$  supernatants. Amounts of free, reactive phosphate were measured by spectrophotometer (Hach Lange DR 6000 UV-VIS) according to molybdate method (MSZ EN ISO 6878 2004). The measurement based on the reaction of molybdate ions with dissolved orthophosphate ions forming a phosphorus-molybdate complex, which is reduced to a blue compound in sulfuric acid containing medium. Reducing agent is ascorbic acid, catalyst is potassium antimony tartarate. Absorption maximum of the blue complex is on 885 nm. Intensity of blue color is proportional to the concentration of phosphate ions in the samples.

In case of *Scenedesmus obtusus*, concentration of phosphate ions were given relative to  $10^6$  coenobia in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . In case of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorococcum* sp. concentration of phosphate ions were given in  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and changes of phosphate contents of culturing media were given in percentage values, where phosphate concentration of medium on the 0<sup>th</sup> day of experiments was considered as 100%.

## 2.7. Measurement of phosphatase enzyme activities

Phosphatase enzymes of *Scenedesmus obtusus* showed maximum activity on pH5 and pH9, phosphatase enzymes of *Haematococcus pluvialis* showed maximum activity on pH5 and pH11, therefore our measurements were carried out using buffers with pH5, pH9 and pH11 (pH5: 49 mM potassium hydrogen phthalate; pH9: 125 mM sodium tetraborate; pH11: 24,99 mM sodium hydrogen carbonate).

In situ measurement of phosphatase activity based on the modified methods of Tabatabai and Brenner (1969) and Ihlenfeldt and Gibson (1975). Volumes of 500  $\mu\text{l}$  buffers (pH5/pH9/pH11) were added to 400  $\mu\text{l}$  samples. Volume of 400  $\mu\text{l}$  para-nitrophenylphosphate (pNPP) were added to the mixtures (final concentration 8mM), and the reaction mixtures were incubated for 60 minutes at 24°C in darkness. Enzymatic reactions were started with the addition of pNPP, and were stopped with the addition of “stop solution”. The “stop solution” contained 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dissolved in 1 M NaOH. The mixtures were centrifuged ( $1000 \times g$ , 1 min, Heraeus Fresco 17), and the amounts of transformed pNP from pNPP were measured by spectrophotometer on 400 nm. The complete reaction system stopped at zero time served as blank. In case of *S. obtusus*, enzyme activities were calculated as  $\mu\text{mol pNP } 10^6 \text{ coenobia}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . In case of *H. pluvialis*, enzyme activities were calculated as  $\mu\text{mol pNP } 10^5 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

## 2.6. Statistical analyses

All experiments were done in triplicate. One-way analysis of covariance (ANCOVA) was used to check the significances among tendency differences of curves of coenobia and cell numbers and phosphate uptake of control and treated cultures (Zar 1996; Hammer et al. 2001). For statistical analyses of chlorophyll-a content changes, phosphatase activity changes and the number of coenobia of *S. obtusus* cultures on the 14<sup>th</sup> day, data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA). PAST (Hammer et al. 2001) and SigmaPlot softwares were used for statistical analysis.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. *Scenedesmus obtusus*

There were no significant differences in the growth trends of the green alga *S. obtusus* cultures, only the 14-day coenobia numbers of the C + treated cultures were significantly lower compared to the control. No inhibition of growth was observed in either C- or C++C cultures based on coenobia numbers, and no inhibition of chlorophyll content was observed in either treatment. A similar phenomenon was observed in phosphate-starved culture. Based on these, it can be said that the studied *S.*

*obtusus* strain is not sensitive to either the relatively high concentration of CYN or the phosphate deficiency.

Results of phosphate uptake suggest, that CYN with other metabolites (from the producer cell) contribute to more intense phosphate uptake: without the presence of the producer cyanobacterium, CYN induced higher phosphate uptake of *S. obtusus*.

The results about the effects of CYN-containing extracts on phosphatase enzymes shows that the C+ treatments induced alkaline phosphatase activity of *S. obtusus*, which was neither sensitive to the relatively high CYN concentration, nor to phosphate limitation, as it is discussed above. Growth stimulation and lack of significant phosphatase activity increases in the C- treatments also confirmed the role of CYN in the experienced changes of C+ treated cultures. In case of supplemented treatments (C++C), growth inhibition was not observed and the applied crude extracts caused only slight increase of phosphatase activity. These results show that the changes in *S. obtusus* cultures were not caused exclusively by CYN. Moreover, our results suggest the presence of other metabolites in the CYN producing cell, which exert synergistic effect to the effects of CYN. These metabolites are not present in the cellular matrix of the non-CYN producing strain.

### **3.2. *Haematococcus pluvialis***

In case of *Haematococcus pluvialis*, changes of morphology and cyst formation of the green alga were investigated. Based on the results, CYN containing crude extract induced cysts formation, but inhibited the maturation of cysts, the accumulation of the red pigments. Moreover, the CYN-containing cyanobacterial crude extract induced alkaline phosphatase activity and phosphate uptake of vegetative cells of *H. pluvialis*, further confirm the concept of Bar-Yosef et al. (2010).

### **3.3. *Chlorococcum* sp.**

In case of *Chlorococcum* sp. the main aim was to study the potential difference of the effects of cell debris containing and cell debris-free cyanobacterial crude extracts on the growth and phosphate uptake of the green alga. Although the toxin content was the same in the different types of extracts, the inhibitory effects were much more pronounced in the cultures treated with the centrifuged extract than in the cultures treated with the total extract. In addition to CYN, other water-soluble bioactive compounds may be present in both types of crude extracts. It is possible that the

effects of water-soluble CYN and other water-soluble bioactive compounds were better expressed in centrifuged extracts than in total extracts. In the latter, the cell debris can serve as a temporary binding surface for dissolved bioactive compounds, resulting in reduced inhibitory effects. In addition, the amount of various beneficial compounds associated with the particles may be higher in the cell debris (e.g., nutrients and hormone-like substances; Sergeeva et al., 2002; Stirk et al., 2002; Tsavkelova et al., 2006; Hussain et al., 2010), than in centrifuged extracts. These compounds may compensate the negative effects of CYN in cultures treated with total extract.

In case of *Chlorococcum* sp. treatments, effect of CYN on phosphatase activity was not investigated, only the changes of dynamics in phosphate uptake. Significant effects of changes of phosphate uptake of *Chlorococcum* sp. cells were not observed. This suggests that stimulating effect of CYN on phosphate uptake can not be considered as a general phenomenon.

Comparing the effects of cyanobacterial crude extracts on different green algae, it can be said that the applied algae specieses responded differently to the different toxin concentration. On one hand, significant growth inhibition was not observed even in the presence of relatively high toxin concentration ( $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the case of *S. obtusus*. However, in case of other species, lower toxin concentration ( $0.05$  and  $0.04 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; in the case of *H. pluvialis* and *Chlorococcum* sp., respectively) caused significant growth inhibition and changes of physiological processes. These results highlight the role of cyanotoxins, including CYN, in the composition and dynamics of algal assemblages and emphasize the community forming capability of these secondary metabolites.

#### 4. NEW SCIENTIFIC RESULTS

In case of *Scenedesmus obtusus* (Chlorophyceae, Sphaeropleales) the new scientific results are the followings:

- Based on our experiments, *Scenedesmus obtusus* was neither sensitive to the phosphate limitation, nor to the relatively high CYN concentration ( $1.0$ - $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), significant growth inhibition was not observed.
- It can be assumed that CYN is able to induce phosphate uptake of the green alga in the absence of living cyanobacterial cells.

- Induced alkaline phosphatase activity was shown in the case of a green alga, which was neither sensitive to the relatively high CYN concentration, nor to phosphate limitation. Additionally, CYN played a role in the induction of acidic phosphatase activity of *S. obtusus*.
- Presence of other metabolites, which exert synergistic effect to the effects of CYN were indirectly proven in the CYN producing cell. These metabolites most likely are not present in the cellular matrix of the non-CYN producing cyanobacterium strain.

In case of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Chlamydomonadales) the new scientific results are the followings:

- According to our knowledge, this was the first scientific investigation about how can CYN effect on the morphology and cyst formation of a phytoplankton species.
- Number of vegetative cells decreased and cyst formation was induced by CYN containing cyanobacterial extract. (as is usually the case due to environmental stresses.)
- CYN-containing cyanobacterial extract has an inhibiting effect on maturation of cysts.
- This investigation also confirmed the alkaline phosphatase inducing effect of CYN-containing extract.

In case of *Chlorococcum* sp. (Chlorophyceae, Chlamydomonadales) the new scientific results are:

- Both the total and the centrifuged CYN-containing cyanobacterial extract inhibits the growth of *Chlorococcum* sp. cultures, the degree of growth inhibition increases with increasing amount of extracts.

- Significant effects on phosphate uptake of *Chlorococcum* sp. was not observed. This suggests that stimulating effect of CYN on phosphate uptake can not be considered as a general phenomenon.
- In case of cell debris-free cyanobacterial extract, growth inhibition was higher, than in the case of cell debris containing extract. So, presence of “substrates” (e.g. cyanobacterial cell debris in case of collapse of water blooms) can affects on amounts and effects of bioactive compounds in the “solution” fraction.

## 5. IRODALOMJEGYZÉK/REFERENCES

- Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-Mozzini, Y., Kaplan, A., 2010. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Current Biology* 20, 1557–1561.
- Campos, A., Araújo, P., Pinheiro, C., Azvedo, J., Osório, H., Vasconcelos, V., 2013. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94, 45–53.
- CCAP Media Recipes (n.d.) Available online: <http://www.ccap.ac.uk/media/documents/JM.pdf>
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water— A Guide to their Public.
- Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero, A., 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 530–535.
- Felföldy, L., 1987. A biológiai vízminősítés (4. kiad.). In: *Vízügyi Hidrobiológia* 16. VGI, Budapest, Magyarország.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1), 1–9.
- Hussain, A., Krischke, M., Roitsch, T., Hasnain, S., 2010. Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Current Microbiology* 61, 361–369.
- Ihlenfeldt, M. J. A., Gibson, J., 1975. Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (Synecococcus). *Archive of Microbiology* 102, 23–28.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S., 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied Environmental Microbiology* 59, 867–873.
- MSZ EN ISO 6878, 2004. Water quality. Determination of phosphorus. Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878:2004).
- Sergeeva, E., Liaaier, A., Bergman, B., 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215, 229–238.

- Stirk, W. A., Ördög, V., Van Staden, J., Jäger, K., 2002. Cytokinin- and auxin-like activity in cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology* 14, 215–221.
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301–307.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva T. A., Netrusov, A. I., 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42, 117–126.
- Zar, J. H., 1996. *Biostatistical Analysis*, 3<sup>rd</sup> ed. Prentice-Hall International, NJ, USA.
- Zhang, W., Jeppensen, E., Wang, M., Xu, Z., Wang, L., 2017. Allelopathic effect boots *Chrysochlorum ovalisporum* dominance in summer at the expense of *Microcystis panniformis* in a shallow coastal water body. *Environmental Science and Pollution Research* 24(5), 4666–4675.



Registry number: DEENK/249/2020.PL  
Subject: PhD Publication List

Candidate: Dalma Dobronoki

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10055227

### List of publications related to the dissertation

#### Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

1. **Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Rektor, A., Nagy, S. A., Bácsi, I.: A cilindropermopszin cianobaktérium - alga interakcióban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata. *Hidrol. Közöny.* 94, 31-34, 2014. ISSN: 0018-1323.

#### Foreign language scientific articles in international journals (2)

2. **Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Potential role of the cellular matrix of Aphanizomenon strains in the effects of cylindropermopsin-an experimental study. *J. Appl. Phycol.* 31 (3), 1805-1817, 2019. ISSN: 0921-8971.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-018-1699-4>  
IF: 3.016
3. B-Béres, V., Vasas, G., **Dobronoki, D.**, Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Effects of cylindropermopsin producing cyanobacterium and its crude extracts on a benthic green alga - Competition or Allelopathy. *Mar. Drugs.* 13, 6703-6722, 2015. EISSN: 1660-3397.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md13116703>  
IF: 3.345

### List of other publications

#### Hungarian scientific articles in Hungarian journals (2)

4. Lukács, Á., **Dobronoki, D.**: Kovaalga közösség kolonizációs vizsgálata egy alföldi kis vízfolyásban. *Hidrol. Közöny.* 95 (5-6), 45-48, 2015. ISSN: 0018-1323.





5. Lukács, Á., Rausz, Á., Uzonyi, Á., **Dobronoki, D.**: Ökológiai és taxonómiai csoportosítások alkalmazhatósága alföldi vízfolyások kovaalga összetételének értékelésében.  
*Hidrol. Közlöny.* 95 (5-6), 49-52, 2015. ISSN: 0018-1323.

Foreign language scientific articles in international journals (2)

6. Figler, A., B-Béres, V., **Dobronoki, D.**, Márton, K., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates.  
*Water.* 11, 1-17, 2019. EISSN: 2073-4441.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w11122527>  
IF: 2.544
7. Bácsi, I., Deli, J., Gonda, S., Mészáros, I., Veréb, G., **Dobronoki, D.**, Nagy, S. A., B-Béres, V., Vasas, G.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs initiate morphological changes but inhibit carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis*.  
*Algal Res.* 31, 1-13, 2018. ISSN: 2211-9264.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.007>  
IF: 3.723

Other journal articles (1)

8. Nyeste, K. J., **Dobronoki, D.**, Molnár, J.: A Nagykunsági-főcsatorna kezdeti szakaszának halai.  
*Halászat.* 110 (1), 14, 2017. ISSN: 0133-1922.

**Total IF of journals (all publications): 12,628**

**Total IF of journals (publications related to the dissertation): 6,361**

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

28 August, 2020



## 6. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE / SCIENTIFIC ACTIVITY

**Az értekezés témájában megjelent közlemények / Publications related to the dissertation (IF: 6,361 )**

**Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven / Foreign language scientific articles in international journals:**

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2019. Potential role of the cellular matrix of *Aphanizomenon* strains in the effects of cylindrospermopsin — an experimental study. *Journal of Applied Phycology* 31(3), 1805-1817. **IF: 3.016, Q1**

B-Béres, V., Vasas, G., **Dobronoki, D.**, Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2015. Effects of cylindrospermopsin producing cyanobacterium and its crude extracts on a benthic green alga—competition or allelopathy? *Marine Drugs* 13, 6703-6722. **IF: 3.345; Q2**

**Referált folyóiratokban megjelent közlemények magyar nyelven / Hungarian scientific articles in Hungarian journals:**

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Rektor, A., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2014. A cylindrospermopszin cianobaktérium - alga interakcióban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata *Hidrológiai Közlöny* 94(5-6), 31-34.

**Nemzetközi konferenciák, poszterek / International conferences, posters:**

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Bácsi, I., 2018. Evidence for the phosphatase regulatory effect of cylindrospermopsin on an insensitive green algal species. 37<sup>th</sup> International Conference of the Polish Phycological Society. 2018. május 22-25. Kraków-Dobczyce, Lengyelország.

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Gácsi, M., Bácsi, I., 2018. Evidence for the phosphatase regulatory effect of cylindrospermopsin on an insensitive green algal species. Scientific conference for students and high school teachers, 2018 május 25. Oradea, Románia.

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2018. Cilindrospermopszin tartalmú cianobaktériális kivonatok hatása a *Scenedesmus obtusus* planktonikus zöldalga növekedésére, tápanyag-felvételére és foszfatáz aktivitására. 12<sup>th</sup> Advances in research on the flora and vegetation of the Carpatho-Pannonian region International Conference, 2018 február 23-25. Debrecen, Magyarország.

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2016. Effects of cylindrospermopsin containing cyanobacterial crude extract on growth, phosphateuptake and phosphatase activity of the planktonic green alga *Scenedesmus obtusus*. 33<sup>rd</sup> SIL Congress, 2016 július 31-augusztus 5. Torino, Olaszország.

B-Béres, V., Vasas, G., **Dobronoki, D.**, Bácsi, I., 2013. Possible anticyanobacterial effects of *Cryptomonas ovata* (Cryptophyta) on *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). 4<sup>th</sup> Croatian Botanical Symposium, 27-29 September 2013 szeptember 27-29., Split, Horvátország.

#### **Hazai konferenciák, poszterek / Hungarian conferences, posters:**

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2018. A cilindrospermopszin lehetséges foszfátáz szabályozó szerepének vizsgálata *Scenedesmus obtusus* zöldalgán. LX. Hidrobiológus Napok, 2018. október 3-5. Tihany.

**Dobronoki, D.**, 2016. Cilindrospermopszin tartalmú cianobakteriális kivonatok hatása a *Scenedesmus obtusus* zöldalga növekedésére, foszfát-felvételére és foszfátáz aktivitására. XV. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákköri Konferencia, 2016. március 30.–április 1. Szeged.

B-Béres, V., Vasas, G., **Dobronoki, D.**, Bácsi, I., 2013. Interakciós kapcsolatok toxikus cianobaktérium és nem toxikus alga fajok között, különös tekintettel a cianotoxinok algaközösségekben betöltött szerepére. Debreceni Hidrobiológus Fórum, 2013. november 22-23. Debrecen.

**Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., Rektor, A., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2013. A cilindrospermopszin cianobaktérium - alga interakcióban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata. LV. Hidrobiológus Napok, 2013 október 2-4. Tihany.

#### **Egyéb megjelent közlemények / Other publications: (IF: 6.267)**

#### **Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven / Foreign language scientific articles in international journals:**

Figler, A., B-Béres, V., **Dobronoki, D.**, Márton, K., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2019. Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates. *Water* 11(12), 2527. **IF: 2.544, Q2**

Bácsi, I., Deli, J., Gonda, S., Mészáros, I., Veréb, G., **Dobronoki, D.**, Nagy, S. A., B-Béres, V., Vasas, G., 2018. Non-steroidal anti-inflammatory drugs initiate morphological changes but inhibit carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts 31C, 1-13. **IF: F:3.723, D1**

**Referált folyóiratokban megjelent közlemények magyar nyelven / Hungarian scientific articles in Hungarian journals:**

Lukács, Á., **Dobronoki, D.**, 2015. Kovaalga közösség kolonizációs vizsgálata egy alföldi kis vízfolyásban. Hidrológiai Közköny 95(5-6), 45-48.

Lukács, Á., Rausz, Á., Uzonyi, Á., **Dobronoki, D.**, 2015. Ökológiai és taxonómiai csoportosítások alkalmazhatósága alföldi vízfolyások kovaalga összetételének értékelésében. Hidrológiai Közöny 95(5-6), 49-52.

**Egyéb közlemények / Other journal articles:**

Nyeste, K. J., **Dobronoki, D.**, Molnár, J., 2017. A Nagykunsági-főcsatorna kezdeti szakaszának halai. Halászat 110(1), 14.

**Nemzetközi konferenciák, posztterek / International conferences, posters:**

Bácsi, I., Deli, J., Gonda, S., Mészáros, I., Veréb, G., **Dobronoki, D.**, B-Béres, V., Vasas, G., 2018. Non-steroidal anti-inflammatory drugs can affect algal resting stage - *Haematococcus pluvialis* as a case study. 37<sup>th</sup> International Conference of the Polish Phycological Society. 2018. május 22-25. Kraków-Dobczyce, Lengyelország.

B-Béres, V., Lukács, Á., Török, P., Kókai, Z., T-Krasznai, E., **Dobronoki, D.**, Nagy, S. A., Balogh, Cs., Tóthmérész, B., Bácsi, I., 2015. Colonisation in small lowland watercourses: changes in diatom ecological guilds and cell-size class composition. 9<sup>th</sup> Central European Diatom Meeting, 2015. március 10-13. Bremerhaven, Németország.

Lukács, Á., Kókai, Z., Bácsi, I., Török, P., T-Krasznai, E., **Dobronoki, D.**, Nagy, S. A., Balogh, Cs., Tóthmérész, B., B-Béres, V., 2015. Colonization dynamics of benthic algal assemblages in a small lowland watercourse. 9<sup>th</sup> Central European Diatom Meeting. 2015. március 10-13. Bremerhaven, Németország.

**Hazai konferenciák, posztterek / Hungarian conferences, posters:**

Lukács, Á., **Dobronoki, D.**, 2014. Kovaalga közösség kolonizációs vizsgálata egy alföldi kisvízfolyásban. LVI. Hidrobiológus Napok, 2014 október 1-3. Tihany.

- Lukács, Á., **Dobronoki, D.**, Rausz, Á., Koncz, G., 2014. Bevonatban található algataxonok megtelepedési dinamikája kolonizáció során egy alföldi kisvízfolyásban. LVI. Hidrobiológus Napok, 2014 október 1-3. Tihany.
- Lukács, Á., Rausz, Á., Uzonyi, Á., **Dobronoki, D.** 2014. Ökológiai és taxonómiai csoportosítások alkalmazhatósága alföldi vízfolyások kovaalga összetételének értékelésében. LVI. Hidrobiológus Napok, 2014 október 1-3. Tihany.