1949

CILINDROSPERMOPSZIN TARTALMÚ CIANOBAKTERIÁLIS KIVONATOK ALGAKÖZÖSSÉGEKBEN BETÖLTÖTT LEHETSÉGES SZEREPE

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szerző: Dobronoki Dalma

Témavezető: Dr. Bácsi István egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2020

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Juhász Nagy Pál Doktori Iskola Környezettudományok** doktori programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

Debrecen, 2020.

……
a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Dobronoki Dalma** doktorjelölt **2016-2020** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Környezettudományok** doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*
Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2020.

……
a témavezető aláírása

CILINDROSPERMOPSZIN TARTALMÚ CIANOBAKTERIÁLIS KIVONATOK ALGAKÖZÖSSÉGEKBEN BETÖLTÖTT LEHETSÉGES SZEREPE

POTENTIAL ROLE OF CYLINDROSPERMOPSIN-CONTAINING CYANOBACTERIAL EXTRACTS IN ALGAL ASSEMBLAGES

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

Írta: **Dobronoki Dalma** okleveles hidrobiológus, biológiatanár

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**
(Környezettudományok Doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Bácsi István

Az értekezés bírálói:

…… ……
…… ……

A bírálóbizottság:
elnök: …… ……
tagok: …… ……
…… ……
…… ……
…… ……

Az értekezés védésének időpontja:. …… … .

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK 6

1.1. Bevezetés 6
1.2. Célkitűzések 8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 12

2.1. A cilindrospermopszin 12
2.1.1. A termelő organizmusok elterjedése 12
2.1.2. A cilindrospermopszin termelése 15
2.1.3. A cilindrospermopszin biológiai hatásai 16
2.1.4. A cilindrospermopszin degradációja 26
2.2. A fitoplankton fajok kitartóképlet képzése 27
3. ANYAG ÉS MÓDSZER 31

3.1. Az alkalmazott taxonok bemutatása 31
3.2. Nevelési körülmények 36
3.3. A cianobakteriális sejtkivonatok előállítása 37
3.4. A kísérletek kivitelezése 38
3.4.1. Különböző cianobakteriális sejtkivonatok *Scenedesmus obtusus* zöldalgára gyakorolt hatásainak vizsgálata 38
3.4.2. A CYN tartalmú cianobakteriális sejkivonatok *Haematococcus pluvialis* zöldalgára gyakorolt hatásainak vizsgálata 40
3.4.3. CYN tartalmú cianobakteriális sejtkivonatok *Chlorococcum* sp. zöldalgára kifejtett hatásainak vizsgálata 42
3.5. A klorofill koncentráció meghatározásának menete 43
3.6. A foszfát koncentráció meghatározásának menete 43
3.7. A foszfatáz enzimek aktivitásának mérése 44
3.8. Statisztikai elemzés 45
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 46

4.1. A különböző cianobakteriális kivonatok hatása a Scenedesmus obtusus zöldalgára 46
4.1.1. A *S. obtusus* tenyészetek növekedésében bekövetkezett változások 46
4.1.2. A *S. obtusus* tenyészetek foszfát felvételében bekövetkezett változások 54
4.1.3. Változások a *S. obtusus* foszfatáz aktivitásában 57

4.2. A különböző cianobakteriális kivonatok hatása a Haematococcus pluvialis zöldalgára 67
4.2.1. A *H. pluvialis* tenyészetek sejtszámában bekövetkezett változások 67
4.2.2. A sejtek morfológiai változásai a *H. pluvialis* tenyészetekben 70
4.2.3. A *H. pluvialis* tenyészetek foszfát felvételében bekövetkezett változások 78
4.2.4. A *H. pluvialis* tenyészetek foszfatáz aktivitásában bekövetkezett változások 81
4.3. A különböző cianobakteriális kivonatok hatása a Chlorococcum sp. zöldalgára 87
4.3.1. A *Chlorococcum* sp. sejtszámában bekövetkező változások 87
4.3.2. A *Chlorococcum* sp. foszfát felvételében bekövetkező változások 90
4.4. Új tudományos eredmények 93
5. ÖSSZEFOGLALÁS 97
6. SUMMARY 103
9. FÜGGELÉK 139
10. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE 162

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

1.1. Bevezetés

A cianobaktériumokat (Cyanobacteria) bolygónk legősibb élőlényei között tartjuk számon. Kiemelkedő szerepet töltöttek be a mai oxigéndús légkör kialakításában. Több fajuk szimbionta vagy mutualista kapcsolatban áll gombákkal, algákkal, növényekkel és állatokkal, ezáltal lehetővé teszik önmaguk és a partner számára a túlélést kedvezőtlen vagy akár szélsőséges élőhelyeken (Paerl, 1982). A figyelem középpontjába állítja őket, hogy számos biológiailag aktív metabolitot termelnek, köztük a cianotoxinokat. Ezen vegyületek toxikus hatása miatt az OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) a cianobaktériumokat, mint patogéneket osztályozta, annak ellenére, hogy nem képesek se megtámadni, se kolonizálni a gazdaszervezetet (OECD, 2005). 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).

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 egyes interakciós vizsgálatok során elsősorban arra kell

választ adni, hogy kompetícióról, vagy esetleg az ennél komplikáltabb módon tanulmányozható allelopátiáról van-e szó. Napjainkban a vizes cianobakteriális kivonatok használata egyre gyakoribb a fitoplankton interakciós vizsgálatai során (Dobronoki et al., 2014; Rzymksi et al., 2014; B-Béres et al., 2015; Bittencourt-Oliveria et al., 2015, 2016; Dobronoki et al., 2019), így modellezve a természetben is végbemenő folyamatokat, akár egy cianobakteriális vízvirágzás összeomlását. 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 cilindrospermoszin (CYN) a mikrocisztinek (MCs) után a második legjobban kutatott és ismert cianobakteriális toxin. A fő CYN termelő nemzetségek az igen sokféle víztértípusban előforduló 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 CYN biológiai szerepének megértéséhez. Fontos kérdés, hogy miképpen befolyásolhatja a toxin az algafajok abundanciáját, milyen különbségek lehetnek a különböző fajok toleranciájában. Irodalmi adatok a CYN algafajok foszfatáz enzim aktivitására gyakorolt hatására mutatnak rá (Bar-Yosef et al., 2010). Ezért munkánk központi részét képezte a foszfát-anyagcsere, illetve az abban 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.

1.2. Célkitűzések

Kísérleteink során három, részben eltérő ökológiai igényű zöldalga (Chlorophyta) faj (*Scenedesmus obtusus*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum* sp.) laboratóriumi izolátumait alkalmaztuk. A *Scenedesmus* genusba tartozó fajok planktonikus, kozmopolita algák, melyekkel leginkább eutróf állóvizekben találkozhatunk (John et al., 2002). A *Haematococcus* nemzetség tagjai szintén kozmopoliták, a Déli-sarkvidéktől eltekintve Földünk valamennyi kontinensén megtalálhatóak (Pringsheim, 1996; Susella és Toppo, 2006), beleértve az átmeneti vizeket, mint pl. az esőzések után kialakult vízfelgyülemléseket, mesterséges medencéket, akár madáritatókat is (Czygan, 1970; Burchardt et al., 2006). A *Chlorococcum* nemzetség fajai egyaránt megtalálhatóak vízi (Kroes, 1971, Ohta el al., 1993; Harwati et., 2012) és szárazföldi (Zhang et al., 1997; Klochkova et al., 2006) környezetben.

A tenyészeteket különböző mennyiségű és CYN koncentrációjú ciaonbakteriális 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 μg 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 *Chrysosporum* (*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 (4.1. fejezet). 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 μg 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 (4.2. fejezet). 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 sejttípusok aránya a kezelt tenyészetekben?
- Befolyásolja-e a *C. ovalisporum* kivonat a tenyészetek cisztásodási folyamatait illetve hatást gyakorol-e a sejtek színanyag 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 sejttörmeléket tartalmazó) és centrifugált (sejttörmelék mentes) cianobakteriális sejtkivonattal. Vizsgálni kívántuk, van-e különbség a teljes és a centrifugált cianobakteriális kivonattal kezelt a *Chlorococcum* sp. tenyészetekben

bekövetkezett változásokban (4.3. fejezet). 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A cilindrospermopszin

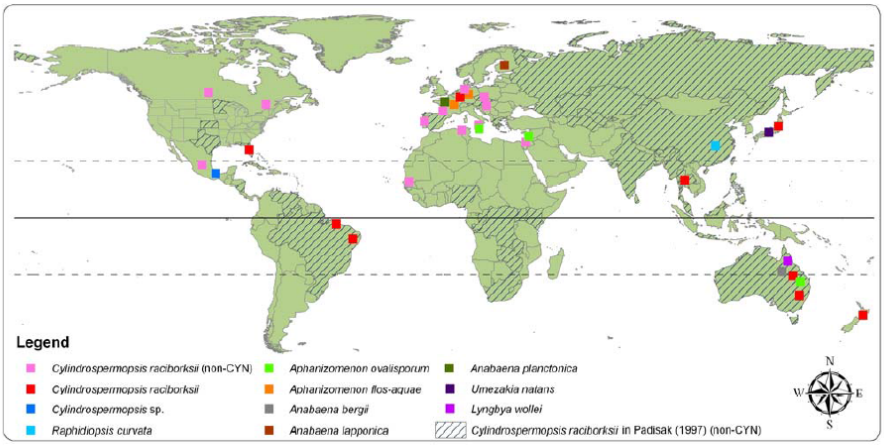
2.1.1. A termelő organizmusok elterjedése

A cilindrospermopszin (CYN) a citotoxikus alkaloidok közé tartozó cianotoxin. 1992-ben izolálták először egy ausztráliai *Cylidrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) törzsből (Ohtani et al., 1992), a toxin neve a cianobaktérium nemzetség nevéből ered. A *C. raciborskii* nagyméretű virágzása az ausztráliai Palm Islanden emberi megbetegedéseket is okozott (Byth, 1980). További CYN termelő nemzetségek a *Cylindrospermopsis* mellett az *Umezakia* (Harada et al., 1994), *Chrysosporum* (korábban *Aphanizomenon*; Banker et al., 1997; illetve *Anabaena*; Schembri et al., 2001) *Raphidiopsis* (Li et al., 2001; McGregor et al., 2011); *Aphanizomenon* (Preussel et al., 2006; Rücker et al., 2007; Bláhová et al., 2008; 2009), *Anabaena* (Spoof et al., 2006), *Dolichospermum* (korábban *Anabaena*; Brient et al., 2009; Akcaalan et al., 2014), *Lyngbya* (Seifert et al., 2007), illetve CYN termelést mutattak ki még néhány *Oscillatoria* törzs esetében is (Mazmouz et al., 2010). Bohunická és munkatársai 2015-ben CYN termelést írtak le a talajban élő *Hormoscilla pringsheimii* cianobaktériumnál. A termelő törzsek eredendően elsősorban trópusi, szubtrópusi elterjedésűek, azonban az elmúlt években számos szakirodalom számolt be mérsékelt övi (Poniedziałek et al., 2012), sőt száraz éghajlaton (Mohamed és Al-Shehri, 2013) való megjelenésükről. Napjainkra globális szétterjedésük

gyorsulni látszik (Fastner et al., 2003, 2007; Quesada et al., 2006), már bolygónk összes kontinensén jelen vannak (1. ábra; Rzymski és Poniedziałek, 2014). Magyarországi izolátumokból mindez idáig ugyan nem mutattak ki CYN-t (Törökné et al., 2004; Vasas et al., 2010; Vehovszky et al., 2013), azonban potenciálisan CYN termelő fajok évről éve okoznak vízvirágzást. CYN tartalmú vízvirágzások során a legtöbb esetben a toxin vízben mért koncentrációja meghaladta az ívóvizekre vonatkoztatott jelenlegi határértéket (1 μg l^{-1}; Humpage és Falconer, 2003). Európai édesvizekben a CYN eddig mért legmagasabb koncentrációi 9 és 126 μg l^{-1} között mozogtak (Bogially et al., 2006; Rücker et al., 2007). A CYN termelő cianobaktériumok globális szétterjedésének magyarázatára jelenleg két fő hipotézis létezik. Az egyik a klímaváltozást és a globális felmelegedést jelöli meg kiváltó tényezőként, melyeknek eredményeképpen a vizek átlaghőmérséklete folyamatosan emelkedik. A másik elmélet szerint olyan ökotípusok szelektálódtak, melyek tolerálni képesek a trópusi klímától eltérő környezeti körülményeket is. Nem zárja ki azonban egymást e két feltételezés (Briand et al, 2004), sőt mi több, a jelenleg legelfogadottabb nézet, hogy a szélesebb tolerancia spektrummal rendelkező ökotípusok szelektálódása erősen korrelál klímánk gyors ütemű felmelegedésével (Briand et al., 2004). A környezeti változások új, kolonizációra alkalmas élőhelyeket nyitnak meg a cianobaktériumok számára, ezzel pedig a törzsek új adaptációs irányokat és fenotípusos plaszticitást mutatnak. A globális diszperziót molekuláris filogenetikai módszerekkel is vizsgálták. Haande és kutatócsoportja (2008) arra szerettek volna választ adni, van-e különbség az egyes földrajzi régiókból származó

Cylindrospermopsis raciborskii populációk meghatározott génjeiben, és ha igen, milyen mértékű. Eredményeik rámutattak, hogy az eltérő földrajzi régiókból származó populációk génkészletei variábilisak. Hangsúlyozni kell azonban, hogy adott fajon belül nem minden törzs képes cilindrospermopszin termelésére, ebből eredően egy, a toxin termelésére képes faj jelenléte adott víztesben még nem jelenti törvényszerűen azt, hogy toxikus törzzsel állunk szemben (Kokocinski et al., 2009). O'Neil és munkatársai (2012) rámutattak arra, hogy az antropogén eredetű eutrofizációs folyamatok és a globális felmelegedés a legfontosabb tényezők között vannak a cianobaktériumok különböző geográfiai régiókban történő terjeszkedésében.

CYN termelő *C. raciborskii* törzseket csak Ázsiában és Ausztráliában izoláltak, Európában és Afrikában nem. CYN termelő *Aphanizomenon* fajok a világ minden régiójából leírásra kerültek, ellenben CYN termelő *Anabaena* fajokat európai vizekből mutattak ki (Rzymski és Poniedziałek, 2014), vagyis nem egyértelmű a CYN termelés képessége és a földrajzi elterjedés közötti összefüggés.



1. ábra. CYN-t, vagy CYN analógjot termelő cianobaktérium törzsek eloszlása. „Non-CYN: az adatok hiányosak. Sávozott területek: a *C. raciborskii* elterjedése (felülvizsgálva: Padisák, 1997). Az ábra Kinnear (2010) alapján készült.

2.1.2. A cilindrospermopszin termelése

Napjainkig megválaszolatlan kérdés, miért termelnek bizonyos cianobaktérium törzsek cianotoxinokat. Egyes kutatók szerint ezen metabolitok olyan szerepet láttak el a termelő sejtekben, mely mára elveszett (Carmichael, 1994). Ellentmond azonban ennek a feltevésnek az a tény, hogy a cianotoxinok termelése energetikailag nagymértékben terheli az anyagcserét, és ennek ellenére a mai napig jelen van. Metcalf és munkatársai (2002), valamint Lindsay és munkatársai (2006) dolgozatukban a cianotoxin termelést a predátorokkal szembeni védekező mechanizmusként értelmezik, mely előnyhöz jutatja a termelő szervezetet más élőlényekkel szemben (Kearns és Hunter, 2002; Engelke et al., 2003).

A CYN termelés okára sokan, sokféleképpen próbáltak választ találni, egyértelmű elmélet azonban még nem alakult ki (Saker és Griffith, 2000; Shalev-Alon et al., 2002; Bácsi et al., 2006; Yilmaz et al., 2008; Cires et al., 2011; Rzymski és Poniedziałek, 2014). Egyes szerzők a termelésre esetlegesen hatással lévő környezeti tényezőket kutatták, mint pl. a hőmérséklet (Saker és Griffith, 2000), tápanyag limitáció (Bácsi et al., 2006; Vasas et al., 2013), fényintenzitás (Cires et al., 2011).

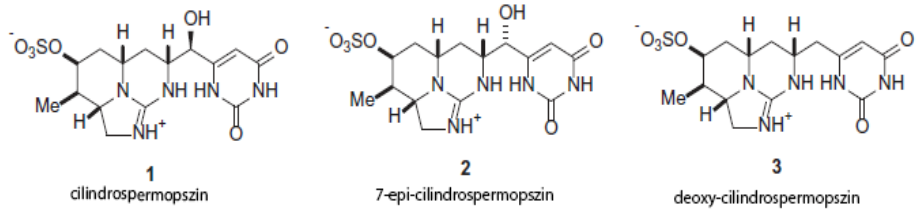
Az eredmények rámutattak ezen tényezők kiemelkedő szerepére, azonban arra is, hogy fokozódó stressz esetén mérhető extracelluláris toxin koncentrációk egyes esetekben növekvő, míg más esetekben csökkentő tendenciát mutatnak, továbbá néhány esetben a toxin intracelluláris marad (nem kerül ki a sejtből). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a CYN termelése valamint kibocsátása nagymértékben izolátumfüggő, pleiotróp sajátosság (Rzymski és Poniedziałek, 2014). Más kutatók a CYN termelés genetikai hátterét vizsgálták. Yilmaz és kutatócsoportja (2008) feltárták, hogy a CYN termelés feltétele a peptid szintetáz (PS) és a poliketid-szintáz (PKS) enzimek együttes működése. Működő PS és PKS hiányában nem íródnak át a toxin szintézisért felelős gének, nem történik CYN termelés. *Chrysosporum ovalisporum* esetében három gén megléte szükséges a CYN bioszintéziséért. Az aoaA amidinotranszferázt, az aoaB hibrid nem riboszómális poliketid/peptid szintázt, az aoaC poliketid szintázt kódol (Shalev-Alon et al., 2002). Ezen három gén működése elengedhetetlen a termelés szempontjából. Hangsúlyozni kell azonban, hogy egy fajon belül az egyes törzsekben nem csak a toxin bioszintézis meglétében, annak mértékében is különbözőségek mutatkoznak.

2.1.3. A cilindrospermopszin biológiai hatásai

A CYN kémiai sajátosságai

A CYN vízben jól oldódik, szerkezete változó fényen, pH-n és hőmérsékleten is rendkívül stabil (Chiswell et al., 1999), ezért jelenlétére

a víztérben hosszabb időn keresztül számítani kell (Chorus és Bartram, 1999). Két fő strukturális variánsa van, a 7-epi-CYN és a deoxi-CYN (2. ábra; Cartmell et al., 2017; Li et al., 2001; Norris et al., 1999), melyek esetében nem teljesen tisztázott, hogy CYN-prekurzorokról, variánsokról vagy degradációs termékekről van szó (Norris et al., 1999; Mazmouz et al., 2011). Cartmell és munkatársai (2017) a 7-epi-CYN és a deoxi-CYN mellett további két CYN alkaloidot említenek meg, melyekben a szulfo-csoport helyén hidroxil vagy acetoxi csoport van. A CYN toxicitásáért nagy valószínűséggel a molekula uracil csoportja felelős (Banker et al., 2001).



2. ábra. A CYN (1) és két fő strukturális variánsa (2, 3; Cartmell et al., 2017. nyomán).

A CYN-nek számos negatív hatását írták le mind autotróf, mind heterotróf szervezetek tekintetében. A CYN irreverzibilisen gátolja a protein és glutation szintézist (Terao et al., 1994; Froscio et al., 2001, 2003, 2008), károsítja a DNS-t (Humpage et al., 2000; Shen et al., 2002). Általános citotoxikus hatással bír, bár úgy tűnik, a toxin metabolizmusa fokozza a toxicitását, ezért főleg hepatotoxinként említik (Bernard et al., 2003; Fastner et al., 2003; Saker et al., 2003). Ezen kívül

immunszupresszáns hatást fejt ki a T-limfocitákra és a neutrofil sejtekre (Poniedziałek et al., 2012; 2014). Rymuszka és Sieroslawska (2014) valamint Poniedziałek és munkatársai (2015) a oxidatív stresszt indukáló hatásáról számoltak be.

Fontos hangsúlyozni, hogy a CYN termelő populációkkal együtt élő szervezetek a toxin bioakkumulációjának, míg a tápláléklánc magasabb szintjein elhelyezkedő élőlények a toxin biomagnifikációjának vannak kitéve. Ebből adódóan az ember is veszélyeztetett lehet, ha olyan élőlényt fogyaszt, melyben a toxin akkumulálódott (Kinnear, 2010).

A CYN bejutása a célszervezetbe

A CYN célszervezetbe való bejutásának pontos mechanizmusa nem teljesen ismert. Egyes szerzők a molekula kis méretében keresik a választ, mely passzív diffúzióhoz vezethet (Chong et al., 2002). Kémiai jellemzői, mérete és hidrofil természete miatt nem valószínűsíthető a kettős membránon való keresztüljutása, ebből kifolyólag valószínűleg transzportereken keresztül kerül be a sejtekbe (Runnegar et al, 2002; Froscio et al., 2009). Froscio és munkatársai (2009) uracil nukleobázis transzporteket vizsgálva rávilágítottak arra, hogy a CYN felvétele nem energiafüggő, mert 4°C-on is lejátszódott, amely hőmérsékleten az energiafüggő folyamatok minimalizálódnak. Ezt az eredményt támasztják alá Pichardo és munkatársai (2017) eredményei is, akik emberi Caco-2 sejtvonalakon hasonló CYN felvételi rátát mértek 4 illetve 37°C-on.

Rogers és munkatársai (2007) kiemelik, hogy a toxin metabolizálására van szükség a toxikus hatások teljes megnyilvánulásához, ez pedig a CYN-nak kitett élőlény számára bizonyos fokú védelmet nyújt. Ebből kiindulva azok az organizmusok, melyekből hiányzik valamilyen specifikus toxin metabolizáló rendszer (pl.: máj vagy hepatopankreász), kisebb mérgezési tüneteket mutatnak, mint pl. a korai fejlettségi állapotban lévő emlős fajok is. Jelentős szerepet játszik a molekula toxicitásának kialakulásában a citokróm P-450-es rendszer (Pearson et al., 2010), mely a sejtben számos metabolitot úgy alakít át, hogy az reakcióképessé válik, és a DNS-hez, illetve a fehérjékhez kötődve ún. adduktokat hoz létre (Mandl, 2002). Shaw és munkatársai (2000) kimutatták, hogy a CYN képes a sejtekben ilyen adduktok kialakítására a DNS molekulákkal.

A CYN hatása az algaközösségekre

Nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre a CYN algaközösségekre, cianobaktériumokra és eukarióta algákra kifejtett hatásáról. Campos és munkatársai kísérleteiben 0,005-0,179 μg ml^{-1} tisztított cilindrospermopszin stimulálta, ugyanakkor 0,032-0,333 μg ml^{-1} toxin koncentrációjú teljes cianobakteriális sejtkivonat szignifikánsan gátolta *Chlorella vulgaris* tenyészetek sejtszám növekedését (Campos et al., 2013). *Chlamydomonas reinhardtii*, és *Nannochloropsis* sp. (Pinherio et al., 2013) tenyészetek esetében 0,025-0,5 μg ml^{-1} koncentrációjú részlegesen tisztított CYN nem gátolta a zöldalgák

sejtszámnövekedését, de magasabb koncentrációk már szignifikáns növekedésgátlást okoztak.

Egyes szerzők szerint a CYN-nek meghatározó szerepe lehet az allelopátiában. Az allelopátiának kiemelt szerepe van a fajok közötti kompetícióban (Legrand et al., 2003). Az allelopátia során az adott populáció olyan vegyületet (allelokemikália) termel és bocsát ki, ami hatással van az ugyanazon víztestben élő más élőlénycsoportokra is (Legrand et al., 2003), ezáltal formálja a közösséget (Keating et al.,1977; Vardi et al., 2002; Takamo et al., 2003). Általánosságban elmondható, hogy az allelokemikália a termelő élőlény kompetítoraira és predátoraira hat, ellenben a toxin a termelő sejttel közvetlen kapcsolatba kerülő bármilyen más élőlényre is kifejtheti hatását. Ennek ellenére az allelopátia és a toxicitás nem zárja ki egymást, az allelokemikáliák között találkozhatunk toxinokkal. Az allelokemikália-termelés nem köthető feltétlenül taxonhoz, ellenben édesvizekben a toxintermelés főleg a cianobaktériumokra jellemző. Az allelokemikáliák hatása széleskörű, míg a toxinok leginkább enzim-inhibitorok, vagy membránreceptorokhoz kötődve fejtik ki hatásukat. Az allelokemikáliák ökológiai szerepe a legtöbb esetben tisztázott, ellenben a toxinok esetében ez még kevésbé ismert (Leflaive et al., 2007).

2.1.3.1. A cilindrospermopszin hatásai az algák foszfatáz aktivitására

Az élő szervezetekben a foszfornak kiemelkedő szerepe van. Jelen van a nukleinsavakban, a fehérjékben és egyéb metabolitokban

(Merchant és Helmann, 2012). Az anyagcsere-folyamatok különböző foszforilált vegyületeket igényelnek.

A víztestekben fellelhető szervetlen és szerves foszforformák mind az algasejtek, mind pedig a teljes algaközösség szempontjából megkérdőjelezhetetlen szereppel bírnak. Számos mikroalga nagyobb mennyiségű foszfort vesz fel a környezetéből, mint amennyit hasznosítani tud (Powel et al., 2008, 2009; Dyhrman 2016). Normál esetben, például egy természetes tengeri élőhelyen, az algasejt száraztömegének megközelítőleg 1%-át teszi ki a foszfor (Grobbelaar 2004, 2013). Ez az érték az ún. „luxus felvétel" során jelentősen megnő, mely esetben a sejt száraztömegének akár 4-6%-át is a foszfor teszi ki (Powell et al., 2008; 2009; Dyhrman 2016; Schreiber et al., 2018). A feleslegben felvett foszfátot a sejt tartalékba helyezi, polifoszfát raktárakat hoz létre (Kuhl 1974; Allen 1984, Nishikawa et al., 2006). Több irodalmi adat mutat rá arra, hogy a szervetlen foszfor képes leginkább befolyásolni a víztestben zajló elsődleges termelést (Schindler, 1977; Hecky és Kilham, 1988; Hudson et al., 2000), mely alapján kijelenthető, hogy a rendelkezésre álló foszfát vagy annak hiánya meghatározó hatással van az algaközösségek összetételére.

2010-ben Bar-Yosef és munkatársai arról számoltak be, hogy az izraeli Kinneret tóban erős korreláció állt fenn a vízben mérhető alkalikus foszfatáz aktivitás és a CYN-termelő *Chrysosporum ovalisporum* denzitás között. Kutatásuk során azt találták, hogy a CYN-termelő törzsek egyfajta allelopatikus interakció során "kényszerítik" a fitoplankton közösség tagjait alkalikus foszfatáz termelésre. Az alkalikus foszfatáz mennyisége foszfát limitált körülmények között növekedik

meg, szerepe pedig abban áll, hogy hidrolizálja a víztérben lévő foszfátésztereket, mely foszforforma a primer producensek számára nem felvehető. Hasonló eredményekre jutottak, amikor laboratóriumi kísérletek során tisztított CYN-nal kezeltek, illetve CYN-tartalmú *Chrysosporum ovalisporum* tenyészetek szűrt tápoldatába oltottak *Chlamydomonas reinhardtii* és *Debarya* sp. tenyészeteket. Mindkét esetben szignifikánsan nőtt a tenyészetek alkalikus foszfatáz aktivitása, annak ellenére, hogy a tápoldatban elegendő mennyiségben rendelkezésre állt a felvehető foszfát. Különböző festési eljárások alkalmazásával a *Chrysosporum ovalisporum* sejtekben nem sikerült kimutatni saját enzimaktivitást, ellenben nagy mennyiségű polifoszfátot mutattak ki. A *Chrysosporum* saját alkalikus foszfatáz aktivitása csak akkor vált megfigyelhetővé, miután a sejtek saját polifoszfát tartalékai teljesen elfogytak. Eredményeik azt sugallják, hogy a CYN egy olyan másodlagos anyagcseretermék, ami hatással van más szervezetek alkalikus foszfatáz szekréciójára, és így a CYN-termelő szervezet a fitoplankton közösség domináns tagjává válhat a vízvirágzások idején. Ezen munka eredményei között kiemelkedően érdekes az, hogy a cianobaktérium tápoldat fokozottabb hatást váltott ki, mint a tisztított toxin, annak ellenére, hogy a tápoldat toxintartalma jóval alacsonyabb volt (7-8 μg ml^{-1}), mint a tisztított toxiné (50 μg ml^{-1}). Ez arra enged következtetni, hogy a tápoldatban más metabolitok, szinergisztikus hatások is szerepet játszhatnak a megfigyelt jelenségek kialakulásában (Bar-Yosef et al., 2010; Bittencourt-Oliveira et al., 2016). A kutatócsoport álláspontja alapján a jelenség allelopátia, továbbá a toxint

termelő sejteknek „gazdaságosabb” a CYN előállítása, mint az alkalikus foszfatáz szintézise.

A témában folyó további kutatások során genetikai vizsgálatokkal azt is megállapították, hogy CYN jelenlétében indukálódott az algaközösség tagjainak PHO (Phosphate) regulonja. Az itt található gének jelentős szerepet játszanak a szervetlen foszfát asszimilációjában, valamint felvételében. A pstS génnek a felvételben van domináns szerepe, a phoD és phoX gének intra- és extracelluláris AP-ázt (Alkaline phosphatase) kódolnak. Továbbá megfigyelték a PHO regulon mellett a *C. ovalisporum* aoa génjeinek szignifikáns indukcióját is, mely gének fő funkciója a toxin szerkezetének kialakítása (Shalev-Malul et al., 2008; Bar-Yosef et al., 2010).

Microcystis aeruginosa cianobaktérium tenyészetekben a 0,001 és 0,005 $\mu g \cdot ml^{-1}$ toxin koncentráció csak kismértékű növekedésgátlást okozott, ellenben a kontrollhoz képest szignifikáns alkalikus foszfatáz aktivitás emelkedést figyeltek meg (Rzymksi et al., 2014). Hasonló eredményre jutott Zhang munkatársaival 2017-ben: *Chrysosporum ovalisporum* jelenlétében megnőtt a *Microcystis panniformis* tenyészetek alkalikus foszfatáz aktivitása.

A toxikus metabolitok pontos környezeti szerepének modellezése bonyolult folyamat. Ezen vizsgálatokhoz egyaránt használnak tisztított toxint, illetve cianobakteriális sejtkivonatot (Bar-Yosef et al., 2010; Campos et al., 2013). A tisztított toxin előállítása költséges és az esetek többségében gyengébb hatást vált ki, mint a cianobakteriális sejtkivonat. Ennek hátterében az áll, hogy a kivonatban – a toxin mellett – jelen vannak más anyagcseretermékek, melyek befolyásolni képesek a toxin

más sejtekre kifejtett hatását (Bittencourt-Oliveria et al., 2015). A teljes sejtkivonatok hatásának vizsgálata környezeti szempontból relevánsabb (Bittencourt-Oliveria et al., 2015, 2016), hiszen a toxin sosem csak önmagában van jelen a rendszerben. Viszont hangsúlyozni kell, hogy teljes kivonatok használata az allelopátia vizsgálatára kevésbé megfelelő, mivel a kivonatban jelen vannak olyan komponensek is, amelyek csak a sejt lízise után kerülnek extracelluláris állapotba, az allelopatikus interakciók pedig csak élő sejteket érintenek (Leflaive és Ten-Hage, 2007).

2.1.3.2. A cilindrospermopszin és az oxidatív stressz

Az oxidatív stressz kialakulásáért a sejtben természetes körülmények között is jelenlévő oxigén tartalmú reaktív szabadgyökök (ROS) tehetők felelőssé. A sejtben megtalálható antioxidáns enzimrendszer egy idő után nem tudja hatástalanítani a felgyülemlő szabadgyököket, nem tudja ellátni védő szerepét, ekkor beszélünk oxidatív stresszről (Sies, 2018).

Fotoszintetizáló élőlények esetében fokozott ROS aktivitásról számoltak be különböző nehézfémeknek (Stoiber et al., 2011; Weckx és Clijsters, 1996), illetve herbicideknek (Alscher et al., 1997) való kitettség során, valamint túl erős fényintenzitás (Foyer et al., 1997), extrém UV sugárzás és hőmérsékleti tartomány (He és Häder, 2002), szárazság (Loggini et al., 1999), ozmotikus stressz (Boo és Jung, 1999) vagy akár egyes patogének (Low és Merida, 1996) hatására. Hasonlóan a differenciáltabb fotoszintetizáló élőlényekhez, a különböző

cianobaktérium- és eukarióta algafajok tekintetében is elmondható, hogy leggyakrabban a fényviszonyok megváltozása (extrém mértékű UV sugárzás) áll a sejtek megemelkedett ROS koncentrációjának hátterében (Cheloni és Slaveykova, 2018). A túl erős sugárzás negatívan hat mind az algák, mind a cianobaktériumok növekedésére, fotoszintetikus aktivitására, a színanyagok bioszintézisére, egyaránt károsodik a sejt struktúrája, valamint a sejt fehérjéi és DNS-e (Xue et al., 2005, Holzinger és Lutz, 2006; Ehling-Schulz és Scherer, 1999).

Újabb irodalmi adatok a CYN oxidatív stresszt indukáló hatásáról számoltak be (Humpage et al., 2005; Gutiérrez-Praena et al., 2011; Liebel et al., 2011; Pierto et al., 2011; Gutiérrez-Praena et al., 2012a,b; López-Alonso et al., 2013; Štraser et al., 2013; Freitas et al., 2015; Sieroslauska és Rymuszka, 2015). CYN által indukálódott oxidatív stresszt mutattak ki egerek májsejtjeiben (Humpage et al., 2005; López-Alonso et al., 2013), halak leukocitáiban (Sieroslauska és Rymuszka, 2015) és májsejtjeiben (Liebel et al., 2011). Megnövekedett ROS koncentrációt detektáltak különböző szervekből származó sejtvonalakban, mint például PLHC-1-ben (hal máj – Gutiérrez-Praena et al., 2011), Caco-2-ben (emberi vastagbél - Gutiérrez-Praena et al., 2012a), HUVEC-ben (köldökvénából származó endotélium - Gutiérrez-Praena et al., 2012b) és Hep-G2-ben (emberi hepatóma – Štraser et al., 2013). Pierto és munkatársai (2011) ázsiai rizsben, Freitas és munkatársai (2015) kerti salátában mutattak ki CYN hatására indukálódott oxidatív stresszt. Ugyanakkor ismereteink nagymértékben hiányosak arra vonatkozóan, rendelkezik-e a CYN oxidatív stresszt indukáló hatással az algaközösségek tagjaira vonatkozóan.

2.1.4. A cilindrospermopszin degradációja

A CYN molekula lebomlására egyre több vizsgálat irányul (Senogles et al., 2000, 2001; Wormer et al., 2008; Everson et al., 2009). Laboratóriumban, klórozással már sikeresen lebontották a CYN-t (Senogles et al., 2000), de ennek feltétele volt, hogy szerves anyagok csak kis koncentrációban legyenek jelen a közegben. Továbbá titánium-oxiddal, UV besugárzással és fotokatalitikus degradációval (Senogles et al., 2001), valamint magas pigment koncentráció jelenlétében erős napsugárzással (Chiswell et al., 1999) szintén sikerült lebontani a CYN-t. Ezen vizsgálatok víztisztítási és természetvédelmi szempontból is kiemelten fontosak, hiszen a cianotoxinok, köztük a CYN és származékai egyre több víztestben kisebb-nagyobb koncentrációban jelen vannak. Wormer és munkatársai (2008) egy 40 napon keresztül tartó, CYN degradációját vizsgáló kutatásuk eredményeképpen arról számoltak be, hogy a kísérlet időtartama alatt még a természetes baktériumközösség jelentléte ellenére is a toxin mennyisége csupán csekély mértékben csökkent. Némely baktérium törzs hatékony bizonyos cianotoxinok eltávolításában, beleértve a CYN-t is (probiotikus fajok – Nybom et al., 2008; *Aeromonas* sp. – Dziga et al., 2016). Dziga és munkatársai (2016) rámutatnak, hogy ugyan vannak baktérium törzsek, melyek hatékonynak bizonyulnak a toxin eltávolításában (pl. *Aeromonas* sp.), de a toxin eltávolításnak hatékonyságát nagymértékben befolyásolja a környezet hőmérséklete és kémhatása is.

Összességében elmondható, hogy mivel a CYN viszonylag stabil molekula, természetes körülmények között degradációja hosszú

folyamat, adott víztestben a CYN perzisztenciájára relatíve hosszabb időintervallumon keresztül számítani lehet.

2.2. A fitoplankton fajok kitartóképlet képzése

Az algák világában számos törzs esetében találkozhatunk kitartóképletekkel, vagy más néven cisztákkal, pl. a sárgamoszatok (Chrysophyta; Kristiansen, 2008), a kovaalgák (Bacillariohyta; Blas et al., 2016), a páncélos ostorosok (Dinoflagellata; Anderson és Wall, 1978; Dale, 1983 Belmonte et al., 1995; Burkholder és Glasgow 1995; Tsujino et al., 2002; Pati és Belmonte, 2003), vagy a zöldalgák (Chlorophya; Guerin et al., 2003) esetében. A kitartóképletek egyrészről a kedvezőtlen körülmények átvészelését, másrészről a faj térbeli és időbeli terjedését szolgálják (Lampert 1995; Hairtson et al., 1996; Rengefors et al., 1996; Rengefors és Anderson et al., 1998).

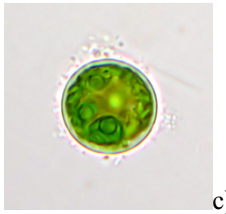
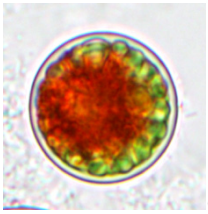
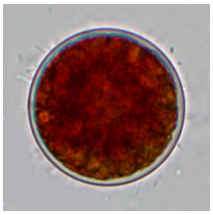
A Chrysophyták változatos megjelenésű cisztáival leggyakrabban édesvizekben találkozhatunk. Jellemző kitartóképleteik az endogén keletkezésű sztomatociszták, melyek ezen élőlények diszperziójában is kiemelkedő szerepet kapnak (Kristiansen, 2008). A környezeti feltételek kedvezőtlenné válásával a Bacillariophyta törzsön belül is találkozhatunk kitartóképlet képzéssel (Blas et al., 2016). A Dinoflagellata-k kitartóképletei több évtizeden keresztül életképesek maradnak az üledékben (Belmonte et al., 1995). A Dinoflagellata-k kitartóképlet képzését leginkább tengeri fajokon vizsgálták (Anderson és Wall, 1978; Burkholder és Glasgow 1995). Nagyfokú rezisztenciát

mutatnak biológiai, kémiai és fizikai faktorokkal szemben is (Tsujino et al., 2002; Pati és Belmonte, 2003). Irodalmi adatatok alapján leginkább a vízvirágzás végén jelennek meg nagy számban (Dale, 1983).

A Chlorophyta-k körében a legismertebb cisztaképző fajok a *Haematococcus* nemzetségen belül találhatóak. Kitartóképleteikben piros színű astaxantint halmozhatnak fel, melyet a legerősebb természetes antioxidánsként tartanak számon (Guerin et al., 2003), előszeretettel alkalmazzák akvakultúrákban, a kozmetikai- és élelmiszeriparban (Guerin et al., 2003). Az astaxantin felhalmozódást valamilyen környezeti tényező a sejt számára kedvezőtlen tartományba történő megváltozása váltja ki (tápanyaglimitáció, Boussiba et al., 1999; fény, Saha et al., 2013; hőmérséklet, Yoo et al., 2012; kémhatás, Hata et al., 2001; sókoncentráció, Kobayashi et al., 1993). Ezeken kívül hatással lehetnek a sejt astaxantin felhalmozására különböző növényi hormonok és származékaik is (Yu et al., 2015).

A *Haematococcus pluvialis* életmenetében négy, különböző morfológiájú sejttípust lehet megkülönböztetni: makrozooidokat (zoospóra), mikrozooidokat, palmella állapotot és hematocisztákat (aplanospóra; 3. ábra; Hazen, 1899; Elliot, 1934). A makrozooid, mikrozooid és palmella állapotot leggyakrabban zöld vegetatív fázisnak nevezik, míg a hematociszta állapotot a szakirodalom általában nem motilis, vörös, astaxanthint felhalmozó, betokozódott fázisnak nevezi. A makrozooid sejtek gömb, ellipszoid esetleg körte alakúak, elülső végükön két egyenlő hosszúságú ostor helyezkedik el. A sejteket egy kocsonyás szerkezetű, extracelluláris mátrix burkolja. Kedvező körülmények mellett gyorsan szaporodó vegetatív sejtek, melyek nagy

számban fordulnak elő a korai, vegetatív növekedési fázisban. A környezeti feltételek kedvezőtlenné válásával azonban a sejtek mérete megnő, ostoraikat elveszítik. A sejtfal többrétegű, amorf szerkezetté alakul, létrejön a palmella állapot. Ha a környezeti stressz tartóssá vállik, a palmella ún. aszexuális aplanospórává alakul, melyeket körbevesz egy vastag, merev trilamináris burok illetve egy acetolízisnek ellenálló másodlagos sejtfal. Az így kialakult sejtek rezisztenssé válnak a szélsőséges környezeti tényezőkkel szemben (Santos és Mesquita, 1984; Boussiba és Vonshak, 1991; Shah et al., 2016). Az érett aplanospórák citoplazmájukban nagy mennyiségű másodlagos karotinoidot, köztük astaxanthint halmoznak fel, melyek a sejtek jellegzetes piros színét eredményezik (Hagen et al., 2002). A környezeti körülmények kedvezővé válásával az aplanosprórák csírázásnak indulnak, belőlük újra vegetatív sejtek lesznek.

a) b)  c)  d) 

3. ábra. A *Haematococcus pluvialis* zöldalga különböző sejttípusainak képei. a) zöld vegetatív mozgó sejt (ZV); b) zöld palmella (zöld "ciszta", ZC); c) astaxanthint felhalmozó palmella az aplanospórává alakulás során (zöld-piros "ciszta" ZPC); d) astaxantinnal telt, érett aplanospóra (piros ciszta, PC) . (Fotó: Bácsi István).

A fitoplankton fajok cisztaképzését sokan, sokféleképpen vizsgálták (Hazen, 1899; Elliot, 1934; Anderson és Wall, 1978; Dale, 1983; Santos és Mesquita, 1984; Boussiba és Vonshak, 1991; Kobayashi et al., 1993; Belmonte et al., 1995; Burkholder és Glasgow, 1995; Lampert, 1995; Hairtson et al., 1996; Rengefors et al., 1996; Rengefors és Anderson et al., 1998; Boussiba et al., 1999; Hata et al., 2001; Hagen et al., 2002; Tsujino et al., 2002; Pati és Belmonte, 2003; Kristiansen, 2008; Yoo et al., 2012; Saha et al., 2013; Blas et al., 2016; Shah et al., 2016). A rendelkezésre álló irodalom alapján azonban úgy tűnik, hogy – legalábbis ismereteink szerint – nincs arra vonatkozó releváns kutatás, hogy milyen hatással lehetnek a cianotoxinok, köztük a CYN, az eukarióta algák kitartóképlet-képzésére és a sejtek raktározott anyag – többek között színanyag – felhalmozására.

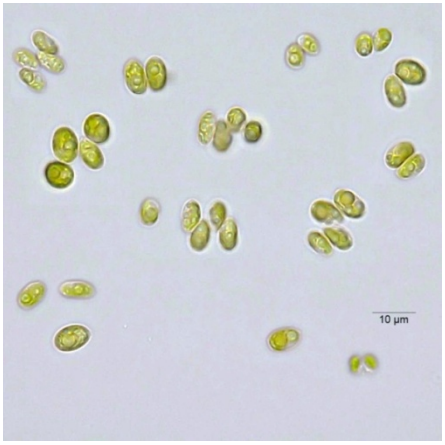
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Az alkalmazott taxonok bemutatása

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) algatörzsekkel végeztük. A cianobakteriális sejtkivonat elkészítéséhez CYN-termelő *Chrysosporum* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* törzset (Forti, Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp, Janecek) (ACCDH-UD1001; C+) és nem CYN-termelő *Aphanizomenon* sp. törzset (ACCDH-UD1304; C−) használtunk.

A *Scenedesmu*s genus tagjai leggyakrabban tápanyagban gazdag, sekély, különösen magas szervetlen N-tartalmú állóvizekben és vízfolyásokban fordulnak elő (John et al., 2002; Reynolds et al., 2002). Tág tűrőképességű, kozmopolita fajok, melyek leginkább csak a fény hiányára és a kiülepedésre érzékenyek. A *Scenedesmus obtusus* törzs (ACCDH-UD1310; 4. ábra) egy debreceni ékszerteknős teleltető medencéből került izolálásra. A faj a Chlorophyta törzs Chlorophyceae osztályába, azon belül a Sphaeropaeales rend Scenedesmaceae családjába tartozik (Guiry, 2019). Cönóbiumait 2, 4 vagy 8 sajátosan alternáló sejt alkotja, melyek csak egyharmad részükkel érintkeznek

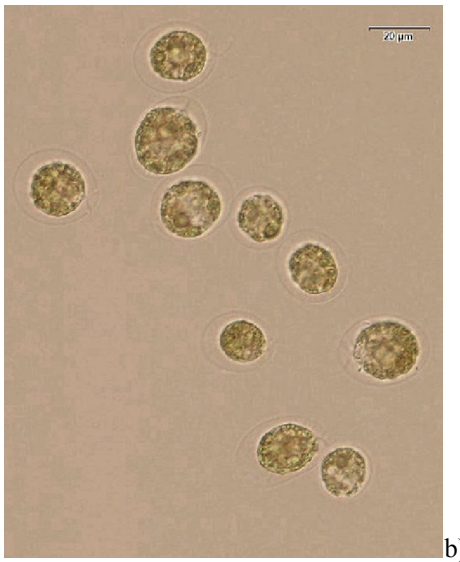
egymással. A sejtek 3-13 µm szélesek, 7-21 µm hosszúak, ritkán szabályosan ovális alakúak, de leggyakrabban ovális ellipszoid formákkal találkozhatunk. A sejteket nyálkás burok boríthatja, azonban az általunk használt izolátumra a nyálkaburok képzése nem volt jellemző.

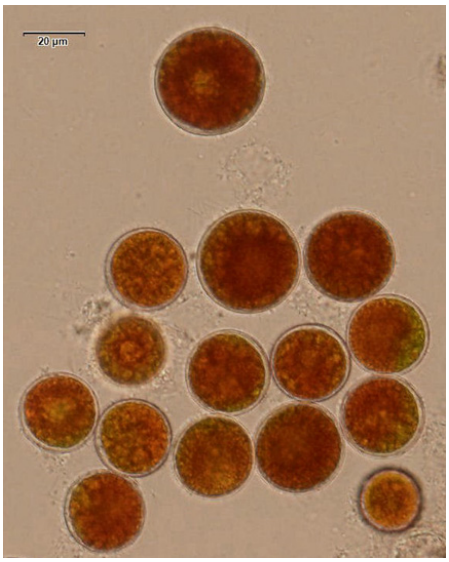


4. ábra. Scenedesmus obtusus zöldalga (Fotó: Bácsi István; N: 400×).

A *Haematococcus* nemzetség bizonyos fajai, köztük a *Haematococcus pluvialis* széles körben elterjedtek (kozmopoliták), a *H. pluvialis* megjelenése azonban szinte kivétel nélkül kis méretű, időszakos természetes vagy mesterséges víztestekre korlátozódik (Proctor, 1957; Guiry, 2019), ahol gyors növekedési rátával jellemezhető (Reynolds et al., 2002). A munkánk során alkalmazott törzs (ACCDH-UD1205; 5. ábra) Ebes településen egy öntözővíz tároló hordóból került izolálásra. A Chlorophyta törzs Chlorophyceae osztályába, azon belül a Chlamydomonadales rend Haematococcaceae családjába tartozik (Guiry, 2019). Egysejtű, a sejtek egymagvúak, két egyforma ostorral

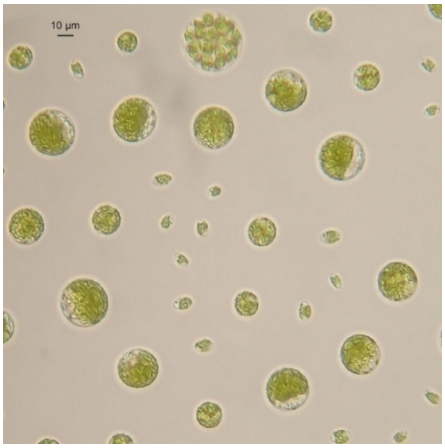
rendelkeznek, tojásdad vagy közel gömb alakúak (5a. ábra). Kloroplasztiszuk általában csésze alakú, benne 1-2 pirenoid található (Pocock, 1960; Ettl, 1983; Thompson és Wujek, 1989). Gyakorta nagyszámú kontraktilis vakuólum figyelhető meg a sejtekben. Leginkább az idősebb sejtekben jellemző a karotinoidok közé tartozó astaxanthin nagymértékű felhalmozódása. Ez a színanyag az aplanospórákban is jelen van, azokat pirosra színezi (5b. ábra). A *Haematococcus* nemzetségre jellemző az ivartalan szaporodás, mely során 4-8 zoospóra jön létre. Fény hiányában képesek heterotróf életmódra áttérni, szerves nitrogént, illetve acetátot hasznosítani (John et al., 2002).

a) 

b) 

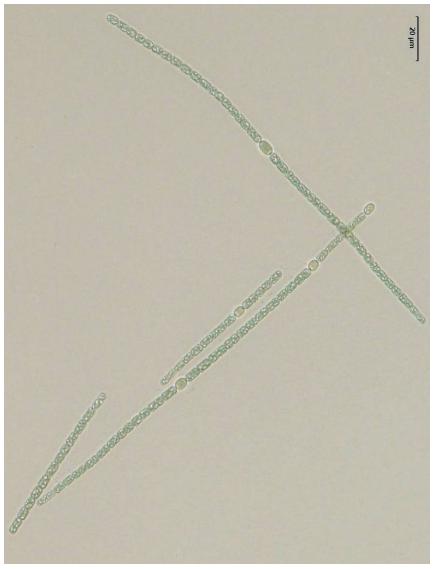
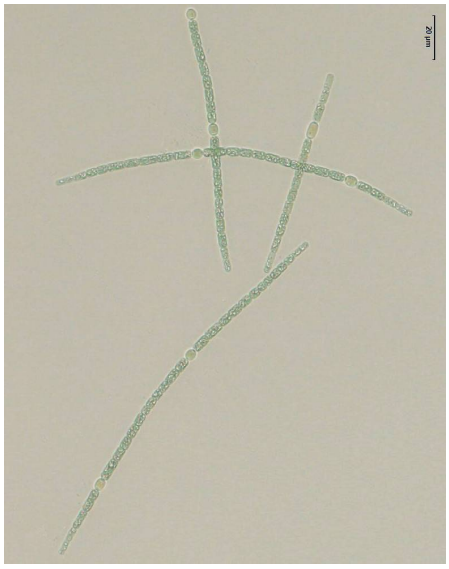
5. ábra. A *Haematococcus pluvialis* zöldalga vegetatív sejtjei (a) és astaxanthinnal telt cisztái (b). (Fotó: Bácsi István; N: 400×.)

A *Chlorococcum* nemzetség tagjai is kozmopoliták (John et al., 2002), kedvelik a sekély, tápanyagban gazdag vizeket (Reynolds et al., 2002), ugyanakkor kellő nedvességtartalom mellett szárazföldi környezetben is előfordulnak (Klochkova, 2006). A munkánk során alkalmazott törzs (ACCDH-UD1002; 6. ábra) Debrecenben a Békás-tó elnevezésű sekély városi dísztóból került izolálásra. A faj a Chlorophyta törzs Chlorophyceae osztályába, azon belül a Chlamydomonadales rend Chlorococcaceae családjába tartozik (Guiry, 2019). A sejtek gömbölyűek, ritkán lapítottak, átmérőjük 10-15 µm (Barta et al., 1976), bennük pirenoid testek találhatóak. A színtestek szintén gömbölyűek. Zoospóráik hosszúkásak, 6,5-12 × 2-3 µm méretűek. A zoospóráknak két egyforma ostorral rendelkeznek, melyek 6-12 µm hosszúak, az anyasejt többszörös osztódásával jönnek létre. A sejtek narancsszínű olajat is termelhetnek, ettől a sejtek olajzöldnek, vörösesnek vagy barnás színűnek látszódnak.



6. ábra. Chlorococcum sp. zöldalga (Fotó: Bácsi István; N: 400×.)

A CYN termelő *Chrysosporum* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* törzs (ACCDH-UD1001; C+; 7a. ábra) az Izraelben található Kinneret-tóból izolált törzsből (ILC-164) származik, a nem CYN termelő *Aphanizomenon* törzs (ACCDH-UD1304; C−; 7b. ábra) egy Debrecenben található, Csónakázó-tó elnevezésű sekély városi tóban bekövetkezett vízvirágzásból került izolálásra (a víztest napjainkra felszámolásra került).

a)  b) 

7. ábra. CYN-termelő (C+) *Chrysosporum* (*Aphanizomenon*) *ovalisporum* (a) és nem CYN-termelő (C−) *Aphanizomenon* sp.(b). (Fotó: Bácsi István; N: 400×.)

A korábban egységes *Aphanizomenon* nemzetség tagjai fotoszintetizáló fonalas cianobaktériumok, a Cyanobacteria törzsön belül a Nostocales rendbe, azon beül pedig az Aphanizomenonaceae családba

tartoznak (Guiry, 2019). A *Chrysosporum* nemzetség néhány éve került elkülönítésre az *Aphanizomenon* nemzetségtől elsősorban molekuláris biológiai tulajdonságok alapján (Zapomlová et al., 2012; Komárek et al., 2014). Fonalaik általában egyenesek, jellemzően magányosak. A fonal vegetatív sejtjei hosszúkásak, köztük a sejthatár jól kivehető. Heterocisztáik segítségével légköri nitrogén fixálására képesek. A heterociszták leginkább gömbölyűek, vagy elliptikusak, de mindig egyesével, a vegetatív sejtek közé ékelődve találkozhatunk velük, a fonál végén sohasem képződnek. A vegetatív sejtektől egyértelműen elkülöníthetők. Szaporító- és kitartó képleteik az akinéták, melyek gömb vagy ovális alakúak. A vegetatív sejtek között képződnek, általában egyesével, viszont nagyon ritkán egymás mellett két vagy akár több akinéta is képződhet (Zapomelová et al., 2012).

3.2. Nevelési körülmények

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

A *Haematococcus pluvailis* nevelése Optimised Haematococcus Medium-ban (OHM, Fabregas et al., 2000), 200 ml végtérfogatban, 14 óra megvilágítás (80 μmol foton m^{-2} s^{-1}), 10 óra sötét fotoperiódus alkalmazásával, 24°C-on, steril levegővel buborékoltatott 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 (indukált tenyészetek) tápoldatához nátrium-acetát és hidrogén-peroxid került hozzáadásra (45 illetve 0,01 mM végkoncentráció; Kobayashi et al., 1993).

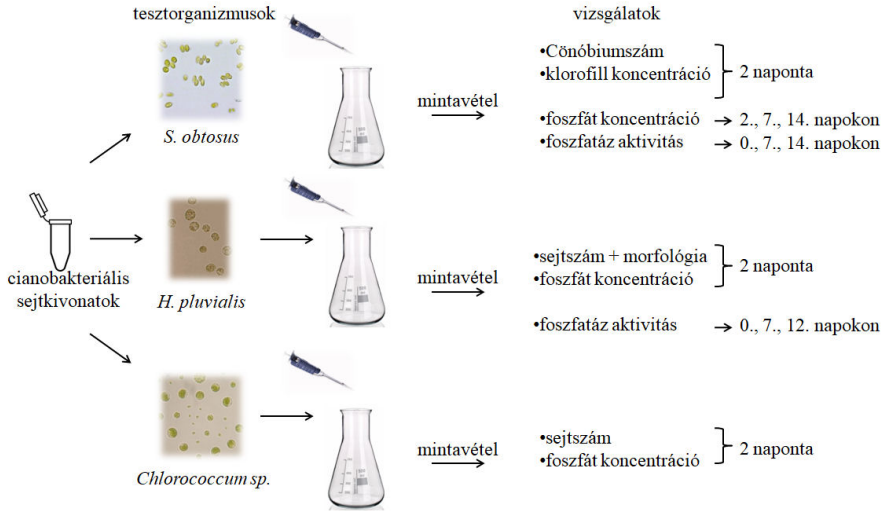
A *Chlorococcum* sp. nevelése Jaworski tápoldatban, 400 ml végtérfogatban, folyamatos megvilágítás mellett (80 μmol foton m^{-2} s^{-1}) 24°C-on, steril levegővel buborékoltatott tenyészetekben történt. A kísérletek időtartama 12 nap volt.

3.3. A cianobakteriális sejtkivonatok előállítása

A kivonatok elkészítéséhez 14 napos cianobaktérium (C+ és C−) tenyészeteket centrifugáltuk (6000 ×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

µm belső átmérő, 0,15 perc hidrodinamikus injektálás, 100 mbar, +25kV feszültség, 20 perc futtatási idő).

3.4. A kísérletek kivitelezése

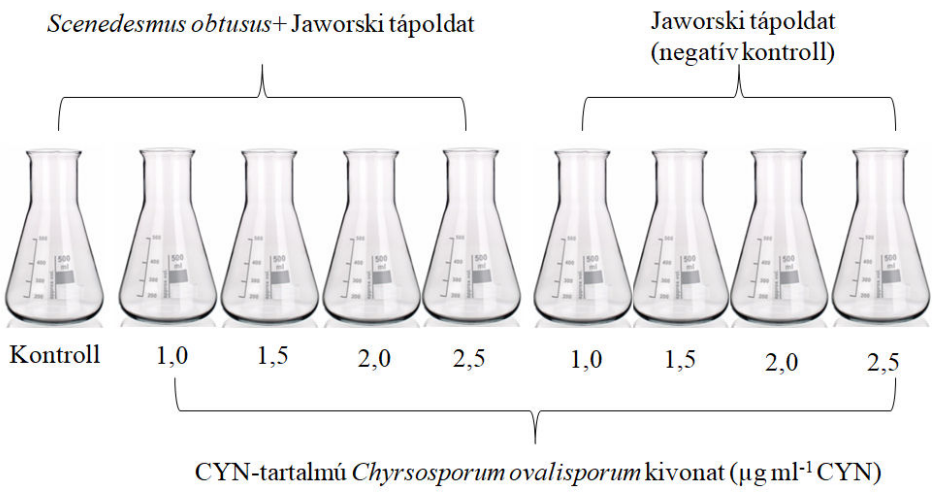


8. ábra. Az egyes kísérlettípusok áttekintése.

3.4.1. Különböző cianobakteriális sejtkivonatok *Scenedesmus obtusus* zöldalgára gyakorolt hatásainak vizsgálata

Vizsgálataink során *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 µg ml^{-1} legyen (9. ábra). A toxinmentes kezelések előállításához a *S. obtusus* tenyészetekhez a toxin tartalmú kezelések során felhasznált cianobakteriális sejtkivonattal ekvialens mennyiségű C− sejtkivonatot adtunk, az ekvivalens mennyiség meghatározása a CYN-tartalmú kivonatra jellemző cianobaktérium sejtszámot alapul véve történt.



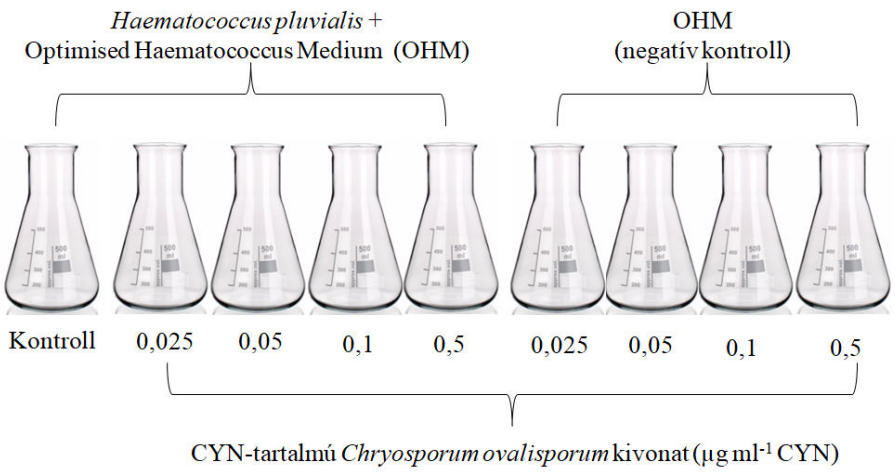
9. ábra. A CYN-tartalmú ciankbakteriális sejtkivonattal való kezelés (C+) összeállítása. Nem toxin tartalmú sejtkivonatok (C−) esetén a CYN-tartalmú kivonattal ekvialens mennyiségű kivonat került hozzáadásra a tenyészetekhez. A kiegészített kezelésekben a C− sejtkivonat mellett tisztított CYN került hozzáadásra, a végső toxin koncentráció megegyezett a CYN-tartalmú kivonattal történő kezelések során beállított toxinkoncentrációkkal (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 µg ml^{-1}).

Az adott kezeléseknek megfelelő ún. negatív kontroll tenyészetek is összeállításra kerültek. A negatív kontroll tenyészetek zöldalgát nem, csak a cianobakteriális sejtkivonatot tartalmazták (9. ábra). A negatív kontroll tenyészetek az egyes kezelésekben mért értékek korrekciójául szolgáltak. Ezek mellett a foszfatáz enzimek indukciójának tesztelésére beállításra kerültek foszfát éheztetett tenyészetek is (ld. 3.2. fejezet).

A kísérletek minden második napján történt mintavétel cönóbiumszám meghatározáshoz (10 µl, 400× nagyítás, Olympus BX50F-3 mikroszkóp), valamint további 1 ml mintát centrifugáltunk, (16200 ×g, 5 perc, Heraeus Fresco 17) A különválasztott felülúszót a foszfátfelvétel meghatározására (ld. 3.6. fejezet), az alga-biomasszát a klorofill koncentráció mérésére (ld. 3.5. fejezet) használtuk fel. A kísérletek 0., 7. és 14. napján további 4 × 400 µl mintát vettünk savas és alkalikus foszfatáz mérésekhez (ld. 3.7. fejezet).

3.4.2. A CYN tartalmú cianobakteriális sejkivonatok *Haematococcus pluvialis* zöldalgára 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 µg 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 (10. ábra).



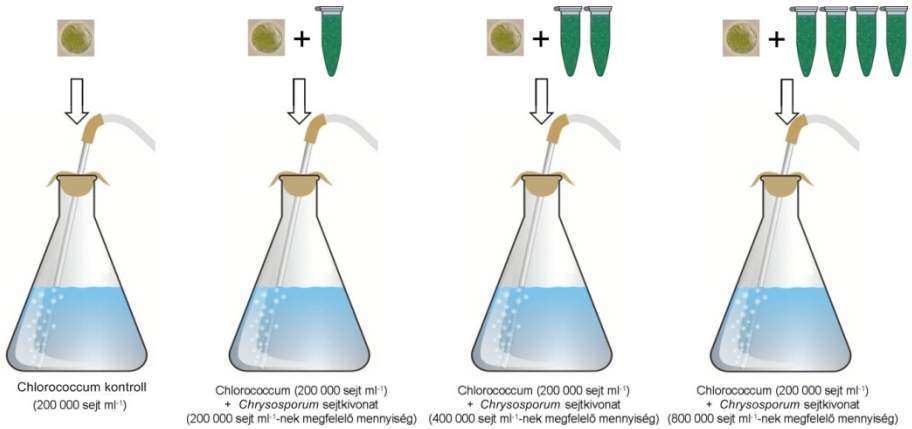
10. ábra. A *Haematococcus pluvialis* zöldalga tenyészetek kezelése CYN-tartalmú ciankbakteriális sejtkivonattal.

Ezeken kívül beállításra kerültek indukált (a cisztaképzés serkentéséhez speciális tápoldatba oltott) és foszfát éheztetett tenyészetek is (ld. 3.2. fejezet). 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 (ld. 3.5. fejezet) -20°C-on tároltuk. Ezen kívül a

kísérletek 0., 7. és 14. napján további 4 × 400 µl mintát vettünk savas és alkalikus foszfatáz aktivitás mérésekhez (ld. 3.7. fejezet).

3.4.3. CYN tartalmú cianobakteriális sejtkivonatok *Chlorococcum* sp. zöldalgára kifejtett hatásainak vizsgálata

A *Chlorococcum* sp. tenyészetekhez a zöldalga sejtszámmal azonos (1:1), valamint kétszeres (1:2) és négyszeres (1:4) *Chrysosporum ovalisporum* sejtszámnak megfelelő mennyiségű teljes és centrifugált cianobakteriális sejtkivonatot adtunk (11. ábra). Az összeállított 1:1 kezelésben 0,04 µg ml^{-1}, az 1:2-ben 0,09 µg ml^{-1}, az 1:4 kezelésben pedig 0,17 µg ml^{-1} 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).



11. ábra. A *Chlorococcum* sp. zöldalga tenyészetek kezelése CYN-tartalmú ciankbakteriális sejtkivonattal.

3.5. 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 µg ml^{-1}-ben adtuk meg.

3.6. A foszfát koncentráció meghatározásának menete

A foszfát koncentráció meghatározásához az egyes kezelések 200 µl 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 foszfátionok koncentrációjával.

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

3.7. A foszfatáz enzimek aktivitásának mérése

Előzetes vizsgálataink alapján a *Scenedesmus obtusus* foszfatáz enzimei pH5 és pH9, a *Haematococcus pluvialis* foszfatáz enzimei 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 µl-éhez 500 µl megfelelő kémhatású puffert adtunk (pH5/pH9/pH11). Az elegyeket 400 µl para-nitro-fenil-foszfát 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 µl „stop oldat”-tal állítottunk le. A „stop oldat” 0,2 M Na_2HPO_4-ot tartalmazott 1 M NaOH-ban feloldva. Az elegyeket centrifugáltuk (1000 × 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, µmol pNP 10^6 cönóbium $^{-1}$ óra $^{-1}$ egységben, a *H. pluvialis* esetében sejtszámra vonatkoztatva, µmol pNP 10^5 sejt^{-1} óra^{-1} egységben adtuk meg.

3.8. 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 foszfatáz aktivitásban, klorofill koncentrációban, az *S. obtusus* tenyészetek 14. napi cönóbiumszámában, és a *H. pluvialis* sejttípusainak arányaiban bekövetkezett változásokat egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztük. A statisztikai értékeléshez a PAST (Hammer etl., 2001) és SigmaPlot programokat használtuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A különböző cianobakteriális kivonatok hatása a *Scenedesmus obtusus* zöldalgára

4.1.1. A *S. obtusus* tenyészetek növekedésében bekövetkezett változások

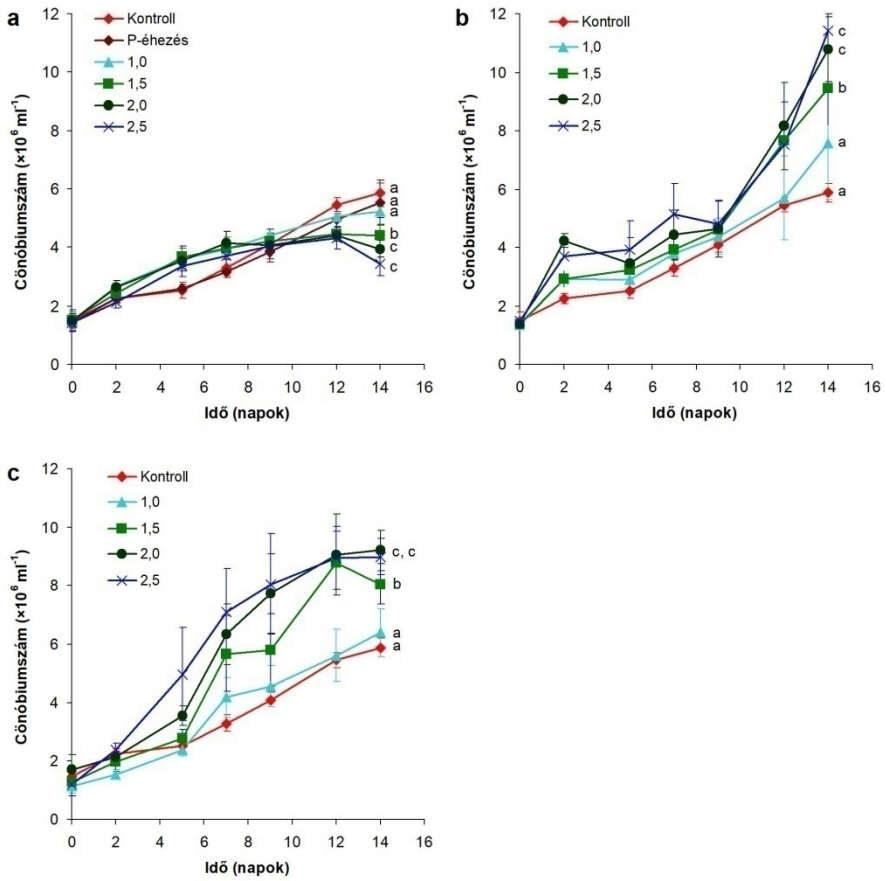
Cönóbiumszám

A **cilindrospermopszin tartalmú cianobakteriális kivonattal** történő kezelések (C+) esetén a kontroll és az egyes kezelések (1.,0; 1,5; 2,0; 2,5 C+) növekedésének tendenciáiban lévő különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. A tenyészidő 2. és 10. napja között a cönóbiumszámoki nagyobbak voltak a kezelt tenyészetekben, mint a kontroll tenyészetben, a 10. naptól azonban egyre inkább megnyilvánuló növekedésgátlás vált megfigyelhetővé, mely gátlás mértéke annál nagyobb volt, minél nagyobb mennyiségben volt jelen a kivonat a rendszerben. A növekedés tendenciái - ahogyan azt fentebb említettük - ugyan nem különböztek szignifikánsan, az 1,5 C+, 2,0 C+ és 2,5 C+ kezelések 14. napi cönóbiumszám értékei azonban szignifikánsan (p<0,05) kisebbek voltak (p<0,05), mint a kontroll tenyészet cönóbiumszáma (12a. ábra). A legnagyobb növekedésgátlás (42%) a 2,5 C+ kezelésben volt kimutatható (12a. ábra).

A **foszfát-éhezés** hatására a *S. obtusus* cönóbiumszámának növekedésében a kontroll tenyészethez képest nem történt szignifikáns gátlás (12a. ábra). A foszfát-éheztetett tenyészetek cönóbiumszáma csupán 6%-al volt alacsonyabb a kontroll tenyészet cönóbiumszámánál.

Összevetve eredményeinket a rendelkezésünkre álló irodalmi adatokkal (Campos et al., 2013; Pinheiro et al., 2013), illetve a vizsgálataink során alkalmazott másik két algafaj (*H. pluvialis*; 4.2. fejezet, *Chlorococcum* sp.; 4.3. fejezet) esetében tapasztalt változásokkal, továbbá figyelembe véve azt, hogy a *S. obtusus* izolátumnál alkalmazott toxin koncentrációk (1,0 - 2,5 μg ml^{-1}) relatíve magasnak számítanak, elmondható, hogy az általunk vizsgált *S. obtusus* izolátum sem a CYN viszonylag magas koncentrációjára, sem pedig a foszfát hiányra nem érzékeny az alkalmazott két hét expozíciós időn belül.

Nem cilindrospermopszin tartalmú kivonattal történő kezeléseink (C−) esetében növekedésgátlás semelyik tenyészet esetében nem volt kimutatható. Mind az egyes kezelések cönóbiumszám növekedésének tendenciáját, mind pedig a 14. napi cönóbiumszámot tekintve elmondható, hogy, az 1,5; 2,0 és 2.,5 C− kezelésekben a *S. obtusus* cönóbiumszáma szignifikánsan nagyobb volt (p<0,05), mint a kontroll tenyészeté (12b. ábra), vagyis a C− kivonat serkentette a *S. obtusus* cönóbiumszám növekedését. A 14. napon, a kísérleti idő végére az 1,0 C− kezelés cönóbiumszáma 29%-kal, az 1,5 C− kezelés cönóbiumszáma 61%-kal, a 2,0 C− kezelésé 83%-kal, míg a 2,5 C− kezelés cönóbiumszáma 95%-kal volt magasabb a 14. napon a kontroll tenyészet cönóbiumszámához képest.



12. ábra. Változások a *Scenedesmus obtusus* cönóbiumszámaiban az egyes kezelések hatására: a) CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C+), b) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C−), c) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat kiegészítve CYN-nel (C−+C). A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. 1; 1,5; 2 és 2,5: a toxin koncentrációja a C+ és C−+C kezelésekben. Az egyes kezelések 14. napi cönóbiumszám értékei közötti szignifikáns különbséget (p<0,05) a kisbetűk (a-c) jelölik.

A **kiegészített kezelések** (C−+C) esetében sem volt megfigyelhető növekedésgátlás, hasonlóan a C− kezelésekhez, Az 1,5; 2,0 és 2,5 C−+C kezelések esetében a cönóbiumszám változások tendenciája szignifikánsan eltért a kontrollétól, a 14. napra vonatkozott cönóbiumszámok szignifikánsan nagyobbak voltak (p<0,05), mint kontroll tenyészet cönóbiumszáma (12c. ábra). A kísérletek 14. napjára a cönóbiumszám az 1,0 C−+C kezelésben 10%-kal, az 1,5 C−+C kezelésben 37%-kal, a 2,0 C−+C kezelésben 57%-kal, a 2,5 C-+C kezelésben 53%-kal volt nagyobb, mint a kontroll tenyészetben.

Összehasonlítva a C+, C− és C−+C kezeléseket, elmondható, hogy a C− és C−+C kezelések során a cönóbiumszámok szignifikánsan magasabbak voltak (p<0,05), mint a C+ kezelésekben. Az expozíció utolsó napján a C− és C−+C kezelések között nem volt szignifikáns különbség a cönőbiumszámokban. A tapasztalt növekedés-serkentés hátterében feltehetőleg a kivonattal bevitt egyéb metabolitok, tápanyagok, hormonhatású vegyületek állhatnak, melyek bizonyos ideig fokozták az *S. obtusus* növekedését, illetve kompenzálták a toxin negatív hatását a C+ kezelésekben. Hangsúlyozandó azonban, hogy a tisztított CYN-nal kiegészített kivonatok (C−+C) nem idéztek elő olyan mértékű serkentést a növekedésben, mint a CYN-t nem tartalmazó kivonatok (C−), hiszen amíg a 2,5 C− kezelésben a cönóbiumszám 95%-kal volt nagyobb a tenyészidő 14. napján, mint a kontroll tenyészet cönóbiumszáma, addig a 2,5 C−+C kezelésben ez az érték csak 53% volt. A C− kezelésekben a növekedés-gátlás hiánya megerősíti, hogy a C+ kezelések során tapasztalt növekedés-gátlásban a CYN-nak egyértelműen szerepe van. Ugyanakkor a C−+C kezelésekben a

növekedés-gátlás hiánya alapján feltételezhető, hogy a CYN-t termelő cianobaktérium extracelluláris mátrixában jelen vannak egyéb olyan metabolitok is, melyek szinergista módon fokozzák a toxin hatását, és amelyek a CYN-t nem termelő izolátumból hiányoznak.

Jelen eredmények tárgyalásánál mindenképpen hangsúlyozni kell, hogy az egyes izolátumok eltérően reagálhatnak különböző CYN koncentrációjú cianobakteriális kivonattal, illetve tisztított CYN-nal történő kezelésekre. A toxin alacsonyabb koncentrációkban fokozhatja a tenyészet növekedését (Campos et al., 2013; Pinherio et al., 2013). *Chlorella vulgaris* esetében 0,005–0,179 μg ml^{-1} koncentrációjú tisztított CYN serkentette az alga sejtszámnövekedését. Nagyobb (0,032 - 0,333 μg ml^{-1}) CYN koncentrációjú cianobakteriális kivonat azonban növekedésgátlást okozott a *C. vulgaris* tenyészetekben (Campos et al., 2003). Pinheiro és munkatársai (2013) 2,5 μg ml^{-1} CYN koncentrációjú cianobakteriális kivonat mellett az expozíció 4. napján több, mint 50%-os növekedésgátlást mutatottak ki *Chlamydomonas reinhardtii* és *Nannochloropsis* sp. törzsek esetében.

A fentebb bemutatott eredmények, valamint a vizsgálataink során alkalmazott másik két algafaj (*H. pluvialis*; 4.2. fejezet, *Chlorococcum* sp.; 4.3. fejezet) esetében tapasztalt változások, és a rendelkezésre álló csekély számú szakirodalmi adat ismeretében kijelenthető, hogy a munkacsoportunk által vizsgált *S. obtusus* izolátum nem érzékeny a toxin viszonylag magas koncentrációjára. A két hétig foszfát-éheztetett tenyészetek cönóbiumszámában tapasztalt változások pedig arra mutatnak rá, hogy a *S. obtusus* a foszfát hiányra sem érzékeny. Ez nagy

valószínűséggel a zöldalga sejtjeiben megtalálható polifoszfát testek jelenlétével magyarázható (Moudřiková et al. 2017).

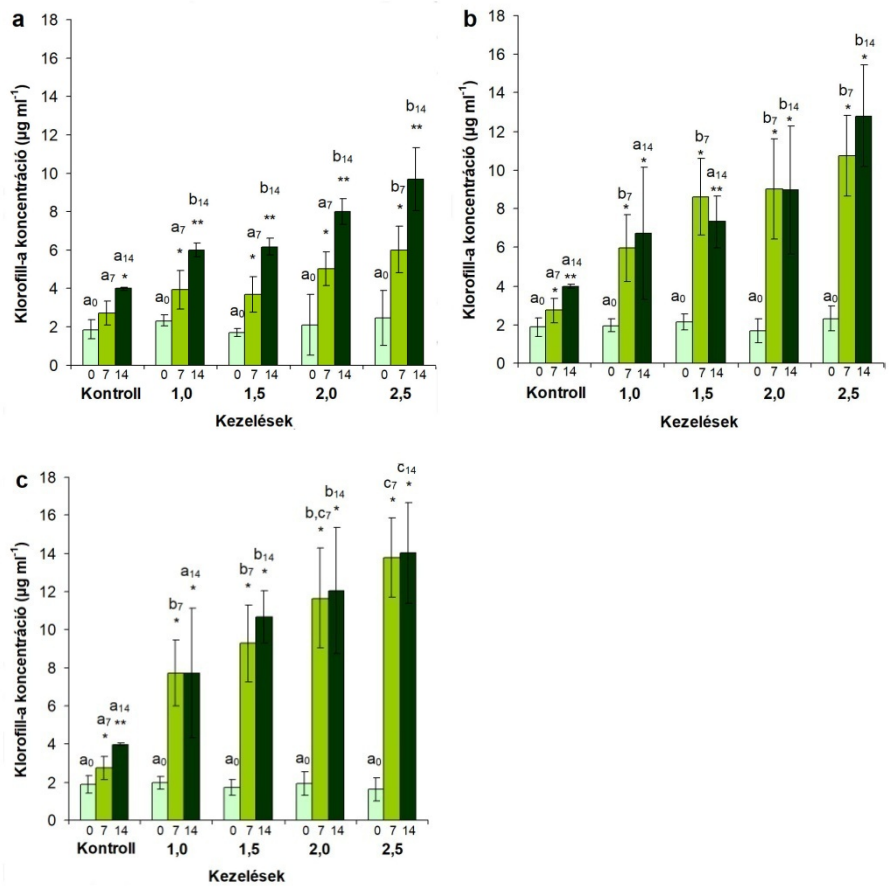
Klorofill-koncentráció

A klorofill-koncentráció eltérő képet mutat a tenyészetek növekedéséről, mint a cönóbiumszám: klorofill-tartalom alapján növekedés-gátlás egyik kezelés esetében sem volt kimutatható.

A C+ kezelések esetében a kísérletek 7. napján a 2,5 C+ kezelés során mért klorofill tartalom szignifikánsan magasabb volt (p<0,05) a kontroll tenyészetben mérhetőhöz képest (13a. ábra). A 14. napon minden kezelés esetében szignifikánsan magasabbak voltak (p<0,05) a klorofill koncentrációk, mint a kontroll tenyészet 14. napján mért érték (13a. ábra).

A C− kezelések esetében az egyes kezelések klorofill koncentrációi már az expozíció 7. napján is szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontroll *S. obtusus* tenyészet mért klorofill koncentráció (13b. ábra). A 14. napon a 2,0 és 2,5 C− kezelések klorofill koncentrációi voltak szignifikánsan magasabbak (p<0,05), mint a kontroll tenyészetben (13b. ábra).

A kiegészítéses kísérletek (C−+C) esetében az 1,0 C−+C tenyészet 14. napi klorofill koncentrációi kivételével minden kezelésben a 7. és a 14. napon mért klorofill értékek szignifikánsan magasabbak voltak (p<0,05), mint ugyanazon napokon a kontroll tenyészetben mért értékek (13c. ábra).



13. ábra. Változások a *S. obtusus* klorofill koncentrációjában az egyes kezelések hatására a 0., 7. és 14. napokon: a) CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C+), b) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C−), c) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat kiegészítve CYN-nel (C−+C). A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget (p<0,05) a kezelések között kisbetűk (a-c), a napok között csillag (*) jelöli.

Adott kezelésben az egyes időpontokban mért klorofill-a értékeket összevetve látható, hogy mindhárom kísérlettípus esetén már a 7. napi klorofill koncentrációk is szignifikánsan magasabbak voltak (p<0,05) az

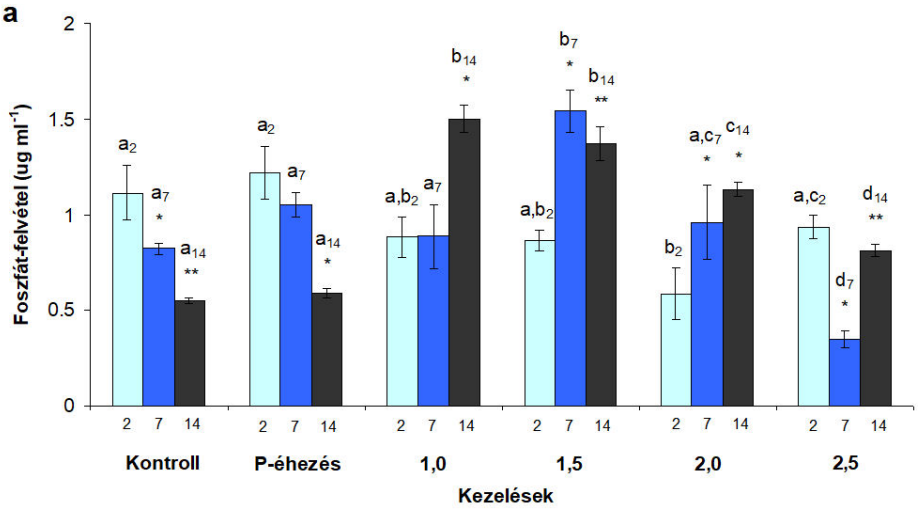
adott tenyészetben mért 0. napi koncentrációktól, ugyanakkor csak a C+ kezelések esetében volt szignifikáns különbség a 7. és 14. napon mért értékek között, a másik két kezeléstípus esetén nem (13. ábra).

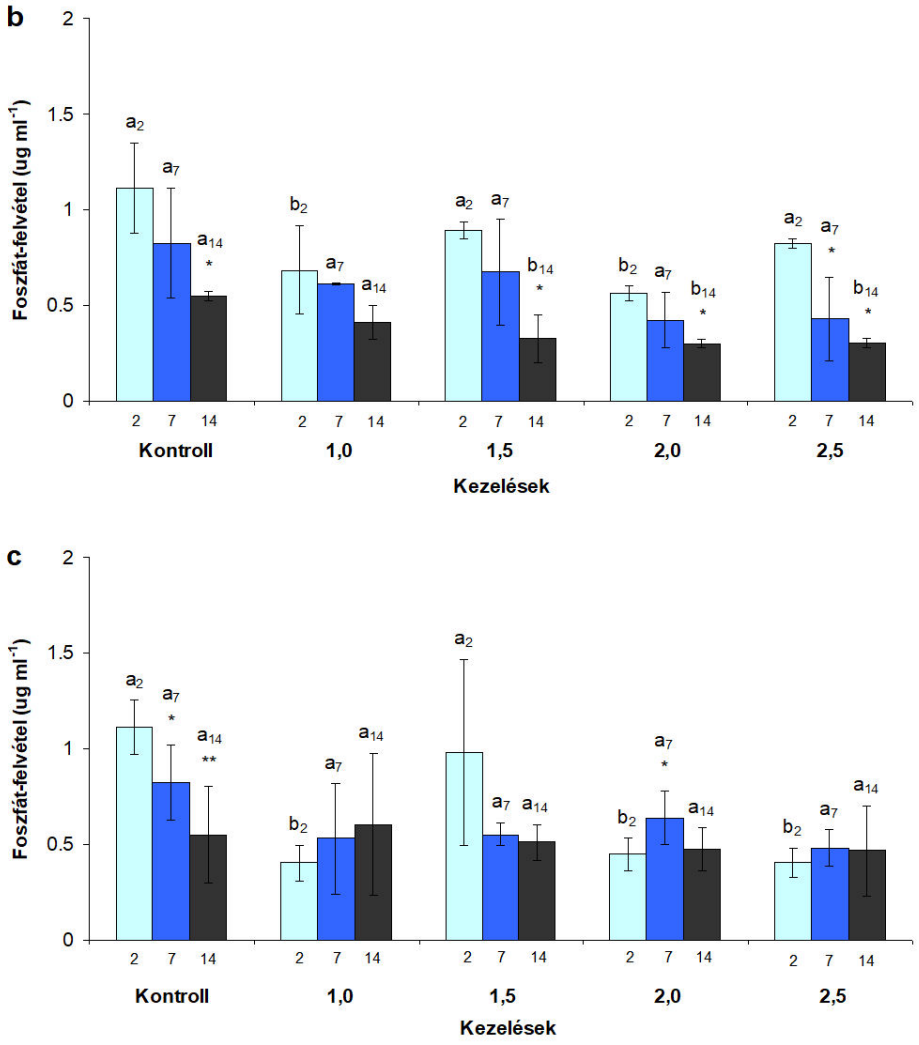
A különböző kezeléseket összevetve elmondható, hogy a nevelési idő 7. napján minden C− és C−+C kezelés klorofill-tartalma szignifikánsan magasabb volt (p<0,05), mint a C+ kezelésekben mért értékek. A 14. napon csak a 1,5 C−+C kezelés klorofill-tartalma volt szignifikánsan magasabb (p<0,05) mint az 1,5 C+ kezelésben mérhető klorofill-koncentráció.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy minden típusú kezelés esetében a felhasználásra került cianobakteriális kivonat mennyiségének növekedésével nőtt a sejtek klorofill-tartalma, ezek a változások függetlenek voltak a kivonat toxin tartalmától. A változások hátterében nagy valószínűséggel a hozzáadásra került kivonat erős kék színe által előidézett árnyékoló hatás áll, aminek következtében a *S. obtusus* sejteket érő sugárzás mennyisége csökken, illetve megváltozik a sugárzás hullámhossza. A megváltozott mikrokörnyezeti körülmények kompenzálására fokozódhat az algasejtek klorofill-termelése, ahogy ezt más kutatók is tapasztalták (Bonente et al., 2012; He et al., 2015; Ferreira et al., 2016). Az a tény, hogy a *S. obtusus* klorofill-termelése nem gátlódott CYN jelenlétében, szintén az izolátum CYN-nal szembeni alacsony érzékenységét támasztja alá.

4.1.2. A *S. obtusus* tenyészetek foszfát felvételében bekövetkezett változások

A nevelési idő előrehaladtával mind a kontroll, mind pedig a foszfát-éheztetett tenyészetek egységnyi cönóbiumszámra számolt foszfát-felvétele csökkenő tendenciát mutatott (14. ábra). Azonban amíg a C+ kezelések esetében az expozíciós idő előrehaladtával fokozódott a sejtek foszfát-felvétele (14a. ábra), ez a tendencia sem a C− kivonattal kezelt tenyészetek esetében (14b. ábra), sem pedig a C−+C kisérletsorozat esetében nem volt megfigyelhető (14c. ábra).





14. ábra. Változások a *S. obtusus* foszfát-felvételében az egyes kezelések hatására a 0., 7. és 14 napokon: a) CYN-termelő *Aphanizomenon* nyers kivonat (C+), b) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C−), c) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* nyers kivonat kiegészítve CYN-nel (C−+C). A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget ($p<0,05$) a kezelések között kisbetűk (a-d), a napok között csillag (*) jelöli.

Az egyes kísérlettípusokban tapasztalt eredmények azt mutatják, hogy amíg a C+ kezelésekben az egységnyi cönóbiumszámra vonatkoztatott foszfát felvétele szignifikánsan megnőtt (p<0,005), addig a C− és a C−+C kezelésekben ez a hatás nem volt megfigyelhető (14. ábra). A C− kezelt tenyészetekben és a C−+C kezelésekben a foszfát felvétel mértéke annak ellenére is csökkent, hogy az érintett tenyészetekben a cönóbiumszám növekedése szignifikánsan nagyobb volt (12. ábra).

Figyelembe véve a foszfát-felvételben bekövetkezett változásokat (14. ábra) és azt, hogy a C+ kezelések cönóbiumszámai a 9. naptól csökkenésnek indultak (12a. ábra), elmondható, hogy a *S. obtusus* foszfát felvétele a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonattal történő kezelés hatására fokozódott (14a. ábra). Vagyis a CYN hatással van az általunk tanulmányozott *S. obtusus* foszfát felvételére, azonban hangsúlyozandó, hogy ezen hatás csak akkor érvényesül, ha a toxin a termelő sejt extracelluláris mátrixával együtt van jelen. Ezen feltételezésre mutat rá az, hogy amíg a C+ kezelések esetében a csökkenő cönóbiumszám (12. ábra) ellenére is szignifikánsan fokozódott (p<0,05) a tenyészetek egységnyi cönóbiumszámrara vonatkozott foszfát felvételének mértéke (14. ábra), addig a C−+C kezelésekben, a tisztított CYN jelenléte ellenére is csökkent a tenyészetek foszfát felvételének mértéke (14. ábra), még annak ellenére is, hogy a cönóbiumszám a kivonat mennyiségének növekedésével szignifikánsan (p<0,05) növekedett (12. ábra).

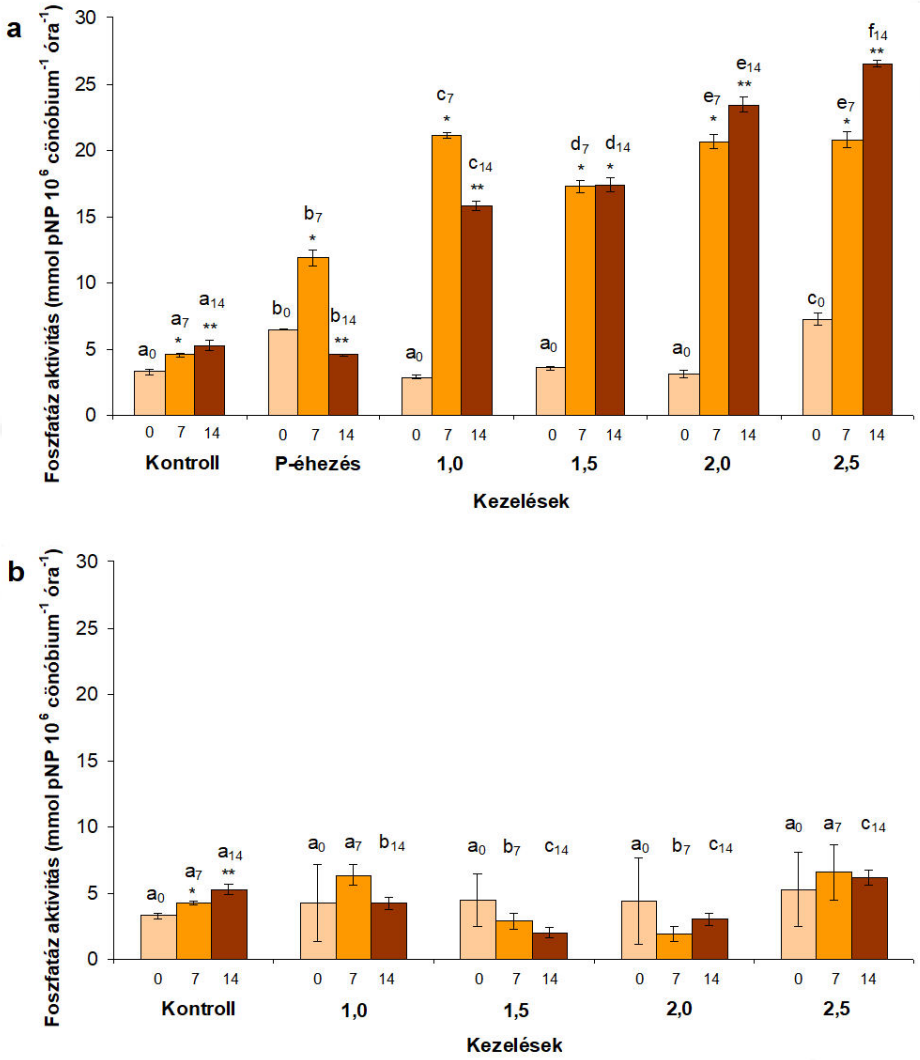
4.1.3. Változások a *S. obtusus* foszfatáz aktivitásában

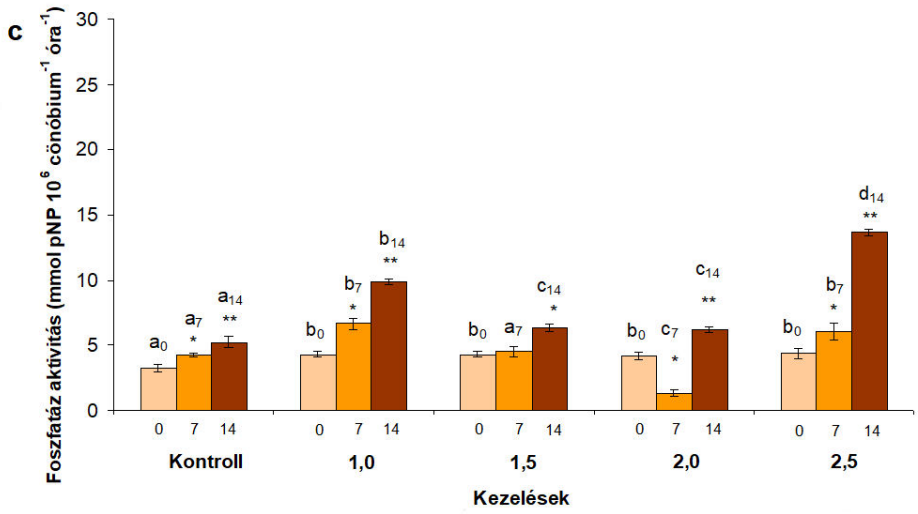
4.1.2.1. Savas foszfatáz aktivitás

A savas foszfatáz aktivitás kontroll körülmények között, a foszfát éheztetés során és a C+ kezelések esetében is folyamatosan növekedett (14a. ábra). A CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatokkal kezelt *S. obtusus* tenyészetek enzimaktivitása annál magasabb volt, minél nagyobb mennyiségben került hozzáadásra a kivonat. A 7. és 14. napokon mért savas foszfatáz aktivitás minden C+ kezelés esetében szignifikánsan magasabb volt (p<0,005), mint a 0. napon mért (15a. ábra). Külön hangsúlyozandó, hogy a 7. és 14. napokon mért savas foszfatáz aktivitás minden esetben szignifikánsan magasabb volt (p<0,005), mint a kontroll tenyészetben mért aktivitási értékek.

A C− kezelések esetében a nevelési idő előrehaladtával nem változott szigínifikánsan a savas foszfatáz aktivitás (15b. ábra). Az 1,0, 1,5 és 2,0 C− kezelések enzimaktivitásai a 7. és 14. napokon szignifikánsan alacsonyabbak voltak (p<0,05), mint a kontroll tenyészetben számított értékek. (15b. ábra).

A C−+C kezelések esetében, hasonlóan a C+ kezelésekhez, mind az idő előrehaladtával, mind pedig a hozzáadott toxin mennyiségének növekedésével fokozódott a tenyészetek savas foszfatáz aktivitása (15c. ábra). Az egyes kezelések aktivitás-értékei a kontroll tenyészetben mért enzimaktivitásoktól szignifikánsan magasabbak voltak *(*p<0,05; 15. ábra).


a
Foszfatáz aktivitás (mmol pNP 10^6 cönóbium^{-1} óra^{-1})
30
25
20
15
10
5
0
a_0 a_7 * a_{14} **
b_0 b_7 * b_{14} **
a_0 c_7 * c_{14} **
a_0 d_7 * d_{14} *
a_0 e_7 * e_{14} **
c_0 e_7 * f_{14} **
0 7 14
Kontroll
P-éhezés
1,0
1,5
2,0
2,5
Kezelések
b
Foszfatáz aktivitás (mmol pNP 10^6 cönóbium^{-1} óra^{-1})
30
25
20
15
10
5
0
a_0 a_7 * a_{14} **
a_0 a_7 b_{14}
a_0 b_7 c_{14}
a_0 b_7 c_{14}
a_0 a_7 c_{14}
0 7 14
Kontroll
1,0
1,5
2,0
2,5
Kezelések



15. ábra. Változások a *S. obtusus* savas foszfatáz aktivitásában (pH5) az egyes kezelések hatására a 0., 7. és 14. napokon: a) CYN-termelő *Aphanizomenon* nyers kivonat (C+), b) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C−), c) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* nyers kivonattal kiegészítve CYN-nel (C−+C). A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget (p<0,05) a kezelések között kisbetűk (a-f), a napok között csillag (*) jelöli.

Összehasonlítva a C+, C− és C−+C kísérletek során az ugyanazon napokon mért savas foszfatáz aktivitást megállapítható, hogy a 7. és 14. napokon a C+ kezelések aktivitási értékei szignifikánsan magasabbak voltak (p<0,005) a C− és C−+C kezelések 7. és 14. napokon mért aktivitásainál. A C−+C tenyészetek esetében a 14. napon sikerült a C− kezelésekben mért aktivitási értékektől szignifikánsan magasabb (p<0,05) enzimaktivitást kimutatni.

A savas foszfatáz enzim egy elsősorban intracelluláris fehérje, melynek elsődleges szerepre a sejtek belső polifoszfát raktárainak a mobilizációja (Bowen és Bryant, 1978; DuBois et al., 1984).

A foszfát éheztetett tenyészetekben tapasztalt savas foszfatáz aktivitás folyamatos, növekedő tendenciája, valamint az egyes mintavételi napokon (0., 7., 14.) mért enzimaktivitások közötti szignifikáns különbség magyarázata lehet, hogy az elegendő hozzáférhető foszfor hiányában a sejtek elkezdték saját, belső polifoszfát raktáraik hasznosítását, mely magasabb savas foszfatáz aktivitást eredményezett (Bowen és Bryant, 1978; DuBois et al., 1984; Moudřiková et al. 2017).

A C+ tenyészetek folyamatosan növekvő savas foszfatáz aktivitásának egyik lehetséges magyarázata a sejteket érő fokozódó környezeti stressz. Irodalmi adatok savas foszfatáz aktivitás emelkedésről számolnak be, ha a sejteket valamiféle külső stresszhatás éri. DuBois és munkatársai (1984) *Nostoc* sp. cianobaktérium esetén sötét periódus által kiváltott, Kruskopf és Du Plessis (2004) alacsony nitrogén és foszfát koncentrációk vagy limitáció esetén fokozódott savas foszfatáz aktivitásról számoltak be. Kísérleteinkben az algasejtek számára stresszt jelenthet a cianobakteriális kivonat árnyékoló hatása, illetve különböző, a kivonattal bevitt szerves molekulák jelenléte. A CYN jelenlétében (C+, C−+C) a tenyészetek foszfát felvételében és savas foszfatáz aktivitásában bekövetkezett változások alapján kizárható a lehetősége annak, hogy a cianobakteriális sejtkivonat kémiai összetétele korlátozná a foszfor biológiai hozzáférhetőségét. Továbbá a foszfát felvételre irányuló méréseink alapján az is kizárható, hogy a

megnövekedett savas foszfatáz aktivitás mögött a toxin *S. obtusus* sejtek foszfát transzportereire gyakorolt gátló hatása áll. Annak ellenére, hogy a C−+C tenyészetekben mért aktivitási értékek szignifikánsan alacsonyabbak a C+ tenyészetekben mért aktivitási értékekeknél, a C−+C kezelések enzimaktivitás növekedésének trendje hasonló a C+ tenyészetekben kimutatott tendenciához. Továbbá a C−+C tenyészetekben az enzimaktivitás a 14. napon szignifikánsan magasabb volt, mint a C− tenyészetekben. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a CYN szerepet játszik a *S. obtusus* tenyészetekben tapasztalt savas foszfatáz aktivitás megemelkedésében. Azonban tudomásunk szerint nincs arra vonatkozó irodalmi adat, miért és hogyan indukálja a CYN a savas foszfatáz aktivitást. Egyes feltevések szerint a megnövekedett savas foszfatáz aktivitás kapcsolatban állhat a CYN által kiváltott szignáltranszdukciós folyamatokkal (Freitas et al., 2015), de ezen jelenség pontos magyarázata további kutatásokat igényel.

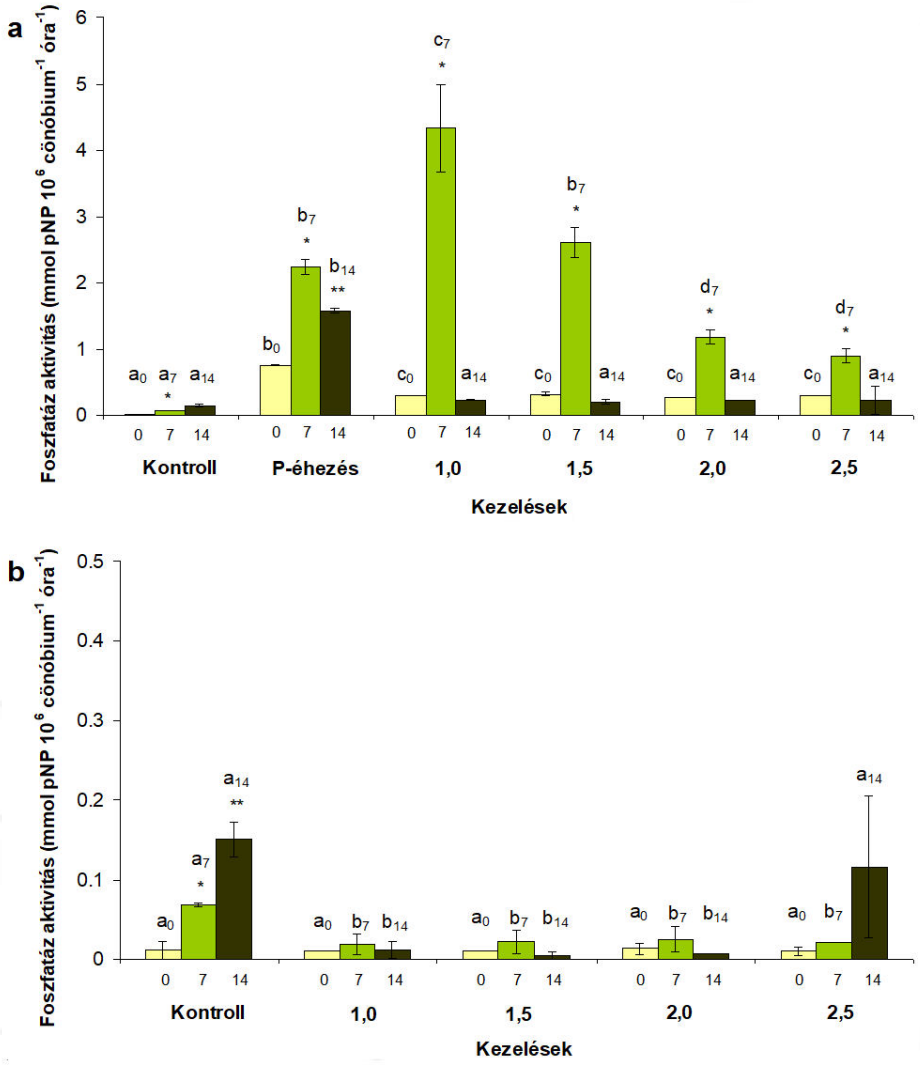
4.1.2.2. Alkalikus foszfatáz aktivitás

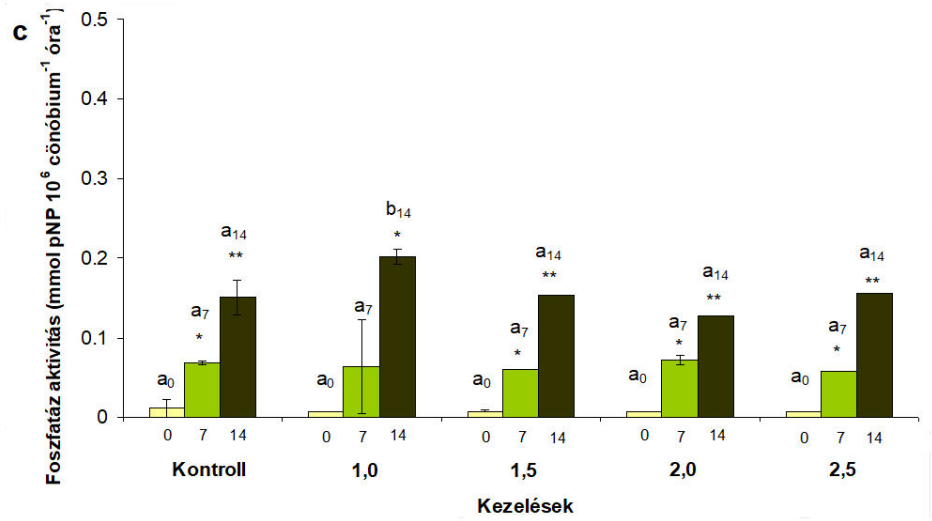
Az alkalikus foszfatáz aktivitás mindhárom mintavételi időpontban a foszfát éheztetett tenyészetekben szignifikánsan magasabb (p<0,001) volt, mint a kontroll tenyészetben (16a. ábra). A C+ kezelések során a 7. és 14. napokon az alkalikus foszfatáz aktivitás szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll tenyészetben ugyanezen napokon, a legmagasabb aktivitási értékek a kísérlet 7. napján voltak mérhetőek (16a. ábra). Kiemelkedően magas alkalikus foszfatáz aktivitást mértünk az 1,0 C+

tenyészetben a 7. napon, mely enzimaktivitás a foszfát-éheztetett tenyészetben ugyanazon napon mért alkalikus foszfatáz aktivitástól is szignifikánsan magasabb volt (p<0,05; 16a. ábra). Ki kell hangsúlyozni, hogy a cianobakteriális kivonatot tartalmazó tenyészetek tápoldatában nem volt limitáló a rendelkezésre álló, felvehető foszfát koncentrációja. Az alkalikus foszfatáz aktivitás az idő előrehaladtával, és a jelenlévő cianobakteriális kivonat mennyiségének növekedésével csökkent (16a. ábra).

A C− kezelések alkalikus foszfatáz aktivitásai egyik esetben sem voltak magasabbak a kontroll tenyészetben mérhető értékektől, sőt a 7. és 14. napokon, a 2,5 C− tenyészet kivételével, az egyes kezelések foszfatáz aktivitásai szignifikánsan alacsonyabbak voltak (p<0,05), mint a kontroll tenyészet ugyanezen napokon mért aktivitási értékei (16b. ábra).

A kísérlet 14 napja alatt a C−+C kezelésekben az alkalikus foszfatáz aktivitás folyamatos, növekvő tendenciát mutatott, hasonlóan a kontroll tenyészetben tapasztalt enzimaktivitási trendhez (16c. ábra). Az egyes tenyészetekben a legmagasabb aktivitási értékeket a 14. napon mértük. A 1,0 C−+C kezelés 14. napján mért alkalikus foszfatáz aktivitás szignifikánsan magasabb volt (p<0,005) a kontroll tenyészet 14. napján mért aktivitási értéktől (16c. ábra).


a
Foszfatáz aktivitás (mmol pNP 10^6 cönóbium^-1 óra^-1)
Kontroll
P-éhezés
1,0
1,5
2,0
2,5
Kezelések
b
Foszfatáz aktivitás (mmol pNP 10^6 cönóbium^-1 óra^-1)
Kontroll
1,0
1,5
2,0
2,5
Kezelések



16. ábra. Változások a *S. obtusus* alkalikus foszfatáz aktivitásában (pH9) az egyes kezelések hatására a 0., 7. és 14. napokon: a) CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C+), b) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonat (C-), c) nem CYN-termelő *Aphanizomenon* kivonattal kiegészítve CYN-nel (C−+C). A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget (p<0,05) a kezelések között kisbetűk (a-d), a napok között csillag (*) jelöli.

Összehasonlítva az egyes kezeléstípusok alkalikus foszfatáz aktivitási értékeit elmondható, hogy a 7. napon a C+ kezelések aktivitási értékei minden esetben szignifikánsan magasabbak voltak (p<0,005), mint a C− és C−+C kezelések aktivitási értékei. Megállapítható tehát, hogy a kontroll tenyészetekhez képest alkalikus foszfatáz indukció egyértelműen a C+ kezelésekben történt (illetve az 1,0 C−+C kezelésben).

Az alkalikus foszfatázok elsődleges szerepe a kötésben lévő foszfát felszabadításában, a foszfát-észter kötések hidrolízisében rejlik

(Kuenzler 1965, Kuenzler és Perras, 1965; Cembella et al., 1984). A megemelkedett alkalikus foszfatáz aktivitás foszfát limitált rendszerekben általános jelenség. Eredményeink alapján azonban ez az aktivitás-emelkedés CYN tartalmú kivonat esetén is megjelenik, elsősorban akkor, ha a CYN a cianobaktérium saját terméke (és kevésbé akkor, ha kívülről kerül hozzáadásra). Bar-Yosef és munkatársai (2010) *Chlamydomonas reinhardtii* tenyészetekben a kontrollnál magasabb alkalikus foszfatáz aktivitási értékeket mutattak ki, ha a zöldalgát CYN-termelő *C. ovalisporum* mediumba oltották a cianobaktérium eltávolítása után (7-8 µg ml^{-1}), illetve ha a zöldalgát tisztított CYN-nal (50 µg ml^{-1}) kezelték. Zhang és munkatársai (2017) *A. ovalisporum* jelenlétében alkalikus foszfatáz aktivitás emelkedést tapasztaltak *Microcystis panniformis* cianobaktérium tenyészetekben. Az általunk is kimutatott alkalikus foszfatáz aktivitás-emelkedés tehát azt mutatja, hogy a jelenség általános, a CYN jelenlétére nem érzékeny fitoplankton fajoknál is megfigyelhető. Az alkalikus foszfatáz aktivitásának csökkenése a növekvő CYN-koncentráció mellett azt sugallja, hogy a magasabb CYN koncentrációk gátolhatják a sejt több fiziológiás folyamatát, többek között a fehérjék szintézisét (Froscio et al., 2001, 2003, 2008).

A C+ kezelésekben tapasztalt enzim aktivitás emelkedés a C− kezelésekben nem volt megfigyelhető (16a-b. ábra). A C−+C tenyészetekben ugyan a tenyészidő előrehaladtával fokozódó, és a C− kezelésekben mért aktivitási értékeknél szignifikánsan magasabb alkalikus foszfatáz aktivitást sikerült kimutatni, viszont a kontroll tenyészettel összevetve csak az 1,0 C−+C kezelés esetében volt szignifikánsan magasabb az enzimaktivitás a kísérlet 14. napján (16c.

ábra). Mindez azt sugallja, hogy a C+ kezelések során alkalmazott CYN-tartalmú ciaobakteriális kivonatban jelen vannak egyéb olyan metabolitok is, melyek szinergista módon fokozzák a toxin hatását. Eredményeink tehát összhangban állnak Bar-Yosef és kutatócsoportja (2010) fentebb is említett eredményeivel, ahol a 7-8 μg ml^{-1} CYN koncentrációjú cianobakteriális tápoldat magasabb alkalikus foszfatáz aktivitást eredményezett, mint az 50 μg ml^{-1} koncentrációjú tisztított CYN. Az alkalikus foszfatáz enzim indukálására képes egyéb molekulák meglétét feltételezi az a tanulmány is, melyben nem CYN-termelő *C. raciborskii* törzsben mutattak ki különböző, a CYN-hez hasonló hatású extracelluláris komponenseket (Rzymski et al., 2014).

4.2. A különböző cianobakteriális kivonatok hatása a *Haematococcus pluvialis* zöldalgára

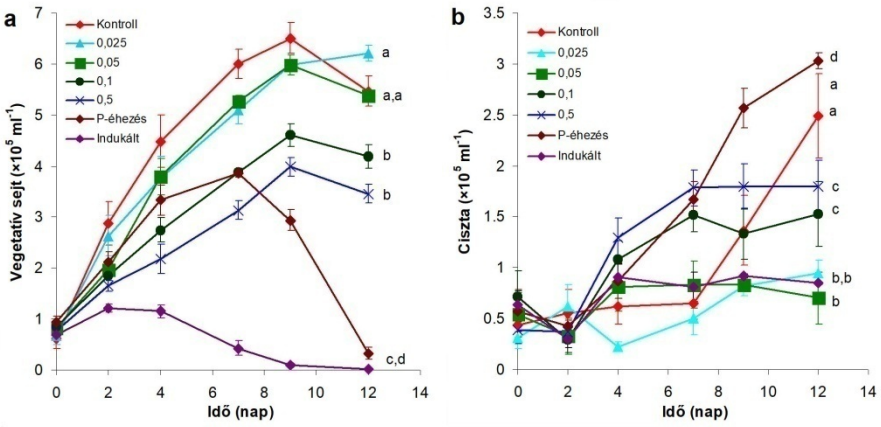
4.2.1. A *H. pluvialis* tenyészetek sejtszámában bekövetkezett változások

A *H. pluvialis* tenyészetek **összes sejtszámát** tekintve elmondható, hogy a CYN-tartalmú kivonat (C+) gátolta a *H. pluvialis* tenyészetek növekedését (17a. ábra). A hozzáadott kivonat mennyiségének növekedésével fokozódott a tenyészetekben megfigyelhető növekedés-gátlás mértéke, a 0,1 és 0,5 μg ml^{-1} CYN koncentrációk esetén a gátlás szignifikáns (p<0,005) volt. A sejtszám csökkenés hátterében elsősorban a *H. pluvialis* tenyészetek **vegetatív sejtszámá**nak csökkenése áll (17a. ábra**)**. A statisztikai elemzés alapján a 0,1 és 0,5 C+ tenyészetek esetén volt a növekedés-gátlás mértéke szignifikáns (p<0,05; 17a. ábra).

A cianobakteriális kivonat növekvő mennyisége fokozta a **cisztaképződést** az expozíció 4-7. napján (különösen a 0,1 és 0,5 C+ kezelések esetében), azonban a 14. napra az egyes kezelésekben a cisztaszám minden esetben szignifikánsan alacsonyabb volt (p<0,05) a kontroll tenyészetben tapasztalt értéknél (17b. ábra).

A foszfát-éheztetett tenyészet sejtszáma összes és vegetatív sejt tekintetében kisebb volt, mint a kontroll és a C+ kezelt tenyészeteké (17a. ábra). Az éheztetett tenyészetek cisztaszáma azonban szignifikánsan magasabb (p<0,05) volt mind a kontroll, mind a kezelések cisztaszámánál (17b. ábra).

Az indukált tenyészetek összes és vegetatív sejtszáma is szignifikánsan alacsonyabb volt (p<0,05) a kontroll és a cianobakteriális kivonattal kezelt tenyészetekben számolt értékekhez képest (17a. ábra). Az inokuláláskor alkalmazott azonnali indukció (oxidatív stressz) lehet az oka annak, hogy az indukált tenyészetek cisztaszáma is szignifikánsan alacsonyabb volt (p<0,05) a kontroll, a 0,1 és 0,5 C+, valamint a foszfát-éheztetett tenyészetek cisztaszámánál (17b. ábra).



17. ábra. Változások a *Heamatococcus pluvialis* vegetatív sejt (a) és ciszta (b) számaiban a kezelések hatására. A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbségeket (p<0,05) kisebetűk (a-d) jelölik.

A bemutatott eredmények azt sugallják, hogy a munkacsoportunk által vizsgált *H. pluvialis* törzs még alacsonyabb toxin-koncentrációk alkalmazása esetén is érzékenyebben reagál a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonattal történő kezelésre, mint az általunk vizsgált *S. obtusus* izolátum (Dobronoki et al., 2019). Eredményeink alapján az alkalmazott *H. pluvialis* izolátum érzékenysége a Campos és

munkatársai (2013) által vizsgált *C. vulgaris* érzékenységével összemérhető: 0,032-0,333 μg ml^{-1} CYN koncentrációjú cianobakteriális kivonattal történő kezelés hatására tapasztaltak gátlást a zöldalga sejtszám-növekedésben.

A cisztaszám tekintetében elmondható, hogy alacsony (0,025-0,05 μg ml^{-1}) toxin-koncentráció nem befolyásolta a cisztaképződést, azonban a CYN nagyobb koncentrációja (0,1 - 0,5 μg ml^{-1}) a 4-7 napokon magasabb cisztaszámot eredményezett, mint a kontroll tenyészetben. Azt mondhatjuk tehát, hogy ebben a koncentrációban a CYN stressz-faktorként indukálja a cisztaképződést (17b. ábra). Hangsúlyozandó azonban a kontrollban tapasztaltnál alacsonyabb cisztaszám a 14. napon, aminek hátterében a kontroll nagyobb sejtszáma, illetve fiziológiás folyamatok állhatnak (pl. a CYN proteinszintézist irreverzibilisen gátló szerepe; Terao et al., 1994; Froscio et al., 2001, 2003, 2008). Azt is ki kell emelni, hogy a kialakuló mozgásképtelen sejtekben a színanyag-felhalmozás nem indult meg markánsan (ld. 4.2.1. fejezet). A cisztaképzési folyamatokra irányuló adataink más kutatócsoportok eredményeivel történő mérvadó összevetése nem lehetséges, mivel tudomásunk szerint nincs szakirodalmi adat arra vonatkozóan, hogyan befolyásolják a cianotoxinok, köztük a CYN az algafajok kitartóképlet-képzését.

A foszfát-éheztetett tenyészetben tapasztalt, mind a kontroll, mind az indukált, mind pedig az egyes CYN-kezelések cisztaszámától szignifikánsan magasabb (p<0,05) cisztaszám arra enged következtetni, hogy a vizsgált *H. pluvialis* izolátum cisztaképzésének indukciójában a tápanyag limitáció hangsúlyosabb szerepet játszik, mint a folyamat

indukálására „hagyományosan” alkalmazott oxidatív stressz (hidrogén-peroxid).

4.2.2. A sejtek morfológiai változásai a *H. pluvialis* tenyészetekben

Kísérleteink során a *H. pluvialis* tenyészetekben megkülönböztetett zöld vegetatív sejtjek (ZV), zöld ciszták (ZC) és zöld-piros ciszták (ZPC) arányaiban bekövetkezett változásokat értékeltük, mely során az adott kezelésben adott napon számolt összes sejtszámot tekintettük 100%-nak, és az egyes sejtípusok arányát ehhez viszonyítva adtuk meg A zöld-piros vegetatív sejtek (ZPV), illetve a piros ciszták (PC) aránya elhanyagolható maradt a kísérletek során.

4.2.2.1. A zöld vegetatív sejtek arányának változásai a *H. pluvialis* tenyészetekben

A kontroll tenyészet zöld vegetatív sejtjeinek aránya a kísérlet 9. napjáig szignifikánsan nőtt (p<0,005) a 0. naphoz képest. (18. ábra; Függelék1, F1a. táblázat) A 12. napra a ZV arány visszaesett (18. ábra), ez a 4. és a 7. napokon számolt értékekhez képest eredményezett szignifikánsan alacsonyabb (p<0,05) ZV arányt (1. függelék, F1a. táblázat).

A CYN-tartalmú cianobakteriális kivonattal kezelt tenyészetek esetében a kontroll tenyészetben tapasztalt tendencia csak a 0,025 C+ kezelés esetén volt megfigyelhető (18. ábra; 1. függelék, F1b. táblázat).

A 0,05 C+ kezelés során a ZV arány az expozíció végéig szignifikánsan nagyobb volt (p<0,001), mint a 0. napon (18. ábra; 1. függelék, F1c. táblázat). A 2-12 napokon számolt ZV arányok között nem volt szignifikáns különbség (1. függelék, F1c. táblázat).

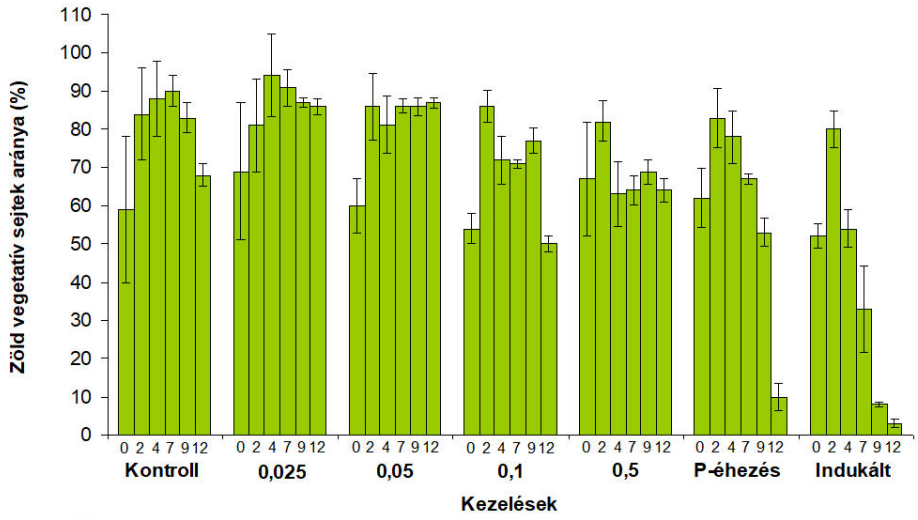
Az alkalmazott legmagasabb CYN koncentrációk esetén (0,1; 0,5 C+) a ZV arányok a 2. naptól csökkentek (18. ábra). A 0,1 C+ kezelés esetén a 12. napra a 2-9. napinál szignifikánsan kisebb (p<0,05) volt a ZV arány (1. függelék, F1d. táblázat). Hasonlóan alakult a ZV arány a 0,5 CYN kezelés során is azzal a különbséggel, hogy a 4-12. napok ZV arányában nem volt szignifikáns különbség (1. függelék, F1d,e. táblázat).

A foszfát-éheztetett tenyészetben szintén a 2. naptól szignifikánsan csökkent a ZV arány. Az indukált tenyészetben is hasonló tendencia volt megfigyelhető, itt a 2. naptól kezdődően minden napon szignifikánsan kisebb ZV arány volt tapasztalható (p<0,005; 18. ábra; 1. függelék, F1f,g. táblázat).

A különböző típusú kezelések között adott időpontban megfigyelhető ZV arányokat összevetve elmondható, hogy szignifikáns különbségek (p<0,05) csak a 4., 7. és 12. napokon voltak kimutathatóak (2. függelék, F2c, d, f. táblázat). Az idő előrehaladtával egyre több kezelés mutatott egymástól szignifikáns különbséget, több mintavételi napra jellemző, hogy minél magasabb koncentrációban tartalmaztak a tenyészetek CYN-t, a sejtjeik között annál kisebb arányban voltak ZV sejtjek (p<0,05; 2. függelék, F2f. táblázat; 17. ábra).

Az eredmények alapján látható, hogy a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonat növekedés-gátló hatást fejt ki a *H. pluvialis*

zöld, ostoros vegetatív sejtjeire, mely által csökken a tenyészetek ZV aránya (18. ábra). A foszfát-éhezés és a cisztaképzést, illetve karotinoid felhalmozást célzó indukció szintén a ZV arány csökkenéséhez vezetett, méghozzá a CYN-kezelésnél erőteljesebb mértékben (18. ábra). Ez összhangban áll az irodalmi adatokkal, melyek szerint a tápoldathoz meghatározott koncentrációban hozzáadott hidrogén-peroxid és nátrium-acetát a cisztaképzést indukálják (Kobayashi et al., 1993), mely együtt jár a vegetatív sejtszám lecsökkenésével. Meg kell jegyezni, hogy alacsonyabb toxin koncentrációjú cianobakteriális kivonat mellett (0,025; 0,05 C+) fokozódott a tenyészetekben számolt ZV arány (18. ábra). A jelenséget a cianobakteriális kivonatban jelenlévő tápanyagok, hormonhatású vegyületek hatásával magyarázhatjuk, mely anyagok kompenzálhatják a cianotoxin negatív hatásait, fokozhatják a sejtszám, jelen esetben a zöld vegetatív sejtek számának növekedését (Sergeeva et al., 2002; Stirk et al., 2002; Tsavkelova et al., 2006; Hussain et al., 2010).



18. ábra. A zöld vegetatív sejtek arányainak változásai a *H. pluvialis* tenyészetekben 12 nap alatt. A hibasávok az eredmények szórásai (n=3).

4.2.2.2. A zöld ciszták arányának változásai *H. pluvialis* tenyészetekben

A kontroll tenyészetben a ZC arány a 0. napon volt a legmagasabb (19. ábra), a többi mintavételi napon a ZC arány szignifikánsan csökkent a 7. napig (p<0,005), majd a 7. naptól növekedett az expozíció végéig, a 12. napra a 7. napon számoltnál szignifikánsan nagyobb ZC arányt eredményezve (3. függelék, F3a. táblázat).

A legalacsonyabb CYN koncentrációk mellett (0,025 és 0,05 C+ kezelések) szintén csökkent a ZC arány (19. ábra), ez a csökkenés a teljes expozíciós idő alatt megfigyelhető és szignifikáns mértékű volt (p<0,001; 3. függelék F3b. táblázat).

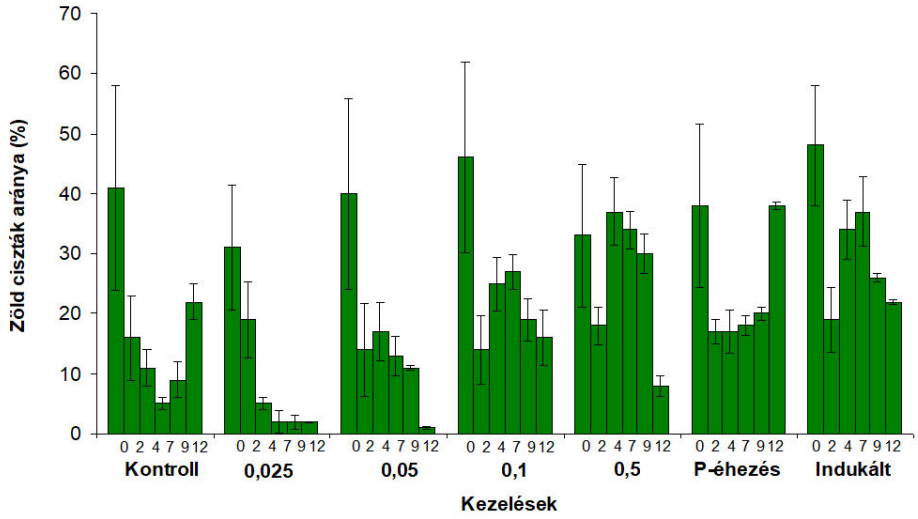
A 0,05 és 0,1 C+ kezelésekben a ZC arány hullámzó változása (csökkenés - növekedés - csökkenés) volt tapasztalható, a 2-12. napok (0,1 C+ kezelés), illetve a 4-9. napok (0,5 C+ kezelés) között azonban nem volt szignifikáns különbség (19. ábra; 3. függelék F3c-d. ábra).

A foszfát-éhezés során átmeneti csökkenés után az expozíció végére újra megnőtt a ZC arány, a 0. és 12. napi ZC arányok egymástól nem különböztek szignifikánsan (19. ábra; 3. függelék F3f. táblázat). Az indukált tenyészetben a ZC arány változásaiban hasonló tendencia fedezhető fel, mint a nagyobb mennyiségű cianobakteriális kivonatot tartalmazó tenyészetek esetében (19. ábra).

A különböző kezelések során adott időpontban megfigyelhető ZC arányokat összehasonlítva elmondható, hogy szignifikáns különbségek a 4. naptól voltak megfigyelhetőek: a ZC arány szignifikánsan nagyobb volt a 0,5 C+, a foszfát-éheztetett és az indukált tenyészetekben, mint a kontrollban és a kisebb CYN-koncentrációval kezelt tenyészetekben (19. ábra; 4. függelék F4a-f. táblázat).

A kapott eredmények alapján látható, hogy a CYN-tartalmú kivonat a 0,05 – 0,5 μg ml^{-1} tartományban a 4 – 9 napokon serkentette a cisztásodási folyamatokat, az általunk zöld cisztákként elkülönített ostor nélküli palmella állapot kialakulását. Az ebben a CYN-koncentráció tartományban, ezen időszakban megfigyelt zöld vegetatív sejt-arányok csökkenésének hátterében tehát – legalábbis részben – a palmella állapot, a zöld „ciszták” kialakulása áll. Elmondható tehát, hogy bizonyos koncentrációban a CYN – más stressz-faktorokhoz hasonlóan – beindítja a kitartó képletek differenciálódásának folyamatát a vizsgált modellszervezetben. Annak megválaszolása, hogy a jelenség mennyire

lehet általános fitoplankton közösségekben, természetesen további kutatásokat igényel.



19. ábra. A zöld ciszták arányainak változásai a *H. pluvialis* tenyészetekben 12 nap alatt. A hibasávok az eredmények szórásai (n=3).

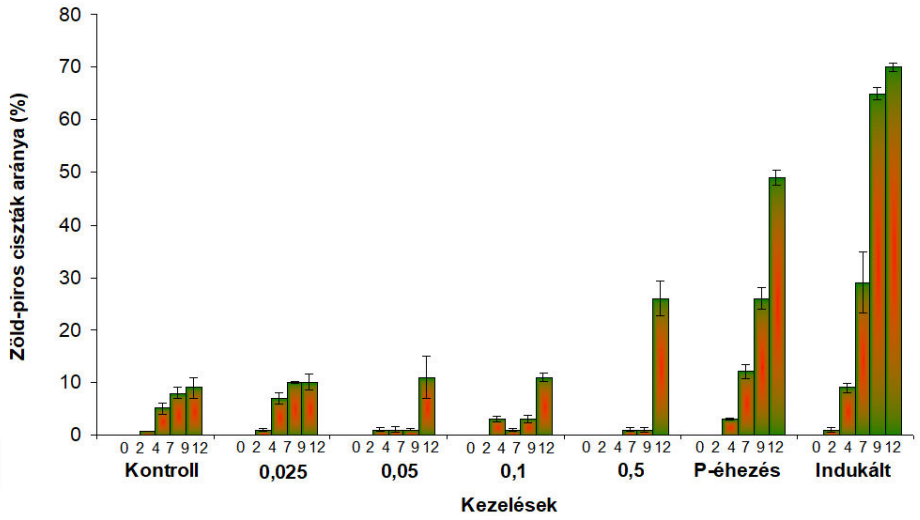
4.2.2.3. A zöld-piros ciszták arányainak változásai a *H. pluvialis* tenyészetekben

A ZPC arány minden tenyészet esetében többé-kevésbé növekvő tendenciát mutatott az idő előrehaladtával. A kontroll és a 0,025 C+ tenyészetben a 7. naptól szignifikánsan nagyobb volt ez a növekedés (p<0,05; 5. függelék, F5a,b. táblázat). A 0,05; 0,1 és 0,5 C+ kezelések esetében azonban csak a kísérlet utolsó napján volt a ZPC arány szignifikánsan magasabb (p<0,001) a korábbi napokon számolthoz képest (5. függelék, F5c-e. táblázat).

A legmagasabb ZPC arányok a foszfát-éheztetett és az indukált tenyészetekben voltak megfigyelhetőek (19. ábra). A ZPC arányok növekedése a foszfát-éhezés esetén a 7. naptól, az indukált tenyészetek esetén a 4. naptól volt szignifikáns (p<0,001; 5. függelék, F5f, g. táblázat).

A különböző kezelésekben ugyan azon a napon megfigyelt ZPC arányokról elmondható, hogy egyedül a 0,5 C+ kezelés során a 12. napra emelkedett szignifikánsan (p<0,001) a ZPC arány a kontroll és a többi CYN kezelt tenyészetben tapasztalt arányhoz képest, de alatta maradt az éheztetett és az indukált tenyészetek ZPC arányának. Ugyanakkor alacsonyabb CYN koncentrációk mellett a 4-9. napokon a kontroll tenyészetben megfigyeltnél is szignifikánsan alacsonyabb volt a ZPC arány (p<0,01; 6. függelék, F6a-g. táblázat).

A ZPC arányokra vonatkozó eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a karotinoid-szintézis, pontosabban a piros színanyagok termelése gátlást szenved CYN-tartalmú kivonat jelenlétében a vizsgált *H. pluvialis* izolátum esetében. A foszfát-éhezés során tapasztalt intenzív színanyag-felhalmozás alátámasztja azon irodalmi adatokat, melyek foszfát-éhezés következtében indukálódott astaxanthin termelésről számolnak be (Boussiba és Vonshak, 1991, 1992; He et al., 2007; Yin et al., 2007), vagyis a jelenség általánosnak tekinthető. Továbbá kijelenthető, hogy a Kobayashi és munkatársai (1993) által kidolgozott eljárás a cisztaképződés és a színanyag felhalmozás indukciójára (oxidatív stressz), a munkacsoportunk által alkalmazott *Haematococcus pluvialis* (ACCDH-UD1205) izolátum esetében is működött.



20. ábra. A *H. pluvialis* tenyészetek zöld-piros ciszta arányainak változásai 12 nap alatt. A hibasávok az eredmények szórásai (n=3).

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatok egyaránt hatást fejtenek ki az általunk vizsgált *H. pluvialis* zöldalga vegetatív sejtjeinek életképességére és az izolátum cisztásodási folyamataira. Kísérleteink azt sugallják, hogy a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonat stresszfaktorként serkenti a zöldalga cisztaképzési folyamatait, azonban az algasejtekben nem indul meg látványos színanyag-felhalmozás (19-20. ábra). A *H. pluvialis* kedvezőtlen körülmények hatására fokozódó kitartóképlet-képzéséről nagy számú irodalom áll rendelkezésünk (Santos és Mesquita, 1984; Ettl, 1988; Boussiba és Vonshak, 1991; Hagen et al., 1993, 1994, 2002). Ezzel szemben a toxikus cianbakteriális kivonat, mint stressz-faktor jelenlétében indukálódó cisztaképzés, ugyanakkor elmaradó színanyag-felhalmozás tekintetében (20. ábra) nem találtunk irodalmi adatokat. A

jelenség háttérben a CYN, illetve a cianobakteriális kivonat bármely citotoxikus hatása állhat.

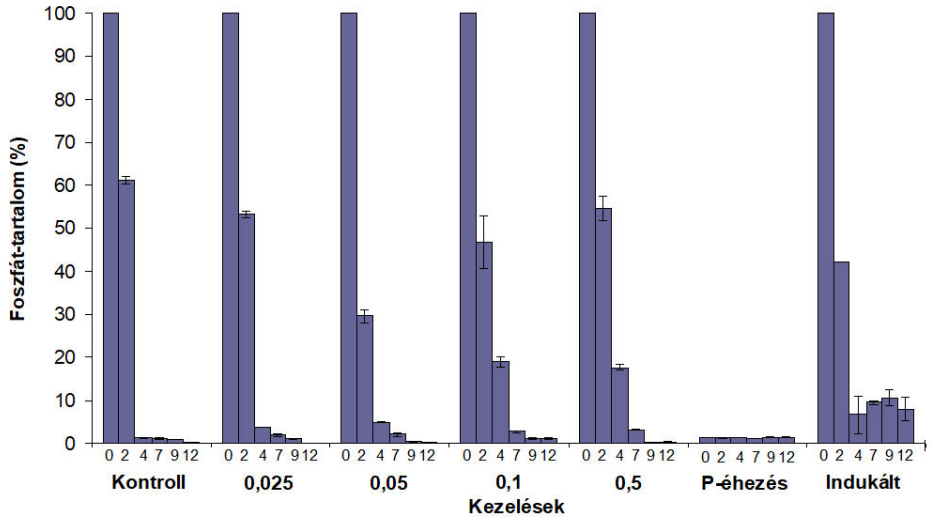
A CYN oxidatív stresszt indukáló hatásáról számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre (Humpage et al., 2005; Gutiérrez-Praena et al., 2011; Gutiérrez-Praena et al., 2012a; Liebel et al., 2011; Pierto et al., 2011; Gutiérrez-Praena et al., 2012b; López-Alonso et al., 2013; Sieroslauska és Rymuszka, 2015; Štraser et al., 2013; Freitas et al., 2015; Hinojosa et al., 2019). Ennek ellenére a CYN algákra kifejtett oxidatív stresszt előidéző hatásáról hiányosak az ismereteink. Figyelembe véve, hogy a CYN irreverziblisen gátolja a sejtekben végbemenő fehérjeszintézist (Terao et al., 1994; Froscio et al., 2001, 2003, 2008) feltételezhetjük, hogy a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonattal kezelt *H. pluvialis* tenyészetekben a toxin proteinszintézisre kifejtett gátló hatása „felülírja" a CYN által előidézett oxidatív stresszt, és ugyan a sejtek cisztásodási folyamatai indukálódnak (19. ábra), színanyagfelhalmozás nem történik (20. ábra). Annak igazolása, hogy a CYN milyen mértékben fokozza *H. pluvialis* sejtekben a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét, illetve a karotinoidok szintézisében részt vevő enzimek termelődése milyen mértékben gátlódik, további vizsgálatokat igényel.

4.2.3. A *H. pluvialis* tenyészetek foszfát felvételében bekövetkezett változások

A kontroll tenyészetben az algasejtek a nevelési idő 4. napjára szinte teljes mértékben felvették a rendelkezésre álló foszfort (21. ábra).

A cianobakteriális kivonattal kezelt tenyészetekben a kivonat mennyiségének a növekedésével lassult a foszfát felvétel (21. ábra). Alacsonyabb toxin koncentrációk mellett (0,025; 0,05 μg ml^{-1} CYN) a tápoldat 4. napon mért foszfát koncentrációja csak a 9. és 12. napi értékektől volt szignifikánsan magasabb (p<0,05; 7. függelék, F7b-c. táblázat), azonban a 0,1 és 0,5 μg ml^{-1} CYN koncentráció mellett a 4. napon mért érték még a 7. napon mért foszfát koncentrációktól is szignifikánsan magasabb volt (p<0,001; 7. függelék, F7d-e. táblázat). Feltételezhető, hogy a 0,1 és 0,5 C+ kezelésekben tapasztalt lassabb foszfát-felvétel (21. ábra) a cisztaképződés indukciójával lehet összefüggésben.

Összehasonlítva az egyes *H. pluvialis* tenyészetek tápoldatának foszfát koncentrációit a kísérlet ugyanazon napjain, elmondható, hogy az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségek száma csökkent az idő előrehaladtával (8. függelék, F8a-e. táblázat). Az indukált tenyészetek tápoldatából nem került teljes mértékben eltávolításra a foszfor (21. ábra), ennek hátterében minden bizonnyal az indukált tenyészetek sejtszámának erőteljes csökkenése (17. ábra), illetve az expozíció kezdetétől meginduló cisztásodási folyamatok állnak.



21. ábra. Az egyes *H. pluvialis* tenyészetek tápoldatának foszfát tartalom változásai. 12 nap alatt. A hibasávok az eredmények szórásai (n=3)

A foszfát-felvétellel kapcsolatos eredmények azt mutatják, hogy a növekedésben gátolt, alacsonyabb sejtszámmal (főképpen vegetatív sejtszámmal) jellemezhető tenyészetek is jelentős mennyiségű foszfátot vesznek fel, vagyis az egységnyi számú sejtre jutó felvett foszfát mennyisége még nőtt is. Ez összhangban áll azokkal az eredményekkel, amelyek szerint az érett, piros cisztákban nagyobb a légzés intenzitása és fokozottabbak a glikolízis folyamatai (Hagen et al., 1993b; Rect et al., 2012, 2014). Így a sejt ATP igénye fenntartható a fotoszintetikus folyamatok intenzitásának visszaesése mellett is (Hagen et al., 1993a). Ugyanakkor hangsúlyozandó, hogy nem találtunk konkrét irodalmi adatokat arra vonatkozóan, hogyan változik a foszfor-anyagcsere a cisztásodással együtt járó morfológiai változások során, a folyamatok energiaigényének kielégítéséhez szükséges foszfát felvételére mely

fázisban kerül sor. A foszfát-tartalom változásait a sejtszám-változásokkal összhangban szemlélve – ahogyan fentebb is említésre került – folyamatos, fokozódó foszfát-felvétel feltételezhető, a tápoldat foszfát-tartalmának fogyása alacsonyabb (vegetatív) sejtszámok mellett csak így értelmezhető. Annak egzakt tárgyalására azonban, hogy az egyes sejttípusok egymáshoz viszonyítva milyen mértékben veszik fel a foszfort a környezetükből, jelen disszertáció keretein belül nem vállalkozhatunk.

4.2.4. A *H. pluvialis* tenyészetek foszfatáz aktivitásában bekövetkezett változások

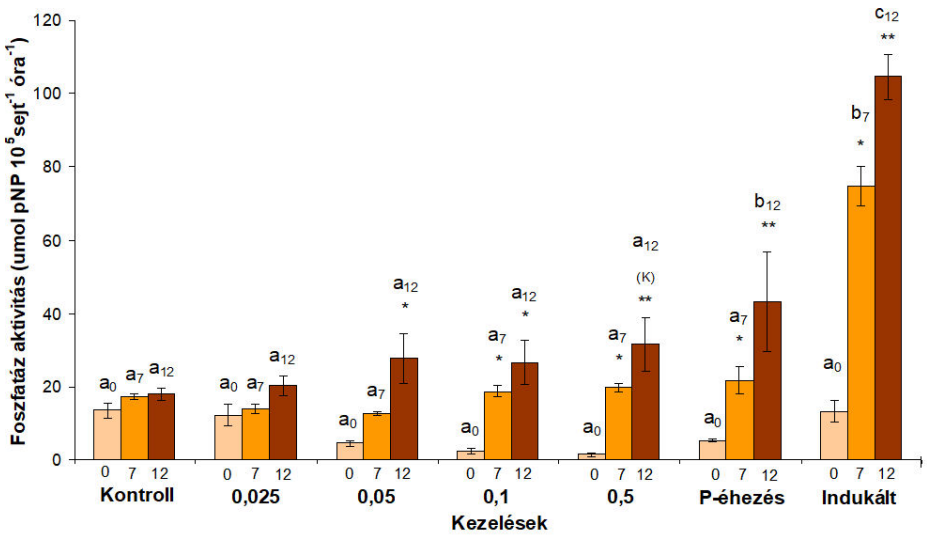
4.2.4.1. Savas foszfatáz aktivitás

A kontroll tenyészetben a **savas foszfatáz** aktivitás nem mutatott lényeges változást az idő előrehaladtával (22. ábra). A 0,05-0,5 C+ kezelések során szignifikánsan (p<0,01) nőtt a savas foszfatáz aktivitás a 12., vagy több esetben már a 7. napra, az aktivitás-növekedés mértéke nőtt a cianobakteriális kivonat mennyiségének növekedésével (22. ábra).

Szintén a savas foszfatáz aktivitás szignifikáns mértékű (p<0,001) emelkedése volt megfigyelhető a foszfát-éheztetett és az indukált tenyészetekben is (22. ábra).

A különböző kezelések során ugyanazon időpontban mért savas foszfatáz aktivitásokat összevetve elmondható, hogy a C+ kezelésekben a nevelési idő utolsó napján mért savas foszfatáz aktivitás értékek nem különböztek szignifikánsan a kontroll tenyészetben a 12. napon mért

értékektől. A foszfát-éhezés illetve a cisztaképzés indukciója ellenben a 12., illetve utóbbi esetben már a 7. napon is a kontrollban mérhetőnél szignifikánsan nagyobb savas foszfatáz aktivitást eredményezett (22. ábra).



22. ábra. Változások a *H. pluvialis* savas foszfatáz aktivitásában (pH5) az egyes kezelések hatására a 0., 7. és 12. napokon. A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget (p<0,05) a kezelések között kisbetűk (a-c), a napok között csillag (*) jelöli.

Meghatározott koncentrációk mellett, a cianobakteriális kivonat savas foszfatázokat indukáló hatása kimutatásra került a *S. obtusus* esetében (jelen dolgozat 4.1.2. fejezet; Dobronoki et al., 2019). Ugyanakkor ezt a hatást a *H. pluvialis*-ra vonatkozó eredmények nem erősítik meg (a kontrolltól való szignifikáns eltérés elmaradása a C+ kezelésekben).

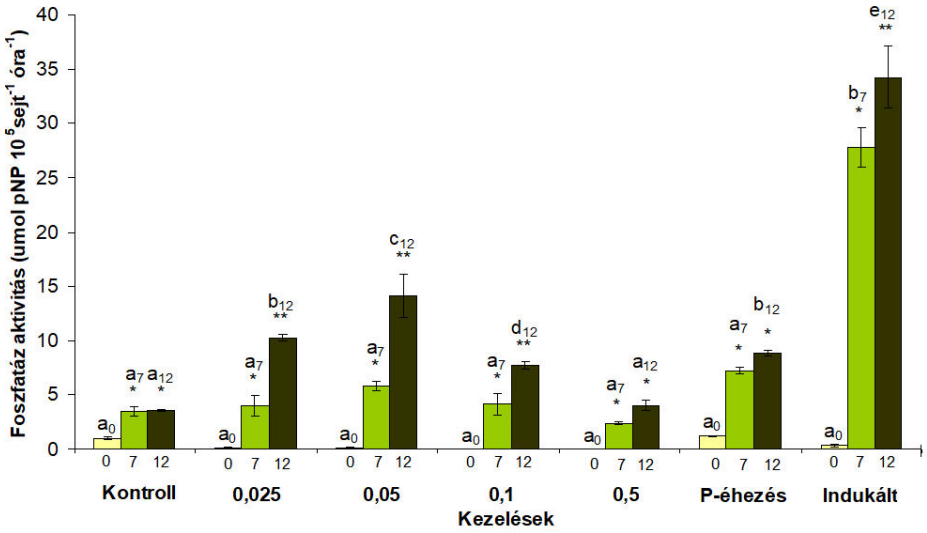
A foszfát-éhezés során tapasztalt magas savas foszfatáz aktivitás hátterében a tápoldat foszfát limitáltsága áll. Irodalmi adatok alátámasztják, hogy a környezet alacsony foszfát koncentrációja vagy a foszfát limitációja hozzájárul a sejtek savas foszfatáz aktivitásának megemelkedéséhez, valamint azt, hogy a foszfát hiány mellett más stressz faktorok is fokozottabb enzimaktivitást eredményezhetnek (DuBois et al., 1984; Kruskopf és Du Plessis 2004). A stressz magyarázat lehet az indukált tenyészetekben tapasztalt intenzív savas foszfatáz aktivitás emelkedésre is. Feltételezhető, hogy a magas enzimaktivitás hátterében egyaránt szerepet játszik a tápanyagok foszfát-felvétel miatt bekövetkező megváltozott aránya, illetve a tenyészetekben jelenlévő H_2O_2 hatására indukálódott oxidatív stressz. A savas foszfatáz aktivitás és az oxidatív stressz közötti esetleges összefüggések feltárása azonban további, célzott vizsgálatokat igényel. Emellett az intenzívebb savas foszfatáz működés is része lehet a cisztaképződés során átalakuló anyagcserének.

4.2.4.2. Alkalikus foszfatáz aktivitás

Az alkalikus foszfatáz aktivitás mind a kontroll, mind a kezelt tenyészetekben szignifikánsan nőtt (p<0,01) az idő előrehaladtával (23. ábra). A kontroll tenyészetben a 7. és 12. napokon mért értékek között már nem volt szignifikáns különbség, ezzel szemben a 0,025 – 0,1 C+ kezelésekben a 7. napon mért értéktől is szignifikánsan nagyobb (p<0,001) alkalikus foszfatáz aktivitás volt kimutatható a 12. napon. A legmagasabb enzimaktivitást a CYN-kezelések esetében a 0,05 C+

tenyészetbenben mértük a 12. napon. A toxintartalmú cianobakteriális kivonat mennyiségének a növekedésével (0,1 és 0,5 C+ kezelések) a zöldalga alkalikus foszfatáz aktivitása kisebb volt, a 0,5 C+ kezelés esetében a kontrollhoz hasonlóan nem volt szignifikáns különbség a 7. és 12. napon mért értékek között (23. ábra). Hasonló tendencia volt megfigyelhető a foszfát-éhezés és az indukció esetén is, ki kell emelni, hogy előbbi esetén a 7-től a 12. napra már nem volt további szignifikáns aktivitás-emelkedés, míg utóbbi esetben igen (az indukció során volt mérhető a legnagyobb alkalikus-foszfatáz aktivitás; 23. ábra).

A kezelések között adott időpontban megfigyelhető különbségekkel kapcsolatban azt kell kiemelni, hogy a 12. napra a 0,025-0,1 C+ kezelésekben szignifikánsan nagyobb alkalikus foszfatáz aktivitások voltak mérhetők, mint a kontrollban. Igen lényeges, hogy a 12. napon a 0,025 C+ kezelés esetén a foszfát-éhezés során mért alkalikus foszfatáz aktivitással összemérhető, 0,05 C+ kezelés esetén pedig a foszfát-éhezés során mértnél szignifikánsan nagyobb (p<0,001) alkalikus foszfatáz aktivitás volt kimutatható.



23. ábra. Változások a *H. pluvialis* alkalikus foszfatáz aktivitásában (pH11) az egyes kezelések hatására a 0., 7. és 12. napokon. A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget (p<0,05) a kezelések között kisbetűk (a-e), a napok között csillag (*) jelöli.

Az eredmények alapján látható, hogy a *S. obtusus* tenyészetek esetében tapasztaltakhoz hasonlóan (jelen dolgozat 4.1.2.2. fejezet; Dobronoki et al., 2019), alacsonyabb toxin koncentrációk mellett a *H. pluvialis* zöldalga esetében is fokozódik a tenyészetek alkalikus foszfatáz aktivitása. Újra külön kiemelendő, hogy a 0,05 C+ tenyészetben 12. napon mért enzimaktivitás még a foszfát-éheztetett tenyészet 12. napi alkalikus foszfatáz aktivitásától is szignifikánsan nagyobb volt (p<0,001; 23. ábra). Nagyobb CYN koncentrációk mellett ez a hatás már kevésbé érvényesült (23. ábra). Az eredmények alapján kijelenthető: a *H. pluvialis* esetében is bizonyítást nyert, hogy a CYN jelenlétében átmeneti alkalikus foszfatáz aktivitás-emelkedéssel lehet

számolni hasonlóan a *Clamydomonas reinhardtii* (Bar-Yosef et al., 2010) és a *Scenedesmus obtusus* (Dobronoki et al., 2019) zöldalgák, illetve a *Microcystis aeruginosa* (Rzymski et al., 2014) és a *Microcystis panniformis* (Zhang et al., 2017) cianobaktériumok esetén megfigyeltekhez. Hangsúlyozandó, hogy az a CYN koncentráció, mely az adott algafaj alkalikus foszfatáz aktivitását serkenti, taxononként eltérő, ahogyan az egyes fajok CYN-nel szembeni toleranciája is. A tanulmányozott izolátum esetében már a 0,1 μg ml^{-1} toxin koncentrációjú kivonat fokozza a cisztásodási folyamatokat, az ennél magasabb dózis pedig letális (nem bemutatott adatok). Az alkalikus foszfatáz aktivitás és a CYN jelenléte közötti összefüggésekkel kapcsolatban az eddigi eredmények alapján kijelenthető, hogy a Bar-Yosef és munkatársai (2010) által feltételezett, a fitoplanktonra gyakorolt allelopatikus hatás széles körben általánosnak tekinthető.

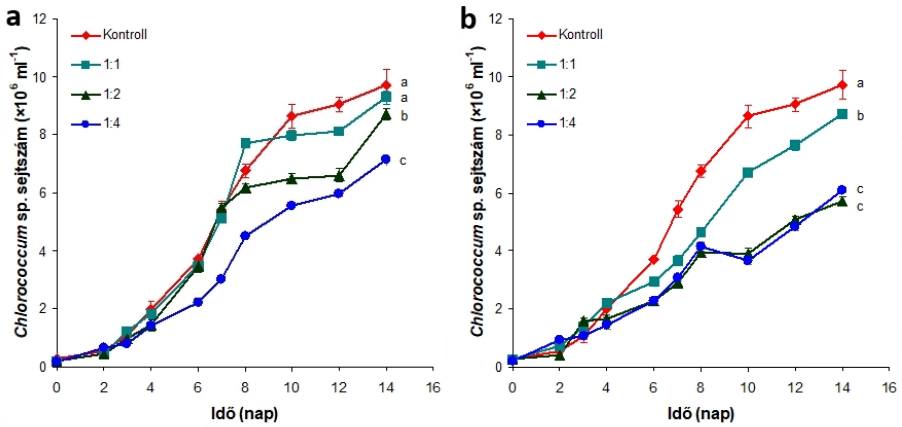
4.3. A különböző cianobakteriális kivonatok hatása a *Chlorococcum* sp. zöldalgára

4.3.1. A *Chlorococcum* sp. sejtszámában bekövetkező változások

A *Chlorococcum* sp. zöldalga esetében a tenyészeteket a sejtszámmal arányos, illetve annál nagyobb mennyiségű, teljes (a feltárás során keletkező sejttörmeléket is tartalmazó), illetve centrifugált (csak a homogén vizes fázist tartalmazó) *C. ovalisporum* kivonatokkal kezeltük. A *C. ovalisporum* cianobakteriális kivonatokkal kezelt *Chlorococcum* sp. tenyészetek sejtszámai a tenyészidő 14. napján minden esetben alacsonyabbak voltak, mint a kontroll tenyészet sejtszáma (24. ábra). A *C. ovalisporum* kivonatok tehát gátolták a zöldalga sejtszám-növekedését, a tapasztalt növekedés-gátlás mértéke a kivonat mennyiségének növekedésével fokozódott (24. ábra).

Az egyes kezeléseket tekintve elmondható, hogy a teljes kivonattal való kezelés esetén a legkisebb mennyiségű cianobakteriális kivonatot tartalmazó *Chlorococcum* sp. tenyészet (1:1) sejtszáma nem különbözött szignifikánsan a kontroll tenyészet értékeitől (24a. ábra), ezen tenyészet esetében a növekedésgátlás csupán 5%-os volt. Az 1:2 és 1:4 kezelések sejtszám értékei viszont már szignifikánsan alacsonyabbak voltak *(*$p<0,05$), mint kontroll és az 1:1 tenyészetben tapasztalt sejtszámok (24a. ábra). Az 1:4 kezelés sejtszámai még az 1:2 tenyészet sejtszám értékeitől is szignifikánsan alacsonyabbak voltak ($p<0,05$; 24a. ábra). A

kontroll tenyészethez képest a 14. napra számított növekedésgátlás az 1:2 kezelésben 10%-os, az 1:4 kezelés esetében pedig 27%-os volt volt.



24. ábra.. Változások a *Chlorococcum* sp. sejtszámában a zöldalga sejtszámával azonos (1:1), kétszeres (1:2) és négyszeres (1:4) *C. ovalisporum* sejtszámnak megfelelő mennyiségű teljes (a) és centrifugált (b) kivonattal történő kezelés során. A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A szignifikáns különbséget (p<0,05) a kisbetűk (a-c) jelölik.

A centrifugált cianobakteriális kivonattal kezelt *Chlorococcum* sp. tenyészetek sejtszámai minden esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak (p<0,005) mint a kontroll tenyészet sejtszámai (24b. ábra). A tapasztalt növekedésgátlás minden esetben nagyobb mértékű volt, mint a teljes *C. ovalisporum* kivonattal való kezelés során megfigyelt (24. ábra). A nevelési idő 14. napján az 1:1 kezelésben 10%, az 1:2 tenyészetben 41 %, a 1:4 kezelés esetében pedig 37%-os volt a növekedésgátlás. Szükséges kiemelni, hogy a centrifugált tenyészettel kezelt zöldalga tenyészetek esetében a sejtszám növekedés ütemének

csökkenése a tenyészidő 4. napjától következett be, ellenben a teljes cianobakteriális kivonattal történő kezelés esetében csupán a 7. naptól lehetett számottevő csökkenést megfigyelni (24. ábra).

A CYN tartalmú cianobakteriális kivonatok eukarióta algafajok növekedésére kifejtett hatásáról viszonylag kevés információ áll rendelkezésre (Bar-Yosef et al., 2010; Campos et al., 2013; Pinheiro et al., 2013; B-Béres et al., 2015; Dobronoki et al., 2019). Azonban ezek ismeretében is kijelenthető, hogy a cianobakteriális kivonatok növekedésgátló hatása erős korrelációt mutat a kivonat CYN tartalmával, illetve fajonként eltérő mértékű lehet. Az általunk vizsgált *Chlorococcum* sp. izolátum viszonylag érzékenyen reagált már egészen alacsony CYN koncentrációjú (0,04 – 0,17 µg ml-^{1}) cianobakteriális kivonattal történő kezelésre is (24. ábra). Campos és munkatársai (2013) *Chlorella vulgaris* faj esetében növekedésgátlást figyelt meg már 0,032-0,333 µg mL-^{1} CYN koncentrációjú teljes cianobakteriális kivonat alkalmazása esetén. Hasonlóan alacsony toxin koncentrációk (0,025 – 0,5 µg ml-^{1}) mellett a *H. pluvialis* zöldalga izolátum esetében is a vegetatív sejtek számának növekedésében bekövetkezett szignifikáns (p<0,05) gátlás mutatkozott (4.2. fejezet). Ezzel szemben nagyobb (1,0-2,5 µg ml-^{1}) CYN koncentrációjú *C. ovalisporum* kivonatok alkalmazása esetén sem tapasztaltunk szignifikáns növekedésgátlást a *S. obtusus* zöldalga faj esetében (4.1. fejezet; Dobronoki et al., 2019). Ezen eredmények alátámasztják azt, hogy az egyes algafajok széles tartományban eltérően reagálnak a különböző CYN koncentrációkra.

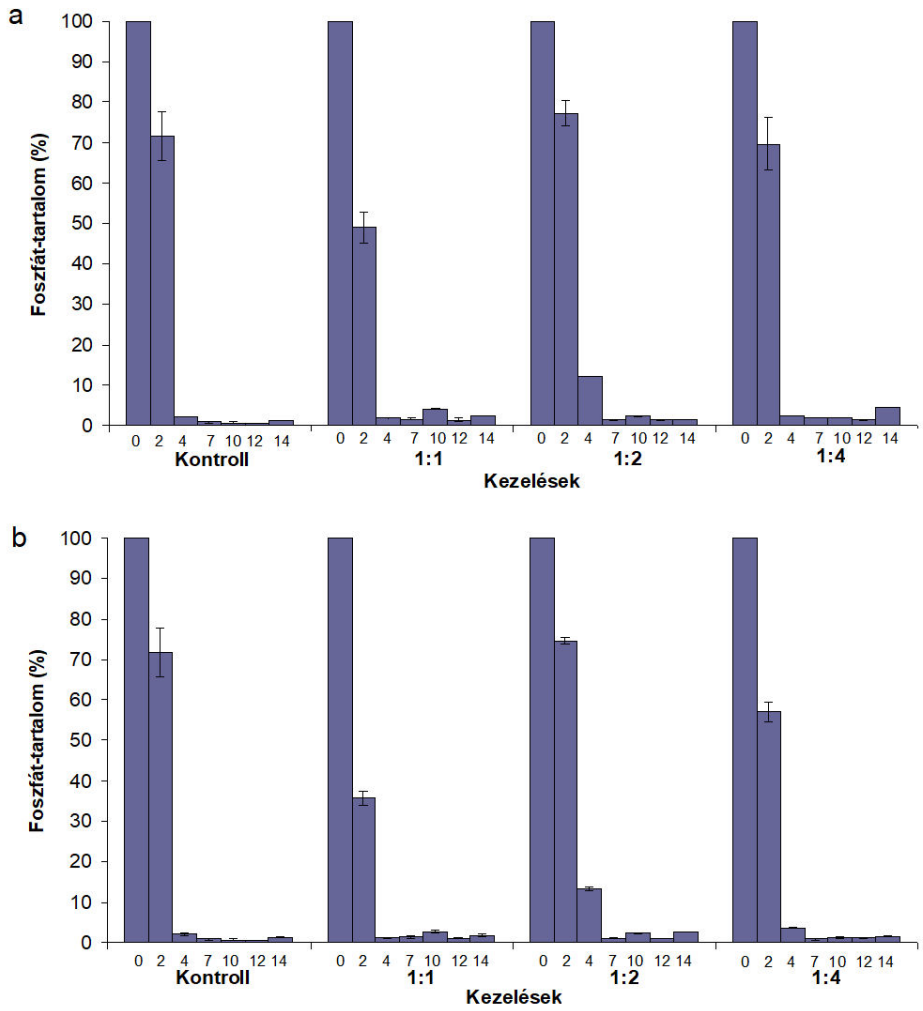
A teljes kivonat és a centrifugált kivonat hatásait összevetve elmondható, hogy a teljes kivonat kisebb mértékű növekedés-gátló

hatása meglepő, hiszen annak árnyékoló hatása, illetve a CYN mellett jelenlévő egyéb molekulák (zsírsavak, poliszacharidok, sejtfalhoz kötött enzimek) mennyisége is nagyobb. Azonban a CYN mellett mind a teljes, mind pedig a centrifugált cianobakteriális kivonat tartalmaz egyéb olyan vízben oldódó, biológiailag akív komponenseket, melyek hatással vannak a *Chlorococcum* sp. növekedésére. Feltételehező, hogy a teljes kivonatban található sejttörmelék felszíne átmenetileg megköti a kivonat vízben oldódó összetevőit, így azok algasejtek növekedésére kifejtett gátló hatása kevésbé érvényesül. Továbbá a teljes cianobakteriális kivonat nagyobb mennyiségben tartalmazhat különböző tápanyag- és hormonszerű molekulákat (Hussain et al., 2010; Sergeeva et al., 2002; Stirk et al., 2002; Tsavkelova et al., 2006), mely komponesek kompenzálni képesek a kivonat növekedésgátló hatását, segítve a zöldalga sejtek számának növekedését. Így a teljes kivonattal kezelt *Chlorococcum* sp. tenyészetekben megfigyelt növekedésgátlás mértéke kisebb, mint a centrifugált kivonattal kezelt algatenyészetek esetében. Természetesen ezen feltevések igazolása további, részletesebb vizsgálatokat igényel.

4.3.2. A *Chlorococcum* sp. foszfát felvételében bekövetkező változások

Az egyes *Chlorococcum* sp. tenyészetek foszfát koncentrációit figyelembe véve elmondható, hogy minden tenyészet esetében a zöldalgasejtek a tenyésziđő 4. napjára szinte teljes mértékben felvették a rendelkezésre álló foszfátot (25. ábra). Kiemelendő, hogy a

különbözőképpen kezelt tenyészetek foszfát felvételének dinamikájában nem voltak szignifikáns különbségek (25. ábra).



25. ábra. Változások a *Chlorococcum* sp. foszfát koncentrációiban a zöldalga sejtszámával azonos (1:1), kétszeres (1:2) és négyszeres (1:4) *C. ovalisporum* sejtszámnak megfelelő mennyiségű teljes (a) és centrifugált (b) kivonattal

történő kezelés során. A hibasávok az átlagok szórásai, n=3. A tápoldatok 0. napon mért foszfát koncentrációját tekintettük 100%-nak.

Mind a teljes, mind pedig a centrifugált kivonattal kezelt *Chlorococcum* tenyészetekben csak a 0. és 2. napokon mért foszfát-tartalom különbözött szignifikánsan (p<0,001) egymástól és a tenyészidő többi mintavételi napján mért értékektől. Az 1:2 kezelésben emellett a 4. napon mért foszfát-tartalomtól is szignifikánsan (p<0,001) kisebb foszfát-tartalmak voltak mérhetők a nevelési idő többi napján (9. függelék, F9a-d. táblázat; 11. függelék, F11a-d. táblázat). Összevetve a különböző összeállítású *Chlorococcum* tenyészetek ugyanazon napokon mért foszfát-tartalmát megállapítható, hogy szignifikáns különbségek (p<0,05) mindkét kezeléstípus esetén csak a 2. és 4. napon mért értékek között voltak kimutathatók (10. függelék, F10a-f. táblázat; 12. függelék, F12a-f. táblázat).

Összességében elmondható, hogy sem a teljes, sem pedig a centrifugált cianobakteriális kivonat nem fejtett ki jelentős hatást a *Chlorococcum* sp. tenyészetek foszfát-felvételére. Mindkét kezeléstípus esetén az 1:2 kezelésben a 4. napon mért foszfát-tartalom még szignifikánsan nagyobb volt (p<0,001), mint a tenyészidő további napjain mért értékek. Ez a jelenség a többi zöldalga tenyészet esetében nem volt megfigyelhető, esetükben már a 4. napra szinte teljes mértékben felvételre került a foszfát a tápoldatból. A jelenség pontos magyarázata, különös tekintettel arra, hogy az alkalmazott cianobakteriális kivonattól függetlenül mindkét típusú kísérletsorozatban általános volt, további vizsgálatokat igényel.

4.4. 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 µg 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 ciszták érésére, 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 sejttörmelék) befolyásolják az „oldat" frakcióban jelen lévő bioaktív anyagok mennyiségét, hatását.

Összevetve a különböző zöldalgákra kifejtett hatásokat 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 μg ml^{1}) sem, addig más fajok esetében már ennél jelentősen alacsonyabb toxin koncentrációk (*H. pluvialis*, 0,05 μg ml^{-1}; *Chlorococcum* sp. 0,04 μg 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 cianotoxinok közösségformáló jelentőségét vízi ökoszisztémákban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A cilindrospermopszin a mikrocisztinek után a második legjobban ismert és kutatott cianotoxin. Ennek ellenére termelésének okáról, biológiai funkciójáról és az algaközösségekben betöltött szerepéről kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A CYN-termelő cianobaktérium törzsek eredetileg trópusi, szubtrópusi területeken fordultak elő, azonban az elmúlt években egyre több szakirodalmi adat számol be a termelő törzsek mérsékelt, sőt mi több, száraz éghajlaton való megjelenéséről (Poniedziałek et al., 2012; Mohamed és Al-Shehri, 2013). Globális diszperziójuk gyorsulni látszik (Fastner et al., 2003, 2007; Quesada et al., 2006), épp emiatt a toxikus vízvirágzások szakszerű prevenciójához és kontrolljához elengedhetetlen a toxin biológiai hatásainak minél széleskörűbb és pontosabb ismerete.

A doktori munka során különböző cianobakteriális kivonatok három, részben eltérő ökológiai igényű zöldalga fajra (*Scenedesmus obtusus*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum* sp.) kifejtett hatásának vizsgálata zajlott, mely által közelebb szerettünk volna kerülni a CYN biológiai szerepének megértéséhez. Eredményeink sokrétűek, új, információkkal szolgálnak a tudomány számára. A dolgozat főbb eredményeit a 26. ábra foglalja össze.

A *S. obtusus* zöldalgára irányuló vizsgálataink során a faj cönóbiumszámában és foszfát-felvételének mértékében bekövetkezett változások mellett az alkalikus foszfatáz enzim termelésében bekövetkezett változásokra fókuszáltunk. Kutatásunk alapját Bar-Yosef

és munkatársainak (2010) eredményei adták. A kutatócsoport feltételezi, hogy a CYN termelő szervezet a toxin termelésével „kényszeríti" a fitoplankton többi tagját az alkalikus foszfatáz enzim termelésére, mely enzim által felszabadított ortofoszfátok a termelő sejt (cianobaktérium) számára is hozzáférhetővé válnak. Ezzel a stratégiával a CYN-termelő cianobaktériumok a fitoplankton közösség domináns tagjává válhatnak (Bar-Yosef et al., 2010). A *S. obtusus* esetében viszonylag magas toxin koncentrációkkal (1,0-2,5 μg ml^{-1}) dolgoztunk. Beállításra kerültek CYN-tartalmú (C+), nem CYN-tartalmú C− cianobakteriális kivonatokkal kezelt *S. obtusus* tenyészetek, valamint úgynevezett kiegészített kísérletek is összeállításra kerültek, mely kísérlettípusban a nem CYN-tartalmú kivonatot tisztított CYN-nal egészítettük ki (C−+C). A *S. obtusus* zöldalga tenyészetek növekedésének tendenciájban 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 azonban a jelenlévő fitoplankton foszfát felvételének mértékére fejt ki stimuláló hatást. Eredményeink

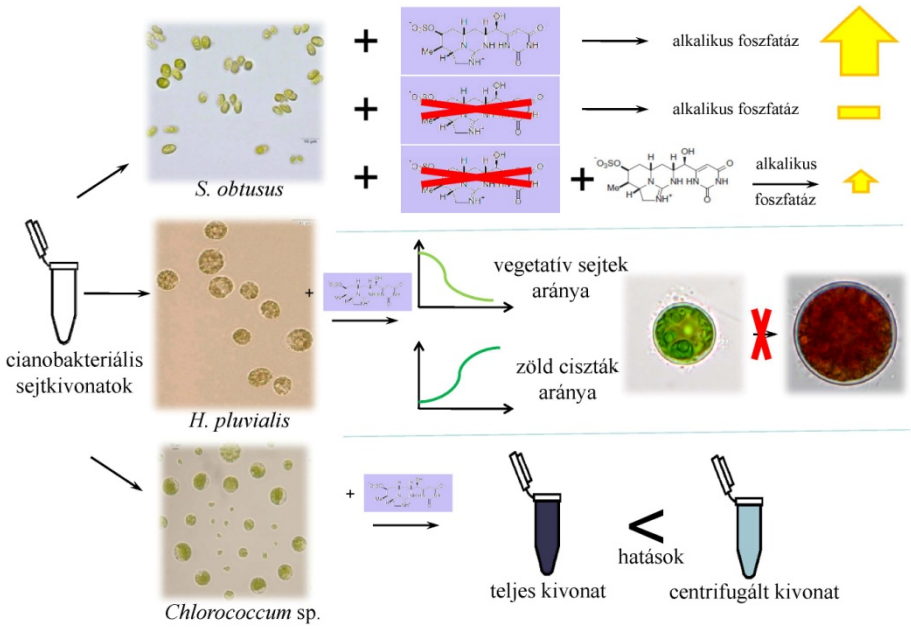
újszerűségét adja, hogy egy olyan zöldalga faj esetében is sikerült kimutatnunk a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonat hatására megnövekedett alkalikus foszfatáz enzim aktivitást, mely, ahogyan az fentebb olvasható, sem a toxin relatíve magas koncentrációjára, sem pedig a foszfát hiányra nem érzékeny. Azt, hogy a tapasztalt változásokban jelentős szerepe van a CYN-nak egyaránt alátámasztja a C− tenyészetekben a cönóbiumszám növekedés gátlásának elmaradása, sőt mi több a növekedés serkentése, illetve a foszfatáz-aktivitások szignifikáns növekedésének hiánya. A C−+C kísérleteink során tapasztalt növekedésgátlás hiánya, valamint a C+ tenyészetekhez viszonyított kismértékű foszfatáz aktivitás változásra vonatkozó eredményeink rámutatnak arra, hogy az egyes kezelésekben tapasztalt változások hátterében 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. (4.1. fejezet).

A *H. pluvialisra* irányuló vizsgálatainkban a legfőbb hangsúlyt a zöldalga sejtek morfológiájában és kitartóképlet képzésében bekövetkezett változásokra helyeztük. Tenyészeteinket CYN-tartalmú *C. ovalisporum* cianobakteriális kivonattal kezeltük, azonban *S. obtususnál* alkalmazott koncentrációknál jóval alacsonyabb koncentrációkkal dolgoztunk (0,025-0,5 μg ml^{-1} CYN). Kutatásunk aktualitását adta a cianotoxinok, s köztük a CYN fitoplankton fajok kitartóképlet képzésére és metabolit (jelen esetben színanyag) felhalmozására vonatkozó releváns szakirodalmi adatok hiánya. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a CYN-tartalmú cianobakteriális kivonatok indukálják a

cisztaképzést, ám gátolják az aplanospórák kialakulását, lassítva 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 (4.2. fejezet).

A *Chlorococcum* sp. zöldalga faj esetében a tenyészetekhez a zöldalga sejtszámmal azonos, valamint kétszeres és négyszeres *Chrysosporum ovalisporum* sejtszámmal megegyező mennyiségű teljes és centrifugált cianobakteriális sejtkivonatot adtunk. A fő hangsúly arra helyeződött, van-e különbség a teljes extracelluláris mátrixot tartalmazó és a csak vízoldható frakciót tartalmazó cianobakteriális kivonat *Chlorococcum* sp. zöldalgára kifejtett 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 kezelteknél. 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. tesztszervezettel végzett kísérleteinkben nem vizsgáltuk a CYN foszfatáz aktivitásra gyakorolt hatását, de a foszfát-felvétel dinamikáját igen. Számottevő hatás nem volt kimutatható, ami felveti, hogy a CYN foszfát-felvételre gyakorolt serkentő hatása nem tekinthető általános jelenségnek (4.3. fejezet).



26. ábra. A dolgozat legfőbb eredményeinek összefoglalása.

Jelen disszertáció új tudományos eredményekkel szolgál, mely hozzájárul a CYN biológiai szerepének megértéséhez. Egyrészt rámutat a CYN élő szervezetekben betöltött sokrétű szerepére, másrészt a

termelő sejtben jelenlévő egyéb metabolitok jelenlétének fontosságára a hatás kifejtésében (*S. obtusus*, *Chlorococcum* sp.). Megerősíti, hogy a CYN hozzájárul a fitoplankton alkalikus foszfatáz aktivitásának fokozódásához, mely jelenséget egy olyan zöldalga faj (*S. obtusus*) esetében is kimutattuk, mely nem érzékeny sem a toxin viszonylag magas koncentrációjára, sem pedig a foszfát hiányára. Vizsgálataink eredményei alátámasztják Bar-Yosef és munkatársai (2010) hipotézisét, miszerint a CYN egy olyan másodlagos anyagcseretermék, ami hatással van más szervezetek alkalikus foszfatáz szekréciójára, és így a CYN-termelő szervezet a fitoplankton közösség domináns tagjává válhat a vízvirágzások idején. Összevetve a kutatás eredményeit és a nemzetközi szakirodalmat azt mondhatjuk, hogy a toxin ill. maga a termelő sejt allelopatikus hatással bír a környezetében lévő algaközösség tagjaira, akár direkt akár indirekt módon kerül a toxin az extracelluláris térbe. A kutatómunka eredményei rávilágítanak arra, hogy a CYN nem csak az eukarióta algák növekedését, tápanyagfelvételét és enzimaktivitását befolyásolja, hanem hatással lehet a kitartó képletek képzésére, érési folyamataira (*H. pluvialis*). Nem utolsó sorban pedig az itt bemutatott eredmények rávilágítanak arra, mennyi megválaszolatlan kérdés merülhet fel a cianobaktériumok által termelt metabolitokkal, a cianotoxinokkal kapcsolatban.

6. SUMMARY

Cylindrospermopsin is the most well known and studied cyanotoxin after microcystins. Nonetheless, only few data are available about the effects and role of CYN in algal assemblages. The first cylindrospermopsin producer strains were reported from tropical and subtropical regions, but nowadays these strains show wide geogpraphical distribution, including temperate and arid areas (Poniedziałek et al., 2012; Mohamed és Al-Shehri, 2013). Their dispersion seems to be accelerated (Fastner et al., 2003; 2007; Quesada et al., 2006), therefore widespread and exact knowledge about the effects of CYN is necessary for the prevention and controll of toxic blooms.

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. The main goal was to get closer to the understanding of the biological role of CYN. Our complex results provide new informations for science.

In case of *Scenedesmus obtusus*, changes of growth, phosphate uptake and alkaline phosphatase enzym activity (APase) of the cultures were investigated. Our experiments based on the concept of Bar-Yosef et al. (2010), according to wich members of phytoplankton species are forced to APase secretion by CYN producer strains. The orthophosphate released by the enzyme become uptakable for the toxin producer cyanobacterial cells. CYN-producer strains could be dominant members

of algal assemblages with this strategy (Bar-Yosef et al., 2010). In case of *S. obtusus*, relatively high CYN concentrations (1,0 -2,5 μg ml^{-1}) were applied. *S. obtosus* cultures were treated with crude extract of CYN-producing (C+) and non-CYN producing (C−) cyanobacterial strains, futhermore with crude extract of non-CYN producing strain supplemented with purified CYN (C−+C). 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 producing cell) contribute to more intense phosphate uptake. Without the presence of the producer cyanobacterium, CYN induced the phosphate uptake of *S. obtusus.* Novelty of our results is that the C+ treatments induced alkaline phosphatase activity of *S. obtosus*, 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 C−+C treatments, 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* culures were not caused exclusively by CYN. These results suggest the presence of other metabolites in the CYN producing cell, which exert snyergistic effect to the effects of CYN. These metabolites are not present in the cellular matrix of the non-CYN producing strain (chapter 4.1.).

In case of *Haematococcus pluvialis*, changes of morphology and cyst formation of the green alga were investigated. *H. pluvialis* cultures were treated with crude extract of CYN-producing cyanobacterial strain. The applied toxin concentrations were lower (0.025-0.5 μg ml^{-1} CYN) than in case of *S. obtosus*. Lack of literature data about the effect of cyanotoxins (including CYN) on cyst formation and metabolite production of phytoplankton species gave the actuality of these experiments. Based on the results, CYN containing crude extract induced cysts formation, but inhibited the maturation of cysts, the accumulation of the red pigments. About phosphate metabolism, it can be said that 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. (chapter 4.2).

In case of *Chlorococcum* sp., cyanobacterial extracts (cell debris and cell debris-free extracts) were added in amounts containing the appropriate cell number of *C. ovalisporum* to reach 1:1; 1:2 and 1:4 ratios (relative to the inoculation cell number of *Chloroccum* sp.). The main emphasis was on the potential difference of the effects of cell debris containig and cell debris-free cyanobacterial crude extracts on the growth and phosphate uptake of *Chlorococcum* sp. 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 activitiy was not investigated, only the changes of dynamics of phosphate uptake. Significant effects on changes of phosphate uptake of *Chlorococcum* sp. cells were not observed. This suggested that stimulating effect of CYN on phosphate uptake can not be considered as a general phenomenon (chapter 4.3).

New scientific results of this PhD dissertation contribute to understanding the biological roles of CYN. On one hand, results highlighted various roles of CYN in living organisms, and on the other hand the importance of other metabolites beside CYN in the CYN producing cell (*S. obtosus*, *Chlorococcum* sp.). It was confirmed that CYN contributes to enhance the alkaline phosphatase activity of

phytoplankton, and this phenomenon was observed in case of an algal species (*S. obtosus*), which neither sensitive to the relatively high CYN concentration, nor to phosphate limitation. Our results comfirmed the concept of Bar Yosef et al. (2010) that a CYN as a secondary metabolite affects on secretion of alkaline phosphatase of other organisms, thus the CYN-producer cyanobacteria can become dominant member of algal assemblages under water bloom. Comparing the results of this investigation with data of the scientific literature suggests, that the toxin and producing cell itself have allelopathic effects on members of algal assemblages, either directly, or indirectly it gets to the environment. Our research also highlighted that CYN not only affects the growth, nutrient uptake and enzyme activity of eukaryotic algae, but also may affect the formation and maturation of cysts (*H. pluvialis*). Last but not least, these results showed that there are numeruos unanswered questions about metabolites such as cyanotoxins produced by cyanobacteria.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás szívvel köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bácsi Istvánnak a kutatás megtervezésében, kivitelezésében és a disszertáció elkészültében nyújtott pótolhatatlan segítségét. Az elmúlt évek során rengeteget tanulhattam tőle, tudása legjavát igyekezett átadni nekem. Szívből köszönöm neki azt, hogy utat mutatott és végigvezetett a tudomány sűrű erdejében. Köszönettel tartozom témavezetőm feleségének, Dr. B-Béres Viktóriának, aki számottevő segítséggel és tanáccsal szolgált a kutatómunkám során.

Köszönet illeti Kovácsné Gábor Anikót, a Hidrobiológiai Tanszék technikusát a laboratóriumi munka során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Köszönetet szeretnék mondani a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszék összes munkatársának, hogy itt készíthettem el disszertációmat. Külön köszönet illeti Gácsi Mónika és Szkibák Dorina szakdolgozókat a *H. pluvialisra* vonatkozó kísérletekben nyújtott segítségükért. Köszönettel tartozom a Növénytani Tanszék Farmakognóziai részleg jelenlegi és volt dolgozóinak (Dr. Vasas Gábor, Dr. Gonda Sándor, Riba Milán, Barna Erzsébet) a cianobaktérium törzsek, valamint a liofilizálás biztosításáért, a nagy mennyiségű biomassza centrifugálásában nyújtott közreműködésért.

Őszintén köszönöm mindazoknak, akik lelkesítettek és bíztattak, és a barátaimnak, hogy mindezek mellett a kellő időben mutatták meg nekem azt a bizonyos tükröt.

Végül, de nem utolsó sorban, végtelen hálával tartozom a családomnak, akik mindvégig mellettem álltak, támogattak és bíztattak a tanulmányaim és egész életem folyamán.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Akcaalan, R., Köker, L., Oğuz, A., Spoof, L., Meriluoto, J., Albay, M., 2014. First report of cylindrospermopsin production by two cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysosporum ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey. Toxins 6, 3173–3186.

Allen, M. M., 1984. Cyanobacterial cell inclusions. Annual Review of Microbiology 38, 1–25.

Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green algae. Physiologia Plantarum 100, 224–233.

Anderson, D. M., Wall, D., 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinofagellate blooms. Journal of Phycology. 14, 224–234.

Bácsi, I., Surányi, Gy., Gonda, S., Gyémánt, Gy., Vasas, G., 2011. Observation of sward destruction caused by irrigation with toxic *Microcystis* morphospecies containing water in Southern Hungary. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 86, 232–237.

Bácsi, I., Vasas, I., Surányi, Gy, M-Havas, M., Máthé, Cs., Tóth, E., Grigorszky, I., Gáspár, A., Tóth, S., Borbély, Gy., 2006. Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. FEMS Microbiology Letters 259, 303–310.

Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon*

ovalisporum (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. Journal of Phycology 33, 613–616.

Banker, R., Carmeli, S., Werman, B., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 2001. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. Journal of Toxicology and Environmental Health A 62(4), 281–288.

Barta, Zs., Felföldy L., Hajdú, L., Horváth, K., Kiss, K., Schmindt, A., Tamás, G., Uherkovich, G., Vörös, L., 1976. A zöldalgák (Chlorococcales) rendjének kihatározója (Vízügyi Hidrobiológia 4). Vízügyi Dokumentációs és Továbbképző Intézet, Budapest.

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.

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.

Belmonte, G., Castello, P., Piccinni, M. R., Quarta, S., Rubino, F., Boero, F., Geraci, S., Resting stages in marine sediments off the Italian coasts. In: Eleftheriou, A., Ansell, A. D., Smith, C. J. (Eds.), 1995. Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters. Olsen and Olsen, Fredensborg, 53–58.

Bernard, C., Harvey, M., Briand, J. F., Bire, R., Kyrs, S., Fontaine, J. J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis*

raciborskii strains, evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. Environmental Toxicology 18, 176–186.

Bittencourt-Oliveria, M. C., Chia, M. A., Camargo-Santos, D., Dias, C. T. S., 2016. The effect of saxitoxin and non-saxiton extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on cyanobacteria and green microalgae. Journal of Applied Phycology 28, 241–250.

Bittencourt-Oliveria, M. C., Chia, M. A., Oliveria, H. S. B., Araújó, M. K. C., Molica, R. J. R., Dias, C. T. S., 2015. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: implication for microcystins production. Journal of Applied Phycology 27, 275–284.

Bláhová, L., Babica, P., Adamovsky, O., Kohoutek, J., Maršálek, B., Bláha, L., 2008. Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. Environmental Chemistry Letter. 6, 223–227.

Blas, X. P., Filella, J. B., Strömberg, C., Tomás, I. S., Buckland, P., Serieyssol, K. K., Plaza, J. B., Aranda, A. A., Lozar, F., Stevenson, T., Lorenzo, L. C., Ditchfield, P., 2016. The utility of livestock dung for reconstructing recent ethnological and environmental histories. Environmental Archaelogy 22(2), 128–146.

Bogially, S., Bruno, M., Curini, R., Di Corcia, A., Fanali, C., Laganà, A., 2006. Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Environmental Science and Technology 40, 2917–2923.

Bohunická, M., Mareš, J., Hrouzek, P., Urajová, P., Lukeš, M., Šmarda, J., Komárek, J., Gaysina, L. A., Sturnecky, O., 2015. A combined morphological, ultrastructural, molecular, and biochemical study of the peculiar family Gomontiellaceae (Oscillatoriales) reveals a new cylindrospermopsin-producing clade of cyanobacteria. Journal of Phycology 51(6), 1040–1054.

Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R., Ballottari, M., 2012. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. Journal of Biological Chemistry 287, 5833–5847.

Boo, Y. C., Jung, J., 1999. Water deficit-induced oxidative stress and antioxidant defenses in rice plants. Journal of Plant Physiology. 155, 255–261.

Boussiba, S., 2002. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. Physiologia Plantarum 108(2), 111–117.

Boussiba, S., Vonshak, A., 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiology 32, 1077–1082.

Boussiba, S., Vonshak, A., 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis.* Methods in Enzymology 213, 386–391.

Bowen, I. D., Bryant, J. A., 1978. The fine structural localization of pnitrophenyl phosphatase activity in the storage cells of pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons. Protoplasma 97, 241–250.

Briand, J. F., Leboulanger, C., Humbert, J. F., Bernard, C., Dufour, P., 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at

mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? Journal of Phycology 40, 231–238.

Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J., 2009. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. Environmental Toxicology 24, 415–420.

Burchardt, L., Balcerkiewicz, S., Kokocinski, M., Samardakiewicz, S., Adamski, Z., 2006. Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the collegium biologicum in Poznan (Poland). Biodiversity: Research and Conservation 1, 163–166.

Burkholder, J. M., Glasgow, H. B. Jr., 1995. Interactions of a toxic estuarine dinofagellate with microbial predators and prey. Arch. Protistenk. 145, 177–188.

Byth, S,. 1980. Palm Island mystery disease. Medical Journal of Australia 2, 40–42.

Campos, A., Araújó, 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.

Carmichael, W. W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Scientific American 270, 78–86.

Cartmell, C., Evans, D. M., Elwood, J. M. L., Fituri, H. S., Murphy, P. J., Casparib, T., Poniedziałek, B., Rzymski, P., 2017. Synthetic

analogues of cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and their toxicological activity. Toxicoloy in Vitro 44, 172–181.

CCAP Media Recipes (n.d.) Available online: http://www.ccap.ac.uk/media/documents/JM.pdf

Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J., 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorus-compounds as nutrients by eukaryotic microalgae—a multidisciplinary perspective. Critical Reviews in Microbiology 11, 13–81.

Cheloni, G., Slaveykova, V., 2018. Photo-oxidative stress in green algae and cyanobacteria. Reactive oxygen species 5(14), 126–133.

Chiswell, R. K., Shaw, G. R., Eaglesham, G., Smith, M. J., Norris, K. R., Seawright, A. A., Moore, M. R., 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature and sunlight on decomposition. Environmental Toxicology 14, 155–161.

Chong, M. W. K., Wong, B. S. F., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., Seawright, A. A., 2002. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. Toxicon 40, 205–211.

Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water— A Guide to their Public.

Cirés, S., Wörmer, L., Timón, J., Wiedner, C., Quesada, A., 2011. Cylindrospermopsin production and release by the potentially invasive cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* under temperature and light gradients. Harmful Algae 10, 668–675.

Czygan, F. C., 1970. Blood-rain and blood-snow: nitrogendefiient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis*. Archiv für Mikrobiologie 74, 69–76.

Dale B., 1983. Dinoflagellate resting cysts: “benthic plankton”. In: Fryxell, G. A. (ed) Survival strategies of the algae. Cambridge University Press, Cambridge. 69–136.

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.

Dobronoki, D., B-Béres, V., Vasas, G., Rektor, A., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2014. A cilindrospermopszin cianobaktérium—alga interakcióban betöltött lehetséges szerepének vizsgálata. Hidrológiai Közlöny 94, 31–34.

DuBois, J. D., Roberts, K. R., Kapustka, L. A., 1984. Polyphosphate body and acid phosphatase localization in *Nostoc* sp. Canadian Journal of Microbiology 30, 8–15.

Dyhrman, S. T., 2016. Nutrients and their acquisition: phosphorus physiology in microalgae. In: Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J., (eds): The physiology of microalgae. Springer, Cham, 155–183.

Dziga, D., Kokocinski, M., Maksylewicz, A., Czaja-Prokop, U., Barylski, J., 2016. Cylindrospermopsin biodegradation abilities of *Aeromonas* sp. isolated from Rusałka Lake. Toxins 8, 55.

Ehling-Schulz, M., Scherer, S., 1999. UV protection in cyanobacteria. European Journal of Phycology 34(4), 329–338.

Elliot, A. M., 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. Archiv für Protistenkunde 82, 250–272.

Engelke, C. J., Lawton, L. A., Jaspars, M., 2003. Elevated microcystin and nodularin levels in cyanobacteria growing in spent medium of *Planktothrix agardhii*. Archive für Hydrobiologie 158, 541–550.

Ettl, H., 1988. About definitions of asexual reproductive cells in green algae (Chlorophyta). Archiv für Protistenkunde 135, 17–34.

Everson, S., Fabbro, L., Kinnear, S., Eaglesham, G., Wright, P., 2009. Distribution of the cyanobacterial toxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin in a stratified lake in north-eastern New South Wales, Australia. Marine and Freshwater Research 60, 25–33.

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.

Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A. R., Mischke, U., Eaglesham, G. K., Chorus, I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. Toxicon 42, 313–321.

Fastner, J., Rücker, J., Stüken, A., Preußel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Köhler, A., Wiedner, C., 2007. Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in Northeast Germany. Environmental Toxicology 22, 26–32.

Felföldy, L., 1987. A biológiai vízminősítés (4. kiad.). In: Vízügyi Hidrobiológia 16. VGI, Budapest, Magyarország.

Ferreira, V. S., Pinto, R. F., Sant'Anna, C., 2016. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. Journal of Applied Microbiology 120, 661–670.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Oat, J. F., Scott, I. M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiologia Plantarum 100, 241–254.

Freitas, M., Azevodo, J., Pinto, E., Neves, J., Campos, A., Vasconcelos, V., 2015. Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/ cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety 116, 59–67.

Froscio, S. M., Cannon, E., Lau, H. M., Humpage, A. R., 2009. Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. Toxicon 54, 862–868.

Froscio, S. M., Humpage, A. R., Burcham, P. C., Falconer, I. R., 2001. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. Environmental Toxicology 16(5), 408–412.

Froscio, S. M., Humpage, A., R., Burcham, P. C., Falconer, I. R., 2003. Cylindrospermopsin induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environmental Toxicology 18, 243–251.

Froscio, S. M., Humpage, A. R., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I. R., 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. Toxicon 51(2), 191–198.

Grobbelaar, J. U., 2004. Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, A., (ed): Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Publishing, Oxford, 97–115.

Grobbelaar, J. U., 2013. Inorganic algal nutrition. In: Richmond, A., Hu, Q., (eds): Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 2nd edn. Wiley, Chichester, 123–133.

Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus* ASTA: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology 21, 210–216.

Guiry, M. D., Guriy, G. M., AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. Available online: http://www.algaebase.org (accessed on 22 Januar 2020).

Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Jos, A., Cameán, A. M., 2011. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 1567–1572.

Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Jos, Á., Moreno, F. J., Cameán, A. M., 2012. Alterations observed in the endothelial HUVEC cell line exposed to pure cylindrospermopsin. Chemosphere 89, 1151–1160.

Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Jos, Á., Moreno, F. J., Cameán, A. M., 2012. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. Water Research 46, 1566–1575.

Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Rřberg, K., Skulberg, R., Beck, M., Wiedner, C., 2008. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. Harmful Algae 7, 692–701.

Hagen, C., Braune, W., Björn, L. O., 1994. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). III. Action as a ‘‘ sunshade’’. Journal of Phycology 30, 241–248.

Hagen, C., Braune, W., Birckner, E., Nuske, J., 1993a. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). I. The accumulation period as an active metabolic process. New Phytologist 125, 625–633.

Hagen, C., Braune, W., Greulich, F., 1993b. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). IV. Protection from photodynamic damage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 20, 153–160.

Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W., 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. European Journal Phycology 37, 217–226.

Hairston, N. G. Jr., Ellner, S., Kearns, C. M., 1996. Overlapping generations: the storage effect and the main- tenance of biotic diversity. In Population dynamics in ecological space and time (ed. O. E. J. Rhodes, R. K. Chesser és M. H. Smith). University of Chicago Press, 109–145.

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.

Harada, K. I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Watanabe, M., Terao, K., 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32, 73–84.

Harwati, T. U., Willke, T., Vorlop, K. D., 2012. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. Bioresource Technology 121, 54–60.

Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H., 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. Joural of Applied Phycology 13, 395–402.

Hazen, T. E., 1899. The life history of *Sphaerella lacustris*. Memoirs the Torrey Botanical Club 6, 211–244.

He, P., Duncan, J., Barber, J., 2007. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of cultivation parameters. Journal of Integrative Plant Biology 49(4), 447-451.

He, Q., Yang, H., Wua, L, Hua, C., 2015. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid

accumulation in oleaginous microalgae. Bioresource Technology 191, 219–228.

He, Y. Y., Häder, D. P., 2002. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 66, 115–124.

Hecky, R. E., Kilham, P., 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine enviroments: A review of recent evidence of the effects of enrichment. Limnology and Oceanography 33, 796-822.

Holzinger, A., Lütz, C., 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. Micron 37(3), 190–207.

Hudson, J. J., 2000; Taylor, W. D., Schindler, D. W., 2000. Phosphate concentration in lakes. Nature 406(6791), 54-56.

Humpage, A. R., Falconer, I. R., 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. Environmental Toxicology 18, 94–103.

Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I. R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and 35 aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Mutation Research 472, 155–161.

Humpage, A. R., Fontaine, F., Froscio, S., Burcham, P., Falconer, I. R., 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 68, 739–753.

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.

John, D. M., Whitton, B. A., Brook, A. J. (eds.), 2002. The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. CambridgeUniversity Press, Cambridge, UK.

Kinnear, S., 2010. Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research. Marine Drugs 8, 542–564.

Kearns, K. D., Hunter, M. D., 2002. Algal extracellular products suppress *Anabaena flosaquae* heterocyst spacing. Microbial Ecology 43, 174–180.

Keating, K. I., 1977. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophiclake. Science 196, 885–8

Klochkova, T. A., Kang, S-H., Cho, G. Y., Pueschel, C. M., West, J. A., Kim, G. H., 2006. Biology of a terrestrial green alga, *Chlorococcum* sp. (Chlorococcales, Chlorophyta), collected from the Miruksazi stupa in Korea. Phycology 45(3), 349–358.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S., 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetateinduced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. Applied Environmental Microbiology 59, 867–873.

Kokcinski, M., Dziga, D., Spoof, L., Stefaniak, K., Jurczak, T., Mankievicz-Boczek, J., Meriluoto, J., 2009. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. Chemosphere 74, 669–675.

Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J. R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia 86, 295–335.

Kristiansen, J., 2008. Dispersal and biogeography of silica-scaled chrysophytes. Biodiversity and Conservation, 17, 410–426.

Kroes, H. W., 1971. Growth interactions between *Chlamydomonas globos*a Snow and *Chlorococcum ellipsoideum* Deason and Bold under different experimental conditios, with special attention to the role of pI-L. Limnology and Oceanography 16, 869–879.

Kruskopf, M. M., Du Plessis, S., 2004. Induction of both acid and alkaline phosphatase activity in two green-algae (Chlorophyceae) in low N and P concentrations. Hydrobiologia 513, 59–70

Kuenzler, E. J., 1965. Glucose-6-phosphate utilization by marine algae. Journal of Phycology 1, 156–164.

Kuenzler, E. J., Perras, J. P., 1965. Phosphatases of marine algae. The Biological Bulletin 128, 271–284.

Kuhl, A., 1974. Phosphorus. In: Stewart, W., (ed): Algal physiology and biochemistry. Blackwell Scientific, Oxford, 636–654.

Lampert, W., 1995. Egg bank investment. Nature 377, 479–480.

Leflaive, J., Ten-Hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites infreshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. Freshwater Biology 52, 199–214.

Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, F. O., Granéli, E., 2003. Allelopathy inphytoplankton – biochemical, ecological and evolutionary aspects. Phycologia 42, 406–419.

Li, R., Carmichael, W. W., Brittain, S., Eaglesham, G. K., Shaw, G. R., Liu, Y., Watanabe, M. M., 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). Journal Phycology, 37, 1121–1126.

Liebel, S., Oliveria Ribeiro, C. A., Silva, R. C., Ramsdorf, W. A., Cestari, M. M., Magalhaes, V. F., Garcia, J. R. E., Esquivel, B. M., Filipak Neto, F., 2011. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. Toxicology in Vitro 25, 1493–1500.

Lindsay, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A., 2006. Protection against the toxicity of microcystinLR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pretreatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). Toxicon 48, 995–1001.

Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F., 1999. Antioxidative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiology 199, 1091–1099.

López-Alonso, H., Rubiolo, J. A., Vega, F., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2013. Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes. Chemical Research in Toxicology 26, 203–212.

Low, P. S., Merida, J. R., 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. Physiologia Plantarum 96, 533–542.

Mandl, J., 2002. Biotranszformáció méregtelenítés. In: Ádám V, (ed) Orvosi Biokémia, 4th edn. Semmelweis Kiadó, Budapest, 368–377.

Mazmouz, R.; Chapuis-Hugon, F.; Mann, S.; Pichon, V.; Mejean, A.; Ploux, O., 2010. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: Identification of the cyr gene cluster and toxin analysis. Applied Environmental Microbiology 76, 4943–4949.

McGregor, G. B., Sendall, B. C., Hunt, L. T., Eaglesham, G. F., 2011. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). Harmful Algae 10, 402–410.

Metcalft, J. S., Barakate, A., Codd, G. A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. FEMS Microbiology Letters 235, 125–129.

Mohamed, Z. A., Al-Sheri, A. M., 2013. Assessment of cylindrospermopsin toxin in an arid Saudi lake containing dense cyanobacterial bloom. Environmental Monitoring and Assessment 185(3), 2157–2166.

MSZ EN ISO 6878, 2004. Water quality. Determination of phosphorus. Ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878:2004).

Moudřiková, S., Sadowsky, A., Metzger, S., Nedbal, L., Mettler-Altmann, T., Mojzeš, P., 2017. Quantification of polyphosphate in microalgae by Raman microscopy and by a reference enzymatic assay. Analytical Chemistry 89, 12006–12013.

Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M., Tominaga N 2006. Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. Plant Science 170, 307–313.

Norris, R. L. , Eaglesham, G. K., Pierens, G., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., Seawright, A. A., Moore, M. R.,. R., 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. Environmental Toxicology 14(1), 163–165.

Nybom, S. M., Salminen, S. J., Meriluoto, J. A., 2008. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. Toxicon 52, 214–220.

OECD (2005). Emerging Risks to Water Supplies: Best Practice for Improved Management and Preparedness to Protect Public Health. Available online: http://www.oecd.org (accessed on 22 Januar 2016).

Ohta, S., Chang, T., Ikegami, N., Kondo, M., Miyata, H., 1993. Antibiotic substance produced by a newly isolated marine microalga, *Chlorococcum* HS-101. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 50, 171–178.

Ohtani, I., Moore, R. E., Runnegar, M. T. C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. Journal of the American Chemical Society 114, 7941–7942.

O'Neil, J., David, T. W., Burford, M. A., Gobler, C. J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae 14, 313–334.

Paerl, H. W., 1982. Factors limiting productivity of freshwater ecosystems. Advances in Microbial Ecology 6, 75–110

Pati, A. C., Belmonte, G., 2003. Disinfection efficacy on cyst viability of *Artemia francis-cana* (Crustacea), *Hexarthra fennica* (Rotifera), and *Fabrea salina* (Ciliophora). Marine Biology 142, 895–904

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. Marine Drugs 8(5), 1650–1680.

Pichardo, S., Devesa, V., Puerto, M., Vélez, D., Cameán, A. M., 2017. Intestinal transport of cylindrospermopsin using the Caco-2 cell line. Toxicology in Vitro 38, 142–149.

Pierto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, C., 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 1973–1980.

Pinheiro, C., Azvedo, J., Campos, A., Loureiro, S., Vasconcelos, V., 2013. Absence of negative allelopathic effects of

cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. Hydrobiologia 705, 27–42.

Poniedziałek, B., Rzymski, P., Karczewski, J., 2015. The role of the enzymatic antioxidant system in cylindrospermopsin-induced toxicity in human lymphocytes. Toxicology in Vitro 29, 926–932

Poniedziałek, B., Rzymski, P., Kokocinski, M., 2012. Cylindrospermopsin: Water-linked potential threat to human health in Europe. Environmental Toxicology and Pharmacology 34, 651–660.

Poniedziałek, B., Rzymski, P., Wiktorowicz, K., 2012. First report of cylindrospermopsin effect on human peripheral blood lymphocytes proliferation in vitro. Central European Journal of Immunology 37, 314–317.

Poniedziałek, B., Rzymski, P., Wiktorowicz, K., 2014. Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: proliferation, viability and cell cycle studies. Toxicology in Vitro 28, 968–974.

Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., Pratt, S., 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. Water Research 43, 4207–4213.

Powell, N., Shilton, A. N., Pratt, S., Chisti, Y., 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. Environmental Science & Technology 42, 5958–5962.

Preußel, K., Stuken, A., Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J., 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon 47, 156–162.

Preußel, K., Wessel, G., Fastner, J., Chorus, I., 2008. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. Harmful Algae 8(5), 645–650.

Pringsheim, E. G., 1966. Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and Related species. Journal of Phycology 2, 1–7.

Proctor, V.W. 1957. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. Ecology 38(3), 457-462.

Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniaguta, T., Wormer, L., de Hoyos, C., Sukenik, A., 2006. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. European Journal of Phycology 41, 39–45.

Recht, L., Töpfer, N., Batushansky, A., Sikron, N., Gibon, Y., Fait, A., Nikoloski, Z., Boussiba, S., Zarka, A., 2014. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen-starvation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biological Chemistry 289, 30387–30403.

Recht, L., Zarka, A., Boussiba, S., 2012. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 94, 1495–1503.

Redfield, A. C., 1934. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. Liverpool: James Johnstone Memorial Volume. 176–192.

Rengefors, K., Anderson, D. M., 1998. Environmental and endogenous regulation of cyst germination in two freshwater dinofagellates. Journal of Phycology 34(4), 568–577.

Rengefors, K., Anderson, D. M., Pettersson, K., 1996. Phosphorus uptake by resting cysts of the marine dinofagel- late *Scrippsiella trochoidea*. Journalof Plankton Research 18, 1753–1765.

Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2012. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. Journal of Plankton Research 24, 415-428.

Rhee, G., 1973. A countinuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. Journal of Phycology 9(4), 495–506.

Rogers, E. H., Zehr, R. D., Gage, M. I., Humpage, A. R., Falconer, I. R., Marr, M., Chernoff, N., 2007. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. Toxicon 49, 855–864.

Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., Lu, S. C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterialalkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. Biochemical Pharmacology 49, 219–225.

Rücker, J., Stüken, A., Noxforf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. Toxicon 50, 800–809.

Rymuszka, A., Sieroslawska, A., 2014. Cylindrospermopsin induces oxidative stress and genotoxic effects in the fish CLC cell line. Journal of Applied Toxicology 35, 426–433.

Rzymski, P., Poniedziałek, B., 2014. In search of environmental role of cylindrospermopsin: A review on global distribution and ecology of its producers. Water Research 66, 320-367.

Rzymski, P., Poniedziałek, B., Kokociński, M., Jurczak, T., Lipski, D., Wiktorowicz, K., 2014. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: Cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. Harmful Algae 35, 1–8.

Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., Murray, P., 2013. Effect of various stressregulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology 128, 118–124.

Saker, M. L., Griffith, D. J., 2000. Effects of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. Phycologia 39, 349–354.

Saker, M. L., Nogueira, I. C. G., Vasconcelos, V. M., Neilan, B. A., Eaglesham, G. H., Pereira, P., 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. Ecotoxicology and Environment Safety 55, 243–250.

Santos, M. F., Mesquita, J. F., 1984. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. Cytologia 49, 215–228.

Schembri, M. A., Neilan, B. A., Saint, C. P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Environmental Toxicology 16, 413–421.

Schindler, D. W., 1977. Evolution of Phosphorus Limitation in Lakes. Science 195(4275), 260-262.

Schreiber, C., Schiedung, H., Harrison, L., Briese, C., Ackermann, B., Kant, J., Schrey, S. D., Hofmann, D., Singh, D., Ebenhöh, O., Amelung, W., Schurr, U., Mettler-Altmann, T., Huber, G., Jablonowski, N. D, Nedbal, L., 2018. Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants. Journal of Applied Phycology 30, 2827–2836.

Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., Shaw, G., 2007. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. Harmful Algae 6, 73–80.

Senogles, P. J., Scott, J. A., Shaw, G., Stratton, H., 2001. Photocatalytic degradation of the cyanotoxin cylindrospermopsin, using titanium dioxide and UV irradiation. Water Research 35(5), 1245–1255.

Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R., Eaglesham, G., 2000. Degradation of the cyanobacterial

toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. Toxicon 38(9), 1203–1213.

Sergeeva, E., Liaaimer, A., Bergman, B., 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cianobacteria. Planta 215, 229–238.

Shalev-Alon, G., Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R., Kaplan, A., 2002. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. FEMS Microbiology Letters 209, 87–91.

Shalev-Malul, G., Lieman-Hurwitz, J., Viner-Mozzini, Y., Sukenik, A., Gaathon, A., Lebendiker, M., Kaplan, A., 2008. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. Environmental Microbiology 10, 988–999.

Shaw, G. R., Seawright, A. A., Moore, M. R., Lam, P. K. S. 2000- Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. Therapeutic Drug Monitoring 22, 89-92.

Shah, M. M., Liang, Y., Cheng, J. J., Daroch M., 2016. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. Frontiers in Plant Science 7, 1–28.

Shen, X., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., Wickramasinghe, W., 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Toxicon 40, 1499–1501.

Sies, H., 2018. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. Current Opinion in Toxicology 7, 122–126.

Sieroslawska, A., Rymuszka, A., 2015. Cylindrospermopsin induces oxidative stress and genotoxic effects in the fish CLC cell line. Journal of Applied Toxicology 35, 426–433.

Spoof, L., Berg, K. A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalft, J. S., Codd, G. A., Meriluoto, J., 2006. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). Environmental Toxicology 21, 552–560.

Stirk, W. A., Ördög, V., Van Staden, J., Jäger, K., 2002. Cytokinin- and auxin-like activicy in cyanophyta and microalgae. Journal of Applied Phycology 14, 215–221.

Stoiber, T. L., Shafer, M. M., Armstrong, D. E., 2011. Induction of reactive oxygen species in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. Environmental Toxicology 28, 516-523.

Štraser, A., Filipič, M., Gorenc, I., Žegura, B., 2013. The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells. Chemosphere 92, 24–30.

Suseela, M. R., Toppo, K., 2006. *Haematococcus pluvialis*—a green alga, richest natural source of astaxanthin. Current Science. 90, 1602–1603.

Takamo, K., Igarashi, S., Mikami, H., Hino, S., 2003. Causation of reversal simultaneity for diatom biomass and density of

*Phormidium tenu*e during the warm season in eutrophic Lake Barato, Japan. Limnology 4, 73–78.

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.

Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M. F., Harada, K. I., Ito, E., Watanabe, M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from the blue-green alga *Umezakia natans*. Toxicon 32, 833–844.

Torzillo, G., Goksan, T., Faraloni, C., Kopecky, J., Masojidek, J., 2003. Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. Journal of Applied Phycology. 15, 127–136.

Törökné, A., Asztalos, M., Bánkiné, M., Bickel, H., Borbély, G., Carmeli, S., Codd, G. A., Fastner, J., Huang, Q., Humpage, A., Metcalf, J. S., Rábai, E., Sukenik, A., Surányi, G, Vasas, G., Weiszfeiler, V., 2004. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. Analytical Biochemistry 332, 280–284.

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.

Tsujino, M., Kamiyama, T., Uchida, T., Yamaguchi, M., Itakura, S., 2002. Abundance and germination capability of restingcysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) from fecalpellets of macrobenthic organisms. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 271, 1–7.

Vardi, A. D., Schatz, K., Beeri, U., Motro, A., Sukenik, A., Levine, A., Kaplan, A., 2002. Dinoflagellate-Cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. Current Biology 12, 1767–1772.

Vasas, G., Surányi, Gy., Bácsi, I., M-Hamvas, M., Máthé, Cs., Gonda, S., Borbely, G., 2013. Alteration of cylindrospermopsin content of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria, Nostocales) due to step-down from combined nitrogen to dinitrogen. Advances in Microbiology 3(8), 557–564.

Vasas, G., Surányi, G., Máthé, C., M-Hamvas, M., Borvély, G., 2010. Investigation of toxin content in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wołoszyńska) Seenaya and Subba Raju and *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) strains isolated from shallow lakes of Hungary. Acta Biologica Hungarica 61, 218–225.

Vehovszky, Á., Kovács, A. W., Farkas, A., Győri, J., Szabó, H., Vasas, G., 2013. Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloomforming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary. Environmental Toxicology 30, 501–512.

Weckx, J. E. J., Clijsters, H., 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of

root assimilation of toxic amounts of copper. Physiologia Plantarum 96, 506–512.

Woloszynska, J., 1912. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Plankton. Bulletin International de l'Academie des Sciences de Cracovie Ser B. 6, 649–709.

Wormer, L., Cireés, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2008. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. Harmful Algae 7(2), 206–213.

Yilmaz, M., Phlips, E. J., Szabo, N. J., Badylak, S., 2008. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. Toxicon 51, 130–139.

Yin, M. Y., J. G. Liu, J. P. Zhang, and Z. C. Meng. 2007. The effect of phosphate on cell growth and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Oceanol. Limnol. Sin. 37:249–25.

Yoo, J. J., Choi, S. P., Kim, B. W., Sim, S. J., 2012. Optimal design of scalable photobioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. Bioprocessy and Biosystems Enineering 35, 309–315.

Yu, X., Chen, L., Zhang, W., 2015. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. Frontiers in Microbiology 6–56.

Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L., Wang, X., 2005. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. Critical Reviews in Microbiology 31(2), 79–89.

Zapomelová, E., Skaácelová, O., Pumann, P., Kopp, R., Janecek, E., 2012. Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). Hydrobiologia 698, 353–365.

Zar, J. H., 1996. Biostatistical Analysis, 3rd ed. Prentice-Hall International, NJ, USA.

Zhang, D. H., Lee, Y. K., Ng., M. L., Phang, S. M., 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. Journal of Applied Phycology 9(2), 147–155.

Zhang, W., Jeppensen, E., Wang, M., Xu, Z., Wang, L., 2017. Allelopathic effect boots *Chrysosporum 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.

9. FÜGGELÉK

1. függelék. A különböző *H. pluvialis* tenyészetekben a nevelési idő adott napjain számolt zöld vegetatív sejtek közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F1a. táblázat. Kontroll

Kontroll	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**0,002**	0,679
2. nap		0,986	0,922	1,000	0,102
4. nap			1,000	0,963	**0,018**
7. nap				0,859	**0,007**
9. nap					0,147

F1b. táblázat. 0,025 C+

0,025 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	0,368	**0,001**	**0,007**	**0,045**	0,069
2. nap		0,280	0,574	0,922	0,963
4. nap			0,996	0,859	0,777
7. nap				0,986	0,963
9. nap					1

F1c. táblázat. 0,05 C+

0,05 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		1,000	1,000	1,000	1,000
4. nap			1,000	1,000	1,000
7. nap				1,000	1,000
9. nap					1,000

F1d. táblázat. 0,1 C+

0,1 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	**0,045**	0,069	**0,004**	0,986
2. nap		0,206	0,147	0,679	**<0,001**
4. nap			1,000	0,963	**0,007**
7. nap				0,922	**0,011**
9. nap					**<0,001**

F1e. táblázat. 0,5 C+

0,5 CYN	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	0,147	0,986	0,996	1,000	0,996
2. nap		**0,029**	**0,045**	0,280	**0,045**
4. nap			1,000	0,922	1,000
7. nap				0,963	1,000
9. nap					0,963

F1f. táblázat. P-éhezés

P-éhezés	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**0,011**	0,102	0,963	0,679	**<0,001**
2. nap		0,963	0,102	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			0,468	**0,001**	**<0,001**
7. nap				0,206	**<0,001**
9. nap					**<0,001**

F1g. táblázat. Indukció

Indukált	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	1,000	0,029	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**0,011**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				**0,001**	**<0,001**
9. nap					0,963

2. *függelék.* A nevelési idő adott napjain az egyes *H. pluvialis* tenyészetek zöld vegetatív sejtszámai közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F2a. táblázat. 0. nap

0. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,656	1,000	0,982	0,844	0,999	0,911
0,025 C+		0,757	0,187	1,000	0,911	0,090
0,05 C+			0,956	0,911	1,000	0,844
0,1 C+				0,343	0,844	1,000
0,5 C+					0,982	0,187
P-éhezés						0,656

F2b. táblázat. 2. nap

2. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	0,995
0,025 C+		0,982	0,982	1,000	1,000	1,000
0,05 C+			1,000	0,995	0,999	0,956
0,1 C+				0,995	0,999	0,956
0,5 C+					1,000	1,000
P-éhezés						0,999

F2c. táblázat. 4. nap

4. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,956	1,000	0,131	**0,002**	0,656	**<0,001**
0,025 C+		0,956	**0,009**	**<0,001**	0,131	**<0,001**
0,05 C+			0,131	**0,002**	0,656	**<0,001**
0,1 C+				0,757	0,956	0,059
0,5 C+					0,187	0,757
P-éhezés						**0,003**

F2d. táblázat. 7. nap

7. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	1,000	0,995	**0,038**	**0,001**	**0,005**	**<0,001**
0,025 C+		0,982	**0,024**	**<0,001**	**0,003**	**<0,001**
0,05 C+			0,187	**0,009**	**0,038**	**<0,001**
0,1 C+				0,911	0,995	**<0,001**
0,5 C+					0,999	**<0,001**
P-éhezés						**<0,001**

F2e. táblázat. 9. nap

9. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,995	0,999	0,956	0,257	**<0,001**	**<0,001**
0,025 C+		1,000	0,656	0,059	**<0,001**	**<0,001**
0,05 C+			0,757	0,090	**<0,001**	**<0,001**
0,1 C+				0,844	**0,003**	**<0,001**
0,5 C+					0,131	**<0,001**
P-éhezés						**<0,001**

F2f. táblázat. 12. nap

12. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	Péhezés	Indukált
Kontroll	0,059	**0,038**	**0,059**	0,995	**<0,001**	**<0,001**
0,025 C+		1,000	**<0,001**	**0,009**	**<0,001**	**<0,001**
0,05 C+			**<0,001**	**0,005**	**<0,001**	**<0,001**
0,1 C+				0,257	**<0,001**	**<0,001**
0,5 C+					**<0,001**	**<0,001**
P-éhezés						0,911

3. *függelék.* A különböző *H. pluvialis* tenyészetekben a nevelési idő adott napjain számolt zöld ciszták száma közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F3a. táblázat. Kontroll

Kontroll	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**0,008**
2. nap		0,937	0,323	0,781	0,872
4. nap			0,872	0,999	0,323
7. nap				0,975	**0,025**
9. nap					0,160

F3b. táblázat. 0,025 C+

0,025 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	0,232	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		0,106	**0,025**	**0,025**	**0,025**
4. nap			0,993	0,993	0,993
7. nap				1,000	1,000
9. nap					1,000

F3c. táblázat. 0,05 C+

0,05 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		0,993	1,000	0,993	0,160
4. nap			0,975	0,872	**0,042**
7. nap				0,999	0,232
9. nap					0,431

F3d. táblázat. 0,1 C+

0,1 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	**0,003**	**0,008**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		0,323	0,160	0,937	0,999
4. nap			0,999	0,872	0,550
7. nap				0,670	0,323
9. nap					0,993

F3e. táblázat. 0,5 C+

0,5 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**0,068**	0,975	1,000	0,993	**<0,001**
2. nap		**0,008**	**0,042**	0,232	0,431
4. nap			0,993	0,781	**<0,001**
7. nap				0,975	**<0,001**
9. nap					**0,001**

F3f. táblázat. P-éhezés

P-éhezés	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**0,003**	**0,003**	**0,005**	**0,015**	1,000
2. nap		1,000	1,000	0,993	**0,003**
4. nap			1,000	0,993	**0,003**
7. nap				0,999	**0,005**
9. nap					**0,015**

F3g. táblázat. Indukció

Indukált	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**<0,001**	0,106	0,323	**0,001**	**<0,001**
2. nap		**0,068**	**0,015**	0,781	0,993
4. nap			0,993	0,670	0,232
7. nap				0,323	**0,068**
9. nap					0,975

4. függelék. A nevelési idő adott napjain az egyes *H. pluvialis* tenyészetek zöld ciszta számai közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F4a. táblázat. 0. nap

0. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,509	1,000	0,966	0,749	0,998	0,848
0,025 C+		0,632	0,088	1,000	0,848	**0,033**
0,05 C+			0,921	0,848	1,000	0,749
0,1 C+				0,202	0,749	1,000
0,5 C+					0,966	0,088
P-éhezés						0,509

F4b. táblázat. 2. nap

2. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998
0,025 C+		0,966	0,966	1,000	1,000	1,000
0,05 C+			1,000	0,989	0,998	0,966
0,1 C+				0,989	0,998	0,966
0,5 C+					1,000	1,000
P-éhezés						1,000

F4c. táblázat. 4. nap

4. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,921	0,921	0,136	**<0,001**	0,921	**0,001**
0,025 C+		0,287	0,006	**<0,001**	0,287	**<0,001**
0,05 C+			0,749	**0,006**	1,000	**0,033**
0,1 C+				0,287	0,749	0,632
0,5 C+					**0,006**	0,998
P-éhezés						**0,033**

F4d. táblázat. 7. nap

7. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,998	0,749	**0,002**	**<0,001**	0,202	**<0,001**
0,025 C+		0,391	**<0,001**	**<0,001**	**0,055**	**<0,001**
0,05 C+			0,136	**0,003**	0,966	**<0,001**
0,1 C+				0,848	0,632	0,509
0,5 C+					**0,055**	0,998
P-éhezés						**0,011**

F4e. táblázat. 9. nap

9. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,848	1,000	0,509	0,003	0,391	**0,033**
0,025 C+		0,632	**0,033**	**<0,001**	**0,020**	**<0,001**
0,05 C+			0,749	**0,011**	0,632	0,088
0,1 C+				0,391	1,000	0,848
0,5 C+					0,509	0,989
P-éhezés						0,921

F4f. táblázat. 12. nap

12. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	**0,006**	**0,003**	0,921	0,136	**0,055**	1,000
0,025 C+		1,000	0,136	0,921	**<0,001**	**0,006**
0,05 C+			0,088	0,848	**<0,001**	**0,003**
0,1 C+				0,749	**0,002**	0,921
0,5 C+					**<0,001**	0,136
P-éhezés						**0,055**

5. függelék. A különböző *H. pluvialis* tenyészetekben a nevelési idő adott napjain számolt zöld-piros ciszták száma közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F5a. táblázat. Kontroll

Kontroll	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	0,984	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		0,984	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**0,006**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				0,108	**0,010**
9. nap					0,953

F5b. táblázat. 0,025 C+

0,025 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	0,953	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		0,953	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				0,107	0,108
9. nap					1,000

F5c. táblázat. 0,05 C+

0,05 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	0,953	0,953	0,953	**<0,001**
2. nap		0,953	0,953	0,953	**<0,001**
4. nap			1,000	1,000	**<0,001**
7. nap				1,000	**<0,001**
9. nap					**<0,001**

F5d. táblázat. 0,1 C+

0,1 CYN	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	0,108	0,953	0,108	**<0,001**
2. nap		0,108	0,953	0,108	**<0,001**
4. nap			0,514	1,000	**<0,001**
7. nap				0,514	**<0,001**
9. nap					**<0,001**

F5e. táblázat. 0,5 C+

0,5 CYN	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	1,000	0,953	0,953	**<0,001**
2. nap		1,000	0,953	0,953	**<0,001**
4. nap			0,953	0,953	**<0,001**
7. nap				1,000	**<0,001**
9. nap					**<0,001**

F5f. táblázat. P-éhezés

P-éhezés	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	0,108	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		0,108	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				**<0,001**	**<0,001**
9. nap					**<0,001**

F5g. táblázat. Indukció

Indukált	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	0,953	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				**<0,001**	**<0,001**
9. nap					**<0,001**

6. függelék. A nevelési idő adott napjain az egyes *H. pluvialis* tenyészetek zöld-piros ciszta számai közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F6a. táblázat. 0. nap

0. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,025 C+		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,05 C+			1,000	1,000	1,000	1,000
0,1 C+				1,000	1,000	1,000
0,5 C+					1,000	1,000
P-éhezés						1,000

F6b. táblázat. 2. nap

2. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,976
0,025 C+		1,000	1,000	1,000	1,000	0,976
0,05 C+			1,000	1,000	1,000	0,976
0,1 C+				1,000	1,000	0,976
0,5 C+					1,000	0,976
P-éhezés						0,976

F6c. táblázat. 4. nap

4. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	1,000	1,000	0,470	0,994	0,470	**<0,001**
0,025 C+		1,000	0,595	0,976	0,595	**<0,001**
0,05 C+			0,595	0,976	0,595	**<0,001**
0,1 C+				0,139	1,000	**<0,001**
0,5 C+					0,139	**<0,001**
P-éhezés						**<0,001**

F6d. táblázat. 7. nap

7. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,595	**0,014**	**0,014**	**0,014**	**<0,001**	**<0,001**
0,025 C+		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,05 C+			1,000	1,000	**<0,001**	**<0,001**
0,1 C+				1,000	**<0,001**	**<0,001**
0,5 C+					**<0,001**	**<0,001**
P-éhezés						**<0,001**

F6e. táblázat. 9. nap

9. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,595	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,025 C+		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,05 C+			0,595	1,000	**<0,001**	**<0,001**
0,1 C+				0,595	**<0,001**	**<0,001**
0,5 C+					**<0,001**	**<0,001**
P-éhezés						**<0,001**

F6f. táblázat. 12. nap

12. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,976	0,595	0,595	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,025 C+		0,976	0,976	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,05 C+			1,000	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,1 C+				**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
0,5 C+					**<0,001**	**<0,001**
P-éhezés						**<0,001**

7. függelék. A különböző *H. pluvialis* tenyészetek tápoldatában a nevelési idő adott napjain mérhető ortofoszfát (PO_4^{-3}) mennyiségei közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F7a. táblázat. Kontroll

Kontroll	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
2. nap		**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
4. nap			1,000	0,995	0,948
7. nap				0,998	0,966
9. nap					0,997

F7b. táblázat. 0,025 C+

0,025 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
2. nap		**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
4. nap			0,737	0,247	**0,038**
7. nap				0,917	0,453
9. nap					0,917

F7c. táblázat. 0,05 C+

0,05 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
2. nap		**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
4. nap			0,214	**0,006**	**0,003**
7. nap				0,621	0,487
9. nap					1,000

F7d. táblázat. 0,1 C+

0,1 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
2. nap		**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
5. nap			**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
7. nap				0,752	0,663
9. nap					1,000

F7e. táblázat. 0,5 C+

0,5 C+	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
2. nap		**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
4. nap			**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
7. nap				0,177	0,182
9. nap					1,000

F7f. táblázat. P-éhezés

P-éhezés	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2. nap		1,000	1,000	1,000	1,000
4. nap			1,000	1,000	1,000
7. nap				1,000	1,000
9. nap					1,000

F7g. táblázat. Indukció

Indukált	2. nap	4. nap	7. nap	9. nap	12. nap
0. nap	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
2. nap		**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
4. nap			0,171	**0,028**	0,865
7. nap				0,940	0,703
9. nap					0,255

8. függelék. A nevelési idő adott napjain az egyes *H. pluvialis* tenyészetek tápoldatában mérhető ortofoszfát (PO_4^{-3}) mennyiségei közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F8a. táblázat. 2. nap

2. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
0,025 C+		**< 0,001**	**< 0,001**	0,903	**< 0,001**	**< 0,001**
0,05 C+			**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
0,1 C+				**< 0,001**	**< 0,001**	**0,009**
0,5 C+					**< 0,001**	**< 0,001**
P-éhezés						**< 0,001**

F8b. táblázat. 4. nap

4. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,520	0,072	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
0,025 C+		0,942	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	0,167
0,05 C+			**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	0,757
0,1 C+				0,955	**< 0,001**	**< 0,001**
0,5 C+					**< 0,001**	**< 0,001**
P-éhezés						**< 0,001**

F8c. táblázat. 7. nap

7. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	0,992	0,980	0,895	0,691	**< 0,001**	**< 0,001**
0,025 C+		0,942	0,999	0,975	**< 0,001**	**< 0,001**
0,05 C+			1,000	0,989	**< 0,001**	**< 0,001**
0,1 C+				0,955	**< 0,001**	**< 0,001**
0,5 C+					**< 0,001**	**< 0,001**
P-éhezés						**< 0,001**

F8d. táblázat. 9. nap

9. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	1,000	1,000	1,000	1,000	**< 0,001**	**< 0,001**
0,025 C+		0,999	1,000	0,998	**< 0,001**	**< 0,001**
0,05 C+			0,997	1,000	**< 0,001**	**< 0,001**
0,1 C+				0,995	**< 0,001**	**< 0,001**
0,5 C+					**< 0,001**	**< 0,001**
P-éhezés						**< 0,001**

F8e. táblázat. 12. nap

12. nap	0,025 C+	0,05 C+	0,1 C+	0,5 C+	P-éhezés	Indukált
Kontroll	1,000	1,000	0,999	1,000	**< 0,001**	**< 0,001**
0,025 C+		1,000	0,983	1,000	**< 0,001**	**< 0,001**
0,05 C+			0,996	1,000	**< 0,001**	**< 0,001**
0,1 C+				0,999	**< 0,001**	**< 0,001**
0,5 C+					**< 0,001**	**< 0,001**
P-éhezés						**< 0,001**

9. függelék. A teljes cianobakteriális kivonattal kezelt *Chlorococcum sp.* tenyészetek tápoldatában a nevelési idő adott napjain mérhető ortofoszfát (PO_4^{3-}) mennyiségei közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F9a. táblázat. Kontroll

Kontroll	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			0,976	0,965	0,960	0,997
7. nap				1,000	1,000	1,000
10. nap					1,000	1,000
12. nap						1,000

F9b. táblázat. 1:1

1:1	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			1,000	0,765	1,000	0,999
7. nap				0,721	1,000	0,997
10. nap					0,547	0,960
12. nap						0,979

F9c. táblázat. 1:2

1:2	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				0,998	1,000	1,000
10. nap					0,996	0,996
12. nap						1,000

F9d. táblázat. 1:4

1:4	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			1,000	1,000	0,998	0,757
7. nap				1,000	1,000	0,539
10. nap					1,000	0,571
12. nap						0,416

10. függelék. A nevelési idő adott napjain az egyes teljes cianobakteriális kivonattal kezelt *Chlorococcum sp.* tenyészetek tápoldatában mérhető ortofoszfát (PO_4^{-3}) mennyiségei közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F10a. táblázat. 2. nap

2. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	**<0,001**	**0,006**	0,543
1:1		**<0,001**	**<0,001**
1:2			**<0,001**

F10b. táblázat. 4. nap

4. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,995	**<0,001**	1,000
1:1		**<0,001**	0,985
1:2			**<0,001**

F10c. táblázat. 7. nap

7. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,947	0,974	0,922
1:1		0,999	1,000
1:2			0,997

F10d. táblázat. 10. nap

10. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,149	0,717	0,878
1:1		0,693	0,499
1:2			0,990

F10e. táblázat. 12. nap

12. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,983	0,967	0,953
1:1		1,000	0,999
1:2			1,000

F10f. táblázat. 14. nap

14. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,828	1,000	0,141
1:1		0,846	0,549
1:2			0,173

11. függelék. A centrifugált cianobakteriális kivonattal kezelt *Chlorococcum sp.* tenyészetek tápoldatában a nevelési idő adott napjain mérhető ortofoszfát (PO_4^{-3}) mennyiségei közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F11a. táblázat. Kontroll

Kontroll	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			0,857	0,811	0,793	0,937
7. nap				1,000	1,000	1,000
10. nap					1,000	0,999
12. nap						0,998

F11b. táblázat. 1:1

1:1	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			1,000	0,733	1,000	0,997
7. nap				0,842	1,000	1,000
10. nap					0,612	0,968
12. nap						0,985

F11c. táblázat. 1:2

1:2	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
7. nap				0,844	1,000	0,675
10. nap					0,802	1,000
12. nap						0,621

F11d. táblázat. 1:4

1:4	2. nap	4. nap	7. nap	10. nap	12. nap	14. nap
0. nap	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
2. nap		**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
4. nap			0,135	0,254	0,219	0,453
7. nap				1,000	1,000	0,993
10. nap					1,000	1,000
12. nap						0,999

12. függelék. A nevelési idő adott napjain az egyes teljes cianobakteriális kivonattal kezelt *Chlorococcum sp.* tenyészetek tápoldatában mérhető ortofoszfát (PO_4^{-3}) mennyiségei közötti 99,5%-os szignifikanciaszinten vizsgált p-értékei. Pirossal kiemelve a szignifikánsan különböző (p<0,05) értékek láthatóak.

F12a. táblázat. 2. nap

2. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	**<0,001**	**0,044**	**<0,001**
1:1		**<0,001**	**<0,001**
1:2			**<0,001**

F12b. táblázat. 4. nap

4. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,776	**<0,001**	0,497
1:1		**<0,001**	0,096
1:2			**<0,001**

F12c. táblázat. 7. nap

7. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,952	0,998	1,000
1:1		0,986	0,964
1:2			0,999

F12d. táblázat. 10. nap

10. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,222	0,391	0,965
1:1		0,985	0,462
1:2			0,679

F12e. táblázat. 12. nap

12. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,993	0,996	0,974
1:1		1,000	0,999
1:2			0,997

F12f. táblázat. 14. nap

14. nap	1:1	1:2	1:4
Kontroll	0,951	0,504	0,986
1:1		0,820	0,998
1:2			0,715

10. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

Az értekezés témájában megjelent közlemények (IF: 6,361)

Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven:

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:

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

Nemzetközi konferenciák, poszterek:

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. 37th 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 cianobakteriális kivonatok hatása a *Scenedesmus obtusus* planktonikus zöldalga növekedésére, tápanyag-felvételére és foszfatáz aktivitására. 12th Advances in research on the flora and vegetation of the Carpato-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 cylindorspermopsin containing cyanobacterial crude extract on growth, phosphateuptake and phosphatase activity of the planktonic green alga Scenedesmus obtusus. 33rd 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). 4th Croatian Botanical Symposium, 27-29 September 2013 szeptember 27-29., Split, Horvátország.

Hazai konferenciák, poszterek:

Dobronoki, D., B-Béres, V., Vasas, G., Gonda, S., Nagy, S. A., Bácsi, I., 2018. A cilindrospermopszin lehetséges foszfatáz 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 foszfatáz 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 oktober 2-4. Tihany.

Egyéb megjelent közlemények: (IF: 6.267)

Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven:

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:

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 Közlöny 95(5-6), 49-52.

Egyéb közlemények magyar nyelven:

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

Nemzetközi konferenciák, poszterek:

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. 37th 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. 9th 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. 9th Central European Diatom Meeting. 2015. március 10-13. Bremerhaven, Németország.

Hazai konferenciák, poszterek:

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.