

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A nitrogénkötés jelentősége a planktonikus algák
nitrogénellátásában és a cianobaktérium biomassza becslése a
fikocianin mennyisége alapján magyarországi sekély víztereken**

**The importance of N₂-fixation in nitrogen supply of planktonic
algae and estimation of cyanobacterial biomass based on their
phycocyanin content in some Hungarian shallow waters**

Horváth Hajnalka

Témavezetők:

Prof. Dr. Dévai György
professzor emeritus

Dr. Présing Máttyás
tudományos főmunkatárs



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2014.

1. Bevezetés és célkitűzések

A fitoplankton mennyisége és annak faji összetétele fontos tényező a vízi ökoszisztémák vízminőségének jellemzésében. Eutróf vizek gyakran cianobaktérium dominanciával jellemezhetők, melyeknek a vízminőségre kifejtett negatív hatása miatt, évtizedek óta a limnológiai kutatások előterében állnak.

A cianobaktériumok ökológiai jelentősége óriási (SIDLER 1994), mind az elsődleges termelésben betöltött szerepük, mind légköri N_2 -kötésük révén, hiszen a Földön számos tengeri és édesvízi rendszerben a nitrogén limitálja az elsődleges termelést (HALL et al. 2005). Tömeges elszaporodásra is képesek, hozzájárulva ezzel a természetes vizek eutrofizálódásához, a biodiverzitás csökkenéséhez, valamint potenciális toxin-termelésük révén, élőlények pusztulásához.

A Balatonban az 1960-as évek végén felgyorsult eutrofizálódásra kezdetben a makrovegetáció, majd a planktonikus algák mind nagyobb mértékű elszaporodása volt a jellemző és a Siófoki-medence kivételével az egész tó az 1970-es évekre hipertóffá vált (HERODEK 1984). Az ötvenes években a fitoplankton uralkodó faja a balatoni fecskemoszat (*Ceratium hirundinella*) volt (ENTZ és SEBESTYÉN 1942), majd az 1960-as évek közepétől fokozatosan a fonalas N_2 -kötő cianobaktériumok vették át az uralmat (OLÁH et al. 1981).

A tó életét és idegenforgalmi hasznosítását egyaránt veszélyeztető folyamatok megállítása és megfordítása érdekében (1983-as minisztertanácsi rendeletnek megfelelően) átfogó programot indítottak a Balatonba jutó tápanyagok mennyiségének csökkentésére. Ennek részeként többek között megépítették a Kis-Balaton Vízüdelmi Rendszert (KBVR), a Marcali víztározót, a zalaegerszegi szennyvíztisztító P-eltávolító egységét és a biológiailag tisztított szennyvizet a vízgyűjtőből kivezető körcsatornát. Ezeknek az intézkedéseknek köszönhetően a tó vízminősége jelentős változáson ment keresztül az elmúlt évtizedek alatt és az évezred végére megközelítette az 1960'-as évek eleji vízminőségi állapotot (VÖRÖS et al. 1999).

Egyes tanulmányok szerint azonban a 2000-es évek elejétől csökkent a tározó (KBVR) biológiailag hozzáférhető foszfor-visszatartó képessége és megnőtt az

elsősorban denitrifikációval eltávolított nitrogén mennyisége (GORZÓ 1990). Ezzel csökkentve az elsődleges termelők számára közvetlenül hozzáférhető nitrogén és foszfor arányát, mely a cianobaktériumok elszaporodásának kedvező feltételeket biztosíthat (SMITH 1983). Az 1990-es évek végén végzett acetilén-redukciós vizsgálaton alapuló N_2 -kötési kísérletek eredményei (GORZÓ 1990) a cianobaktériumok általi külső nitrogén bevitel jelentőségét hangsúlyozták, amely meghaladta a befolyókkal érkező nyári külső nitrogénterhelés mértékét. Az ezredfordulón végzett kutatások alapján (KOVÁCS 2002) ez a nitrogén mennyiség az összes éves nitrogénterhelés 10%-át is elérhette. A tározóban a N_2 -kötésnek az erős szezonális ingadozáson kívül, jelentős területi változása is van (KÓBOR et al. 1996), melyet az elmúlt tíz évben acetilén-redukciós módszerrel sem becsültek.

A Balaton cianobakteriális eredetű, külső nitrogén-terheléséről lényegesen több információval rendelkezünk, mind acetilén-redukciós (OLÁH et al. 1981; PRÉSING et al. 1996), mind stabil izotóp (PRÉSING et al. 2008) felhasználásán alapuló közvetlen módszer alkalmazásával. Az 1994-es eddigi legnagyobb fitoplankton csúcs idején a Keszthelyi-medencében a fitoplankton nitrogén-szükségletének 50%-át is fedezhette és a Siófoki-medencében is 10% körül változott a N_2 -kötés hozzájárulása az algák N-ellátásához (PRÉSING et al. 1996). Az azóta eltelt 20 év alatt, mind a Zala általi tápanyagterhelés, mind a fitoplankton tömege töredékére csökkent, azonban a nyári alga biomassa-csúcs a mai napig N_2 -kötő cianobaktériumok általi dominanciával jellemezhető.

A Kis-Balatonban az utolsó N_2 -kötési mérések óta eltelt közel tíz év, a tározó tápanyag-visszatartásának határfokáról folyó vita és a korábban alkalmazott módszer esetleges pontatlansága adott okot a tározó N_2 -kötésének ^{15}N technikával történő meghatározására és a fitoplankton cianobaktériumok általi nitrogénellátásának becslésére. A Balatonban a N_2 -kötés fitoplankton N-ellátásában betöltött szerepének meghatározását a trofikus gradiens mentén, összevetve a Kis-Balaton N_2 -kötésének intenzitásával és a Zala által szállított külső N-terhelés mértékével tűztük ki célul, amely az utolsó mérések óta eltelt 10 év alatt

jelentősen csökkent. Továbbá, elsősorban az oldott tápanyag-formák N₂-kötés intenzitására kifejtett hatását kívánjuk tanulmányozni.

Napjainkban a cianobaktériumok térbeli eloszlását, biomasszájának becslését főként mikroszkópos meghatározással és sejt számolással végzik (UTERMÖHL 1958; NÉMETH és VÖRÖS 1986). Léteznek ugyan alternatív módszerek is, mint például az automata képanalizáló módszer (CONGESTRI et al. 2000), vagy a HPLC-alapú biomarker pigment-detektálás (SCHLÜTER et al. 2004), de mind a tradicionális, mind az azt felváltani kívánó alternatív módszerek alkalmazhatóságát behatárolják speciális igényeik.

A cianobaktériumok fikocianin-tartalmának és relatív mennyiségének meghatározása *in situ* (SEPPÄLÄ et al. 2007), *in vivo*, fluorimetriás (GREGOR és MARŠÁLEK 2005), *in vitro* (SARADA et al. 1999), valamint távérzékelési (SIMIS et al. 2005; HUNTER et al. 2008a, 2008b) módszerek alkalmazásával jól ismert. Mivel a fikocianin szintézise a fitoplanktonot alkotó algák csupán kis számú tagjára jellemző (cianobaktériumok, *Rhodophyta* és *Cryptophyta* fajok), ezért alkalmas lehet ezen fajok mennyiségi, illetve relatív mennyiségi becslésére, eloszlásuk meghatározására. A fikobilin pigmentek egyedi abszorpciós tulajdonságaik lehetővé teszik a cianobaktériumok és az egyéb planktonikus eukarióta algák megkülönböztetését édesvizekben és óceánokban egyaránt (VINCENT et al. 2004; SIMIS et al. 2007).

A fikocianin pigment pontos mennyiségi meghatározása elengedhetetlen az *in situ*, *in vivo* és a távérzékelési módszerek kalibrálása során is. Azonban az irodalomban létező számos extrakciós módszer (LAWRENZ et al. 2011) ellenére még sincs egy általánosan elfogadott eljárás, mely gyors, könnyen reprodukálható, és nagyszámú minta fikocianin-tartalmának rutin-szerű, költséghatékony meghatározását lehetővé teszi.

Célkitűzések:

1. Stabil izotóptechnika (¹⁵N-módszer) felhasználásával, közvetlen eljárással a Kis-Balatonban folyó nitrogénkötés mértékének becslése. A N₂-kötés fényintenzitás-függésének ismeretében a napi N₂-kötés mértékének meghatározása,

összevetve ugyanazon időben a Balaton Keszthelyi-medencéjének cianobakteriális N₂-kötésével.

2. A N₂-kötés jelentőségének meghatározása a tározó N-ellátásában, összevetve a Zala és a többi kisebb befolyó által szállított külső N-terhelés nagyságával.

3. A N₂-kötés intenzitásának és az algák N-ellátásához való hozzájárulásának meghatározása trofikus gradiens mentén (Kis-Balaton–Balaton), továbbá a hozzáférhető oldott nitrogénformák N₂-kötés intenzitására gyakorolt hatásának tisztázása.

4. Laboratóriumban fenntartott, fonalas N₂-kötő cianobaktérium fajok felhasználásával a cianobaktériumok jellemző pigmentje, a fikocianin meghatározására egy gyors és reprodukálható extrakciós módszer kidolgozása, amely alkalmas az *in situ*, *in vivo* és távérzékelési módszerek kalibrálására is.

5. Az általunk kidolgozandó módszerrel a Balaton és a Kis-Balaton mellett magyarországi tavak, tározók fitoplanktonja fikocianin-tartalmának meghatározása.

6. A fitoplankton fikocianin-tartalmának és faji összetételének ismertében olyan összefüggés leírása, amely alkalmas lehet a mérsékelt égövi tavak fikocianin koncentráció alapján történő cianobaktérium biomassza nagyságának becslésére. Továbbá, a fikocianin mennyisége és a N₂-kötés intenzitása közötti összefüggés megállapítása.

2. Alkalmazott módszerek

A vízmintákat vertikális cső-mintavevővel vettük, majd a mintavételt követően 150 µm lyukátmérőjű zooplankton hálón átszűrtük. A vízkémiai elemzéseket és a N₂-kötési kísérleteket a mintavétel napján, a gyűjtést követően a lehető leghamarabb elvégeztük.

A vízminták oldott nitrogén- (ammónium-N, nitrát-N, karbamid-N) és foszforformák (oldott reaktív-, összes oldott- és összes foszfor) koncentrációjának meghatározását MACKERETH és munkatársai (1989), *a*-klorofill tartalmát

IWAMURA és munkatársai (1970), fikocianin-tartalmát HORVÁTH és munkatársai (2013) alapján határoztuk meg.

A N₂-kötés sebességét ¹⁵N technika alkalmazásával (PRÉSING et al. 2005) mértük. Számoltuk a tározó egy négyzetméter feletti vízoszlopának napi N₂-kötését (PRÉSING et al. 1999), amelyet a kísérletet megelőző és azt követő egy-egy hetes időtartamra és mintavételi ponttal reprezentált vízterületre vonatkoztatva, az egész tározó nitrogénkötését meghatároztuk. Becsültük az algák elsődleges termelését (VÖRÖS és V.-BALOGH 1997), melyből a Redfield-féle tömegarány (C/N = 5,68) felhasználásával számoltuk a fitoplankton „elméleti” nitrogénigényét, illetve a N₂-kötés hozzájárulását az algák nitrogénellátásában.

A fitoplankton összetételét és mennyiségét, Lugol-oldattal tartósított mintákból, fordított plankton mikroszkóppal határoztuk meg (UTERMÖHL 1958). A sejtek térfogatából számoltuk valamennyi faj nedves tömegét (NÉMETH és VÖRÖS 1986).

A fitoplankton N₂-kötésének mérését 2009-ben a KBVR-en és a Keszthelyi-medencében végeztük kéthetes rendszerességgel a tározó nitrogén-mérlegének pontosításához és a N₂-kötésnek az algák N-ellátásához való hozzájárulásának mértékének becsléséhez.

A fitoplankton N₂-kötésével párhuzamosan, 2010-ben az alga biomassa-csúcs idején, meghatároztuk annak fikocianin-tartalmát is. A fitoplankton N₂-kötését a Kis-Balaton két tározójából (3 mintavételi helyen) és a Balaton négy medencéjének közepéről, fikocianin-tartalmát ugyanezen helyeken, valamint a hossz-szelvény mentén 35 mintavételi helyről származó felszíni vízmintában mértük.

A fitoplankton fikocianin mennyisége és légköri N₂-kötése közötti összefüggés megállapításához, területi és szezonális változásának leírásához 2011-ben a cianobakteriális N₂-kötést havi rendszerességgel mértük a Balaton és a Kis-Balaton 7 mintavételi helyén, mellyel párhuzamosan a fikocianin-tartalom meghatározását, ugyanezeket a helyeket, kéthetes rendszerességgel végeztük el.

A fitoplankton fikocianin-tartalma és a cianobaktérium biomassa közötti összefüggés pontosításához 2012-ben és 2013-ban különböző algabiomassa

nagyságú és faji összetételű vizek (Pátkai-, Zámolyi- és Marcali-tározó, Lellei- és Fonyódi-halastavak) fitoplanktonjának fikocianin-tartalmát is meghatároztuk.

3. Új tudományos eredmények

1. ^{15}N módszerrel meghatároztam a Kis-Balaton egyes tározóiban és a Balaton medencéiben a fitoplankton légköri N_2 -kötését, melynek során megállapítottam, hogy a N_2 -kötés a Kis-Balaton fitoplanktonjának nitrogénellátásában jelentős szerepet játszott; hozzájárulásának mértéke a nyári biomassza-csúcs idején ~30%-ot ért el. Terepi kísérletekben először sikerült kimutatni az oldott N-formák N_2 -kötés intenzitására kifejtett csökkentő hatását, mely az $\text{NH}_4\text{-N}$ esetében viszonylag szoros negatív kapcsolatnak ($R^2 = 0,7177$) bizonyult, a $\text{NO}_3\text{-N}$ esetében csak kisebb mértékben érvényesült ($R^2 = 0,4234$).

2. A Keszthelyi-medencében 2009–2011-ben a biomassza-csúcs idején mért α -kl-ra vonatkoztatott N_2 -kötési sebességek, amelyek többszörösen meghaladták a Kis-Balaton egyes mintavételi helyein, ugyanazon időben mért N-kötést, továbbra is a medence nyári fitoplanktonjának viszonylagos nitrogénhiányáról tanúskodnak.

3. Kidolgoztam a fikocianin koncentrációjának meghatározására egy gyors és könnyen reprodukálható kémiai módszert, mely az eddig használatos eljárásoknál érzékenyebbnek és megbízhatóbbnak bizonyult. A kidolgozott módszerrel elsőként határoztam meg a Balaton, Kis-Balaton (a Marcali-, a Pákozdi- és a Zámolyi-tározó, a Lellei- és a Fonyódi-halastavak) fitoplanktonjának fikocianin-tartalmát, melynek során kimutattam a trofikus gradiens mentén (Kis-Balaton, Balaton) való csökkenését, a vízmélységgel való növekedését, továbbá a víz alatti fény spektrális összetételének megfelelő változását.

4. Elsőként határoztam meg négy, a Balatonban és a Kis-Balatonban is általános kozmopolita cianobaktérium faj (*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena spiroides*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon issatschenkoi*) fikocianin-tartalmát, rámutatva a jelentős fajspecifikus különbségekre.

5. Statisztikai modellel meghatároztam a Balatonban és Kis-Balatonban a fitoplankton fikocianin koncentrációja és N_2 -kötése közötti kapcsolatot, mely

exponenciális függvénnyel írható le, és a fikocianin koncentrációja a N₂-kötés intenzitásában bekövetkező változások 57,8%-át magyarázza. Ez idáig ez az első próbálkozás a N₂-kötés nagyságának fikocianin alapján történő becsléséhez.

6. A fitoplankton fikocianin koncentrációja és cianobaktériumok biomasszája közötti szignifikáns összefüggések ($R^2 = 0,4168-0,8431$, $p < 0,001$) jó alapot szolgáltathatnak a cianobaktérium biomassza fikocianin koncentráció alapján történő becsléséhez, széles biomassza tartományban (0,86–215 mg/l) való alkalmazására is.

1. Introduction and main objectives

Phytoplankton biomass and species composition are important factors for characterizing the water quality of aquatic ecosystems. Eutrophic surface waters are often dominated by cyanobacterial dominance and due to their negative effect to the water quality, cyanobacteria are the best-studied group of phytoplankton by limnologists. Cyanobacteria have huge ecological importance (SIDLER 1994); they play a significant role in the primary production and their ability of N₂-fixation is one of the most important physiological processes, because nitrogen often limits the growth in number of marine and freshwater ecosystems (HALL et al. 2005). They can proliferate causing the decrease of biodiversity, contribute to the eutrophication of freshwaters and due to their potential toxin-producing ability they can cause destruction of organisms.

At the end of 1960s, eutrophication accelerated in Lake Balaton which could be characterised initially with proliferation of macrovegetation then with the planktonic algae. In the 1970s, except for the Siófok basin, the whole Lake became hypertrophic (HERODEK 1984). Until the 1950s *Ceratium hirundinella* was the dominant species (ENTZ és SEBESTYÉN 1942) in the summer phytoplankton, and the end of the 1960s N₂-fixing cyanobacteria became dominant (OLÁH et al. 1981). Due to environmental programs (e.g. construction of Kis-Balaton and Marcali reservoir and the chemical P-precipitation in the sewage treatment in Zalaegerszeg) the water quality of the Lake underwent significant changes during the last decades, and at the end of the 20th century the water quality reached the state of the early 1960s (VÖRÖS et al. 1999). The Kis-Balaton Water Protection System (KBWPS) was established to improve and protect the water quality of the Lake, primarily through P retention (Pomogyi, 1991). After many studies of nutrient retention and removal mechanisms, it was found that the efficiency of the system, especially P-retention, had decreased. Owing to the different biological processes

(e.g. P-release by sediment, denitrification) the rate of the available nutrient (N/P) decreased. The ambient concentrations of the available nitrogen and phosphorus and their low supply ratios favour the development of cyanobacterial blooms (SMITH 1983). The cyanobacterial nitrogen fixation measured by acetylene-reduction technique highlighted the significance of external nitrogen loading by fixation in Kis-Balaton, which exceeded the N-load by inflows in the summer (GORZÓ 1990). At the beginning of the 21th century, KOVÁCS (2002) found nitrogen fixation to be as high as 10% of the total annual N-load. Cyanobacterial nitrogen fixation in the reservoir had strong temporary and regional variability (KÓBOR et al. 1996), but the last decade its intensity was not estimated even by acetylene-reduction technique.

We have more information about cyanobacterial nitrogen fixation measured by acetylene-reduction (OLÁH et al. 1981; PRÉSING et al. 1996) and the stable isotope technique in Lake Balaton (PRÉSING et al. 2008). The most intensive nitrogen fixation was measured at the highest phytoplankton biomass level in 1994, when its contribution to the N-supply of algae reached 50% in the Keszthely basin, and 10% in the Siófok one (PRÉSING et al. 1996). The nutrient load of Zala River and phytoplankton biomass have decreased since the last measurements (20 years) however the phytoplankton is still dominated by N₂-fixing cyanobacteria species.

The elapsed time since the last measurements (10 years), the disputable nutrient retention of the Kis-Balaton reservoirs, and the possible problems with the acetylene-reduction method were grounds for the determination of the proportion of external N-load by cyanobacterial nitrogen fixation using the stable isotope (¹⁵N) technique. The seasonal and regional variability of N₂ fixation across the trophic gradient (Kis-Balaton and Lake Balaton), its contribution to the N demand of algae and the nutrient load of Zala River were examined. Furthermore the effect

of the different environmental factors (primarily nutrient supply) on N₂-fixation was studied.

Cyanobacterial distribution and biomass is usually estimated by microscopic identification and cell counting (UTERMÖHL 1958; NÉMETH & VÖRÖS 1986), however a number of alternative methods have also been published (automated image analyses method CONGESTRI et al. 2000; HPLC-based pigment detection SCHLÜTER et al. 2004), based on the unique cyanobacterial pigmentation. The estimation of cyanobacterial presence or dominance is well known: *in situ* fluorometric field applications (SEPPÄLÄ et al. 2007), *in vivo* sensitive fluorometric techniques (GREGOR és MARŠÁLEK 2005), remote sensing (SIMIS et al. 2005; HUNTER et al. 2008a, 2008b) and *in vitro* extraction methods have all been used for cyanobacterial quantification (SARADA et al., 1999). Since the presence of phycobiliproteins are restricted in cyanobacteria and in a few eukaryotic algal classes (*Rhodophyta*, *Cryptophyta*), they can be used to detect these taxa. Phycobilin pigments have unique absorption features, which allow the distinction of cyanobacteria and eukaryotic algae both in freshwater and marine environments (VINCENT et al. 2004; SIMIS et al. 2007). Quantitative determination of phycocyanin pigment is crucial for the calibration of *in situ*, *in vivo* and remote sensing methods. However, despite the number of studies (LAWRENZ et al. 2011), there is no standard protocol for the maximal extraction of phycocyanin from cyanobacteria cells.

Our objectives were:

1. to determine the phytoplankton N₂ fixation using ¹⁵N technique in Lake Balaton and in Kis-Balaton Water Protection System;
2. to calculate the contribution of N₂ fixation to the external N-load of the reservoir and the Lake;

3. to estimate the contribution of N₂ fixation to the algae N-demand across the trophic gradient (Kis-Balaton–Balaton system) and to examine the effect of different environmental factors (primarily nutrient supply) on nitrogen fixation;

4. to work out an effective and reproducible protocol for phycocyanin determination in pure cultures of N₂-fixing, cyanobacteria species common in Lake Balaton and Kis-Balaton for the calibration of *in situ*, *in vivo* and remote sensing methods;

5. with the newly developed method to determine the phycocyanin concentration of phytoplankton in Lake Balaton, Kis-Balaton and some reservoirs and fishponds;

6. to describe a relationship between the phytoplankton phycocyanin concentration and N₂ fixation for estimating the N₂-fixation rate on the basis of phycocyanin concentration even taking remote sensing into account, and finally to find a relationship between the phytoplankton phycocyanin concentration and species composition, which allows the estimation of cyanobacterial biomass based on phycocyanin concentration.

2. Methods

Water samples were taken from the open water areas with a 3 m sampling tube. The water was filtered through a zooplankton net with 150 µm mesh size. The nutrient concentrations of water samples were measured in a couple of hours after sampling. The determination of the dissolved and total N- (ammonium, nitrate, urea) and P-forms (soluble reactive P, total soluble- and total P) were obtained following the methods of MACKERETH et al. (1989). Chl-*a* and phycocyanin concentrations were measured by IWAMURA et al. (1970) and HORVÁTH et al. (2013), respectively. Shimadzu UV-1601 spectrophotometer was used for nutrient and pigment measurements.

The determination of nitrogen fixation was followed by PRÉSING et al. (2005). The daily nitrogen fixation was calculated from the global irradiation, the vertical light attenuation (K_d), and the light dependency parameters of fixation (V_{max} ; I_k). The nitrogen fixation per unit surface area was calculated from the rates measured at optimal light intensity and the average depth of the water (PRÉSING et al. 1999).

Primary production of the algae was estimated using an empirical equation based on water temperature and Chl-*a* concentration (VÖRÖS & V.-BALOGH 1997). The theoretical N demand of the phytoplankton was calculated from the primary production and the Redfield ratio (C:N = 5.68).

Phytoplankton samples were preserved in Lugol's solution. Algal species were identified with an inverted plankton microscope (UTERMÖHL 1958) and the wet weight of each species was calculated from cell volumes (NÉMETH & VÖRÖS 1986).

Nitrogen fixation was measured biweekly from July to October in 2009 in the KBWPS and Keszthely basin to specify the nitrogen-balance of the reservoir and for and for estimation of its contribution to the N-demand of algae.

Phytoplankton nitrogen fixation was measured during the cyanobacterial bloom in 2010 across the trophic gradient: in the two reservoirs of the KBWPS and the four basins of the Lake.

In 2011 the regional and seasonal variability of nitrogen fixation was examined from June to October monthly in the same sampling sites as measured in 2010.

The phycocyanin concentration of phytoplankton was measured during the cyanobacterial bloom in 2010 and biweekly in 2011 in the open water of Kis-Balaton and Lake Balaton. Furthermore, phycocyanin concentration was measured from 35 water samples taken from the surface of the Lake, across the trophic gradient in 2010.

Determination of phycocyanin concentration of phytoplankton from reservoirs (Marcali-, Zámolyi- and Pákozdi-reservoir) and fishponds (Balatonlelle and Fonyód) were conducted to describe a relationship between phycocyanin concentration and cyanobacterial biomass.

3. New results

1. Nitrogen fixation of phytoplankton from the Kis-Balaton and Keszthely basins were measured by ^{15}N technique in 2009. Nitrogen fixation played a significant role in the N-supply of phytoplankton, and its contribution to the N-demand of phytoplankton during the summer algae bloom, reached 30% sometimes. The negative effect of the different soluble N forms –especially ammonium and nitrate– on the N_2 -fixation in the KBWPS was defined.

2. During the phytoplankton bloom, *a*-chl related nitrogen fixation was sometimes more than two times higher than measured in Kis-Balaton at each sampling site (2009–2011), which verifies the relative N-deficient status of summer phytoplankton in the Keszthely basin.

3. A rapid and reproducible extraction method was worked out for determination of phytoplankton phycocyanin content, which was further improved to be more sensitive and reliable than previously used ones. Phycocyanin concentration of phytoplankton from Lake Balaton and Kis-Balaton, furthermore some reservoirs (Marcali-, Zámolyi- and Pátkai- reservoir) and fishponds (Balatonlelle and Fonyód) were determined at first. The decreasing phycocyanin concentration along the trophic gradient (Kis-Balaton-Lake Balaton system), and increasing concentration with the water depth as well as the changing of pigment composition with the spectral composition of the light were also detected

4. Phycocyanin concentration in pure cultures of four filamentous, N_2 -fixing cyanobacteria species common in Lake Balaton and Kis-Balaton (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Anabaena spiroides*,

Cylindrospermopsis raciborskii) was determined and emphasized that phycocyanin content of cyanobacteria is a significant species-dependent feature.

5. The statistical exponential model, which describes the relation between the N₂-fixation rates and the phycocyanin concentration in Lake Balaton and Kis-Balaton, gave relative good correlation (57.8%). This is the first and so far the only attempt for estimating the N₂ fixation rate on the basis of phycocyanin concentration even taking remote sensing into account.

6. The phycocyanin-based cyanobacterial biomass estimation with the newly developed method of phycocyanin extraction has been proved well applicable for use in different natural waters ($R^2 = 0.4168\text{--}0.8431$, $p < 0.001$) and in a wide biomass range ($R^2 = 0.8134$, $p < 0.001$).

Irodalom/References

- Congestri, R. – Federici, R. – Albertano, P. 2000: Evaluating biomass of Baltic filamentous cyanobacteria by image analysis. *Aquatic Microbial Ecology* 22: 283–290.
- Entz G. – Sebestyén O. 1942: A Balaton élete. Budapest, Királyi Magyar Természettudományi Társulat.
- Gorzó, Gy., 1990: A Kis-Balaton-tározó nitrogénforgalmának vizsgálata. *Vízügyi Közlemények LXXII*: 233–242.
- Gregor, J. – Maršálek, B. 2005: A simple in vivo fluorescence method for the selective detection and quantification of freshwater cyanobacteria and eukaryotic algae. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 33: 142–148.
- Hall, S.R. – Smith, V.H. – Lytle, D.A. – Leibold, M. A. 2005: Constraints on primary producer N:P stoichiometry along N:P supply ratio gradients. *Ecology* 86: 1894–1904.
- Herodek, S. 1984: The eutrophication of Lake Balaton: Measurements, modelling and management. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 22: 1087–1091.
- Horváth, H. – Kovács, A.W. – Riddick, C. – Présing, M. 2013: Extraction methods of phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and its application in a shallow lake. – *European Journal of Phycology* 48/3: 278–286.
- Hunter, P.D. – Tyler, A.N. – Présing, M. – Kovács, A.W. – Preston, T. 2008a: Spectral discrimination of phytoplankton colour groups: the effect of suspended particulate matter and sensor spectral resolution. *Remote Sensing of Environment* 112: 1527–1544.
- Hunter, P.D. – Tyler, A.N. – Willby, N.J. – Gilvear, D.J. 2008b: The spatial dynamics of vertical migration by *Microcystis aeruginosa* in a eutrophic shallow lake: a case study using high spatial resolution time–series airborne remote sensing. *Limnology and Oceanography* 53: 2391–2406.
- Kovács Gy. 2002: A Kis-Balaton Védőrendszer szén-, nitrogén- és kén-forgalmi folyamatai. Kutatási jelentés: 1–43.

- Kóbor I. – Szilágyi F. – Kovács Gy. – †Gorzó Gy. 1996: A Kis-Balaton Vízvédelmi Rendszer I. ütemének nitrogén forgalmának vizsgálata. 2. Kis-Balaton Ankét 530–541.
- Lawrenz E. – Fedewa, E.J. – Richardson, T.L. 2011: Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology* 23: 865–871.
- Mackereth, F.J.H. – Heron, J. – Talling, J.F. 1989. Water analysis: some revised methods for limnologists. – Freshwater Biological Association Scientific Publication.
- Németh J. – Vörös L. 1986: Koncepció és módszertan felszíni vizek algológiai monitoringjához. OKTH, Budapest.
- Oláh J. – Elsamra M.I. – Abdel-Moneim M.A. – Tóth L. – Vörös L. 1981: Nitrogénkötés halhústeremlő agroökoszisztémákban. A halhústermelés fejlesztése 10, HAKI, Szarvas.
- Platt, T. – Gallegos, C.L. – Harrison, W.G. 1980: Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687–701.
- Présing, M. – Preston, T. – Takátsy, A. – Spröber, P. – Kovács, W.A. – Vörös, L. – Kenesi, Gy. – Kóbor, I. 2008: Phytoplankton nitrogen demand and the significance of internal and external nitrogen sources in a shallow large lake (Lake Balaton, Hungary). *Hydrobiologia* 16: 465–470.
- Présing M. – Preston, T. – Kovács A. – Shafik, H.M. – Kenesi Gy. 2005: A nitrogénkötés szerepe a balatoni fitoplankton nitrogénellátásában. *Hidrológiai Közlöny* 85: 177–179.
- Présing, M. – Herodek, S. – Vörös, L. – Preston, T. – Abrusán, Gy. 1999: Nitrogen uptake by summer phytoplankton in Lake Balaton. *Archive für Hydrobiologie* 145: 93–110.
- Présing, M. – Herodek, S. – Vörös, L. – Kóbor, I. 1996. Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Balaton. *Archive für Hydrobiologie* 136/4: 553–562.
- Sarada, R. – Pillai, M.G. – Ravishankar, G.A. 1999: Phycocyanin from *Spirulina sp.*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of

- efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry* 34: 795–801.
- Schlüter, L. – Garde, K. – Kaas, H. 2004: Detection of the toxic cyanobacteria *Nodularia spumigena* by means of a 4-keto-myxoxanthophyll-like pigment in the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 275: 69–78.
- Seppälä, J. – Ylöstalo, P. – Kaitala, S. – Hällfors, S. – Raateoja, M. – Maunula, P. 2007: Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73: 489–500.
- Sidler, W.A. 1994: Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In *The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, D.A. ed.) 139–216. Kluwer, Dordrecht.
- Simis, S.G.H. – Peters, S.W.M. – Gons, H.J. 2005: Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water. *Limnology and Oceanography* 50: 237–245.
- Simis, S.G.H. – Ruiz-Verdú, A. – Domínguez-Gómez, J.A. – Peña-Martínez, R. – Peters, S.W.M. – Gons, H.J. 2007: Influence of phytoplankton pigment composition on remote sensing of cyanobacterial biomass. *Remote Sensing of Environment* 106: 414–427.
- Smith, V.H. 1983: Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 221: 669–771.
- Utermöhl, H. 1958: Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 9: 1–38.
- Vincent, R.K. – Quinn, X.M. – McKay, R.M.L. – Miner, J. – Czajkowski, K. – Savino, J. – Bridgeman, T. 2004: Phycocyanin detection from LANDSATTM data for mapping cyanobacterial blooms in Lake Erie. *Remote Sensing of Environment* 89: 381–392.
- Vörös L. – Hiripi L. – Koncz E. – Kovács A. – Présing M. – V.-Balogh K. – Lomniczy K. – H.M. Shafik, 1999: A Balaton vízminősége. *Hidrológiai Közlöny* 79: 343–344.
- Vörös L. – V.-Balogh K. 1997: A Balaton Keszthelyi-medencéjének szénforgalma. *Hidrológiai Közlöny* 85: 385–386.

Tudományos tevékenység jegyzéke/Scientific activity

Az értekezés témakörében, impakt faktorral rendelkező folyóiratban megjelent publikációk jegyzéke

Horváth, H. – Kovács, W. A. – Riddick, C. – Présing, M. 2013: Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and its application in a shallow lake. – European Journal of Phycology 48/3: 278–286. IF: 1,828.

Horváth, H. – Mátyás, K. – Süle, Gy. – Présing, M. 2013: Contribution of nitrogen fixation to the external nitrogen load of a water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System, Hungary). – Hydrobiologia 702: 255–265. IF: 1,985.

Az értekezés témakörében, referált folyóiratban megjelent publikációk jegyzéke

Horváth H. – Mátyás K. – Süle Gy. – Présing M. 2012: A fitoplankton nitrogénkötése a Kis-Balaton Vízügyi Rendszerben. – Hidrológiai Közlöny 92/5–6: 40–43.

Horváth H. – Kovács W.A. – Vörös L. – Zsigmond E. – Présing M. 2013: Fikocianin meghatározási módszerek és alkalmazásuk különböző vizeken. – Hidrológiai Közlöny 93/5–6: 40–42.

Egyéb megjelent publikációk jegyzéke

Raucsik B. – Horváth H. – R. Varga A. 2005: A Sándorhegyi Formáció szerves geokémiai vizsgálatának eredményei (Pécselyi Tagozat, Nosztori-völgy). – Földtani Közlöny 135/4.

Présing M. – Kenesi Gy. – Horváth H. – Kovács W.A. 2009: Bevonatlakó algák nitrogén- és széntartalma, valamint nitrogénfelvétele a Balaton eltérő mélységű területein. – Hidrológiai Közlöny 89/6: 46–49.

Palmer, S.C.J. – Pelevin, V.V. – Goncharenko, I. – Kovács, A.W. – Zlinszky, A. – Présing, M. – Horváth, H. – Nicolás-Perea, V. – Balzter, H. – Tóth, V.R. 2013: Ultraviolet Fluorescence LiDAR (UFL) as a Robust Measurement Tool for Water Quality Parameters in Turbid Lake Conditions. – Remote sensing, 5: 4405–4422. IF: 2,101.

Pálffy, K. – Felföldi, T. – Mentés, A. – Horváth, H. – Márialigeti, K. – Boros, E. – Vörös, L. – Somogyi, B. 2014: Unique picoeukaryotic algal community under multiple environmental stress conditions in a shallow, alkaline pan. – *Extremophiles* 18: 111–119. IF: 2,203.

Az értekezés témakörében elhangzott előadások jegyzéke

Horváth H. – Mátyás K. – Süle Gy. – Présing M. 2010: A fitoplankton nitrogénkötése a Kis-Balaton Vízüdelmi Rendszerben. – LII. Hidrobiológus Napok, Tihany, október 4–6.

Horváth, H. – Mátyás, K. – Süle, Gy. – Présing, M. 2011: Nitrogen fixation of phytoplankton in a water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System). – *Ecological Problems of Tourist Lakes*, Tihany, június 20–23.

Horváth H. – Zsigmond E. – Kovács W.A. – Présing M. 2012: Fikocianin meghatározási módszerek és alkalmazása a Balaton és a Kis-Balaton felszíni vizeiben. – Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár március 30–31.

Horváth H. – Kovács W.A. – Vörös L. – Zsigmond E. – Présing M. 2012: Fikocianin meghatározási módszerek és alkalmazásuk különböző trofitású víztereken. – LIV. Hidrobiológus Napok, Tihany, október 3–5.

Horváth H. 2012: Extrakciós módszerek összehasonlítása a fikocianin meghatározására és alkalmazásuk magyarországi víztereken. – Pannon Tudományos Nap, Nagykanizsa, október 18.

Horváth H. – Kovács W.A. – Vörös, L. – Zsigmond E. – Présing M. 2013: Fikocianin meghatározáson alapuló cianobaktérium biomassza becslés. – Jubileumi Lóczy Lajos nemzetközi emlékkonferencia 1913–2013. Kaposvár, június 14.

Egyéb előadások jegyzéke

Présing M. – Shafik H.M. – Kovács W.A. – Kenesi Gy. – Horváth H. 2010: A nitrogénkötés mérése stabil izotóppal és folyamatos algatenyésztővel. – LII. Hidrobiológus Napok, Tihany, október 4–6.

Zsigmond Eszter, – Horváth Hajnalka, – Présing Mátyás 2012: A Balaton és Kis-Balaton vízminőségének jellemzése a tápelemek és a fotoszintetikus

pigmentek (*a*-klorofill és fikocianin) koncentrációja alapján. – Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, március 30–31.

Présing M. – Kenesi Gy. – Horváth H. – Kovács W.A. 2013: A bevonatlakó algák és a fitoplankton nitrogén és széntartalma valamint nitrogénfelvétele a Balaton eltérő mélységű területein. – Jubileumi Lóczy Lajos nemzetközi emlékkonferencia 1913–2013. Kaposvár, június 14.

Palmer, S.C.J. – Hunter, P. – Lankester, T. – Hubbard, S. – Dominguez Gómez, J.A. – Riddick, C. – Spyraeos, E. – Tyler, A. – Horváth, H. – Présing, M. – Zlinszky, A. – Balzter, H. – Tóth, V.R. 2013: Evaluation of meris chlorophyll-a retrievals and time series for Lake Balaton, Hungary. – 32nd Congress of the Internatiaonal Society of Limnology, Budapest Hungary, augusztus 4–9.

Riddick, C. – Hunter, P. – Tyler, A. – Martinez-Vincente, V. – Groom, S. – Horváth, H. – Kovács, W.A. – Preston, T. – Présing, M. 2013: Spatial variability of inherent optical properties in Lake Balaton, Hungary. 32nd Congress of the Internatiaonal Society of Limnology, Budapest Hungary, augusztus 4–9.

Árva D. – Tóth M. – Horváth H. – Nagy S.A. – Specziár A. 2013: Biotikus és abiotikus környezeti tényezők szerepe az üledéklakó árvaszűnyog-együttesek eloszlásában a Balatonban. LV. – Hidrobiológus Napok, Tihany, október 2–4.

Palmer, S. – Hunter, P. – Tyler, A. – Lankester, T. – Hubbard, S. – Zlinszky, A. – Horváth, H. – Présing, M. – Nicolas-Perea, V. – Balzter, H. – Tóth, V. 2013: Satellite chlorophyll a and surface water temperature retrievals for Lake Balaton, Hungary. – LV. Hidrobiológus Napok, Tihany, október 2–4.

Az értekezés témakörében készült poszter-előadások jegyzéke

Horváth, H. – Mátyás, K. – Süle, Gy. – Présing, M. 2012: Contribution of N₂-fixation to the nitrogen balance of water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System, Hungary). – International Conference, Water resources and wetlands, Tulcea, Romania, szeptember 14–16.

Horváth, H. – Kovács, W.A. – Zsigmond, E. – Présing, M. 2013: Extraction method of phycocyanin determination in filamentous cyanobacteria. – Fresh Blood for Fresh Water, Young Aquatic Science, Wassercluster, Lunz, Ausztria, február 27–március 1.

Horváth, H. – Zsigmond, E. – Mátyás, K. – Süle, Gy. – Vörös, L. – Kovács, W.A. – Présing, M. 2013: Nitrogen fixation and phycocyanin content of phytoplankton in freshwaters. – 32nd Congress of the International Society of Limnology, Budapest Hungary, augusztus 4–9.

Horváth H. – Kovács W.A. – Zsigmond E. – Vörös L. – Mátyás K. – Süle Gy. – Présing M. 2013: A balatoni és kis-balatoni fitoplankton nitrogénkötése és fikocianin tartalma. – LV. Hidrobiológus Napok, Tihany, október 2–4.

Egyéb poszter-előadások jegyzéke

Présing, M. – Kenesi, Gy. – Horváth, H. – Kovács, W.A. 2013: Nitrogen and carbon content and nitrogen uptake of attached algae at different depth of Lake Balaton (Hungary). – Symposium fo European Freshwater Sciences, Münster, Germany, július 1–5.

Tóth, A, – Horváth, H. – G.-Tóth, L. 2013: Horizontal distribution of rotatoria plankton int he Lake Balaton (2011 and 2012). – 32nd Congress of the International Society of Limnology, Budapest Hungary, augusztus 4–9.

Présing, M. – Preston, T. – Hesham, S.M. – Kovács, W.A. – Kenesi, Gy. – Horváth, H. 2013: Nitrogen fixation measured by 15N technique and continuous flow algal culture. – 32nd Congress of the International Society of Limnology, Budapest Hungary, augusztus 4–9.

Tóth A. – Horváth H. – G.-Tóth L. 2013: A Balaton kerekcsigaféreg (Rotifera) közösségének horizontális és szezonális alakulása. – LV. Hidrobiológus Napok, Tihany, október 2–4.