

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

Ksenija
SAVADOVA-RATKUS

Vandens „žydėjimus“ sukeliančios melsvabakterės, sintetinami toksinai ir veiksniai, lemiantys jų struktūros pokyčius gėlavandenėse ekosistemose

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Ekologija ir aplinkotyra N 012

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014 – 2018 metais Gamtos tyrimų centre

Moksliniai vadovai:

dr. Ričardas Paškauskas (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012). Nuo 2014-10-01 iki 2015-05-05,

dr. Judita Koreivienė Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012). Nuo 2015-05-06 iki 2018-09-30.

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **doc. dr. Elena Servienė** (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Nariai:

dr. Sigita Jurkonienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012);

doc. dr. Renata Pilkaitytė (Klaipėdos universitetas, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012);

dr. Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012);

prof. dr. Maya Petrova Stoyneva-Gärtner (Sofijos „Šv. K. Ohridskio“ universitetas, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2019 m. liepos mėn. 5 d. 13 val. Gamtos tyrimų centro posėdžių salėje.

Adresas: Akademijos g., 2, LT – 08412, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 272 92 57; el. paštas sekretoriatas@gamtostyrimai.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:
<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY
NATURE RESEARCH CENTRE

Ksenija
SAVADOVA-RATKUS

Bloom-forming cyanobacteria, cyanotoxins and significant factors for their dynamics in freshwaters

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Ecology and Environmental Research N 012

VILNIUS 2019

This dissertation was carried out at the Nature Research Centre 2014–2018

Academic supervisors:

Dr. Ričardas Paškauskas (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Research, N 012). (2014-10-01–2015-05-05),

Dr. Judita Koreivienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Research, N 012). (2015-05-06–2018-09-30).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Assoc. Prof. Dr. Elena Servienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Biology, N 010).

Members:

Dr. Sigita Jurkonienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Research, N 012).

Assoc. Prof. Dr. Renata Pilkaitytė (University of Klaipėda, Natural Sciences, Ecology and Environmental Research, N 012).

Dr. Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Research, N 012).

Prof. Dr. Maya Petrova Stoyneva-Gärtner (Sofia University „St. K. Ohridski“, Natural Sciences, Ecology and Environmental Research, N 012).

The dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13:00 on 5th July 2019 in the conference room at the Nature Research Centre.

Address: Akademijos Str. 2, LT – 08412, Vilnius, Lithuania.

Tel. +370 5 272 92 57; e-mail: sekretoriatas@gamtostyrimai.lt

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University and Nature Research Centre, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRAUKA

IVADAS

Melsvabakterės yra seniausi žemėje fotosintezę vykdančios prokariotiniai organizmai, kurie sukelia „žydėjimus“ beveik visų žemynų vandens telkiniuose, taip pat ir Europoje (Merel et al., 2010; Meriluoto et al., 2017). Vandens „žydėjimai“ pastaruoju metu yra viena aktualiausių gamtosaugos problemų. Jie mažina vandens išteklių tinkamumą geriamam vandeniui ir rekreacijai, sukelia ekonominius nuostolius, sutrikdo vandens ekosistemų funkcionavimą, gali būti apsinuodijimų, įvairių ligų, žmonių ar gyvūnų mirties priežastimi (Carmichael et al., 2001; Ho et al., 2012; Buratti et al., 2017). Vandens „žydėjimų“ toksiškumas priklauso nuo melsvabakterių rūšių, jų biomasės kiekio (Buratti et al., 2017) ir toksinių/netoksinių individų santykio populiacijoje (Kardinaal et al., 2007). Yra žinoma, kad cianotoksinus gali sintetinti melsvabakterių rūšys, priklausančios daugiau nei keturiasdešimt genčių (Carmichael et al., 2001).

Didėjanti temperatūra ir maistinių medžiagų koncentracija yra esminiai veiksniai, turintys įtakos melsvabakterių struktūros, biomasės kiekio ir vandens „žydėjimų“ intensyvumo pokyčiams bei svetimžemių rūšių įsikūrimui (Pearl, Huisman, 2008; Carey et al., 2012; Sukenik et al., 2015). Globalūs pokyčiai, tokie kaip klimato šiltėjimas ir antropogeninė eutrofikacija, stipriausiai veikia seklius vidutinių platumų ežerus ir skatina intensyvių melsvabakterių vystymąsi, tokiu būdu didindami šių ekosistemų vandentvarkos problemas (Kosten et al., 2012). Teikiant rekomendacijas vandens „žydėjimų“ valdymui, būtina atsižvelgti į problemos kompleksiskumą ir, apjungiant *in situ* tyrimus su laboratoriniais eksperimentais, pirmiausiai atskleisti temperatūros ir maistinių medžiagų poveikį melsvabakterių rūšims ir cianotoksinų

akumuliacijai konkrečiose gėlvandenėse ekosistemose (El-Shehawy et al., 2012; Humbert, Fastner, 2017).

Tikslas: Ištirti potencialiai toksinių vandens „žydėjimus“ sukeliančių melsvabakterių rūšių įvairovę, jų vystymosi ir cianotoksinų kiekio kaitos ypatumus gamtoje ir eksperimentinėmis sąlygomis.

Uždaviniai:

1. Ištirti „žydėjimus“ sukeliančių potencialiai toksinių melsvabakterių rūšių įvairovės ir biomasės kaitos ypatumus dviejuose sekliuose eutrofiniuose ežeruose.
2. Ištirti cianotoksinų, bioaktyvių neribosominių peptidų įvairovę ir kiekio kaitą melsvabakterių vegetacijos laikotarpiu.
3. Nustatyti cianotoksinius sintetinančias melsvabakterių rūšis ir įvertinti toksinių/netoksinių genotipų kaitą tirtuose ežeruose.
4. Įvertinti temperatūros ir maistinių medžiagų įtaką vietinių ir svetimžemių melsvabakterių rūšių vystymuisi, cianotoksinų kiekiui ir tarprūšinei konkurencijai eksperimentinėmis sąlygomis.

Ginamieji teiginiai:

1. Viena arba kelios potencialiai toksinės melsvabakterių rūšys sukelia intensyvius vandens „žydėjimus“ vasarą ir ankstyvą rudenį vidutinių platumų sekliuose eutrofiniuose ežeruose.
2. Didelė potencialiai toksinių melsvabakterių rūšių įvairovė nulemia platų cianotoksinų ir bioaktyvių neribosominių peptidų spektrą eutrofiniuose ežeruose, tačiau toksinių antrinių metabolitų stuktūra priklauso nuo dominuojančių melsvabakterių rūšių.
3. Cianotoksinų ir bioaktyvių neribosominių peptidų sintezė būdinga konkrečiai rūšiai ir/arba kamienui.
4. Temperatūra ir maistinės medžiagos turi skirtingą poveikį melsvabakterių augimo greičiui, cianotoksinų ir bioaktyvių

neribosominių peptidų sintezei bei vietinių ir svetimžemių rūšių tarprūšinei konkurencijai.

Darbo naujumas. Šis darbas yra kompleksinis vandens „žydėjimų“ tyrimas, apjungiantis duomenis, gautus išanalizavus gamtinę tyrimų medžiagą ir atlikus eksperimentus laboratorinėmis sąlygomis su izoliuotais iš tiriamų vandens telkinių melsvabakterių kamienais. Tyrime pateikiamas toksinių antrinių metabolitų spektras, papildomos žinios apie Europos gėlavandenėse ekosistemose rečiau aptinkamus cianotoksinius ir bioaktyvius neribosominius peptidus. Pagal standartizuotą metodiką surinkta ir ištirta medžiaga leido palyginti cianotoksinių struktūrą tirtuose ežeruose su kitais 135 ežerais iš dvidešimtaštuonių Europos valstybių. Cianotoksinai saksitoksinas, anatoksinas-a ir cilindropermopsinas, neribosominiai peptidai ir svetimžemė melsvabakterių rūšis *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* Lietuvoje aptikti pirmą kartą. Darbas ženkliai praplėtė informaciją apie cianotoksinių kokybinę ir kiekybinę struktūrą Lietuvos gėlavandenėse ekosistemose ir melsvabakterių kamienuose. Ištirta iki 300 potencialiai toksinių vandens „žydėjimus“ sukeliančių melsvabakterių kamienų. Darbe aptariami Europoje sparčiai plintančių svetimžemių melsvabakterių rūšių vystymosi ir toksinų sintezės ypatumai, nauji svetimžemių rūšių aptikimo arealai, atskleistas šių rūšių konkurencingumas su vietinėmis rūšimis ir įsitvirtinimo galimybės vidutinių platumų vandens telkiniuose kintančiomis aplinkos sąlygomis.

Darbo reikšmė. Klimato atšilimas sustiprina antropogeninės eutrofikacijos poveikį vandens „žydėjimų“ intensyvumui gėlavandenėse ekosistemose, ir tai apsunkina jų prognozavimą, kontrolę ir valdymą. Todėl kompleksinis temperatūros ir maistinių medžiagų poveikio tyrimas, apjungiantis tyrimus gamtoje su laboratorijoje atliktais eksperimentais, leistų tiksliau atskleisti toksinių melsvabakterių vystymosi ir jų antrinių metabolitų kaupimosi mechanizmus.

Rezultatų pristatymas. Rezultatai buvo pristatyti trijose tarptautinėse konferencijose. Atspausdintos keturios ir įteikta spaudai viena publikacija Clarivate Analytic Web of Science duomenų bazėje. Dvi publikacijos atspausdintos kituose recenzuojamuose žurnaluose.

Disertacijos apimtis ir struktūra. Disertacija susideda iš šių skyrių: Įvado, Literatūros apžvalgos, Metodikos, Rezultatų, Diskusijos, Išvadų ir Literatūros Sąrašo (327 literatūros šaltinių). Disertacijos apimtis – 122 puslapiai. Disertacija iliustruota 10 lentelių ir 20 paveikslų. Disertacija atspausdinta anglų kalba. Santrauka parengta lietuvių ir anglų kalbomis.

Padėka. Nuoširdžiai dėkoju darbo mokslinei vadovei dr. Juditai Koreivienei už nuolatinį palaikymą, kantrybę, vertingus patarimus vykdant tyrimus ir disertacijos rašymo metu. Dėkoju kolegėms dr. Jūratei Karosienei, dr. Jūratei Kasperovičienei ir dr. Irmai Vitonytei už pagalbą ir palaikymą ekspedicijų metu, vykdant eksperimentinius tyrimus, taip pat vertingas pastabas disertacijos rankraščiui. Dėkinga esu Violetai Ptašekienei už disertacijos anglų kalbos redagavimą. Esu dėkinga pirmam darbo vadovui dr. Ričardui Paškauskui konsultacijas vykdant tyrimus. Dėkoju darbą vertinusioms recenzentėms dr. Sigitai Jurkonienei, doc. dr. Renatai Pilkaitytei už detalią darbo analizę, konstruktyvius patarimus ir vertingas pastabas.

Nuoširdžiai dėkoju prof. habil. dr. Hanna Mazur-Marzec (Gdansko universitetas, Lenkija) už suteiktą galimybę stažuotis ir įgyti patirties atliekant antrinių metabolitų analizę skysčių chromatografijos su masių spektrometrijos metodu (LC-MS/MS), įsisavinant molekulinis metodus nustatant cianotoksinų genus ir itin vertingus patarimus atliekant duomenų analizę. Už šiltą priėmimą dėkoju prof. habil. dr. Hanna Mazur-Marzec vadovaujamam laboratorijos kolektyvui: dr. Anna Toruńska-Sitarz, dr. Agata Błaszczyk, dr. Justyna Kobos ir Anna Krakowiak. Širdingai dėkoju prof. Kaarina Sivonen (Helsinkio universitetas, Suomija) už galimybę stažuotis ir įgytą vertingą patirtį doktorantūros studijų laikotarpiu. Esu dėkinga dr. Suvi Suurnäkki už pagalbą atliekant

molekulinius tyrimus ir dr. Matti Wahlsten už pagalbą atliekant cianotoksinų analizę su LC-MS/MS vizito metu.

Dėkoju COST programos veikloms ES1408 EUAlgae ir ES1105 CYANOCOST už finansinę paramą trumpalaikio mokslinio vizito išvykoms, Švietimo mainų paramos fondui už finansuotą stažuotę. Taip pat dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už skirtą stipendiją 2017 ir 2018 metais bei paramą dalyvaujant 11-e Tarptautiniame Fikologų Kongrese.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai: vyrui, tėvams ir seseriai už kantrybę ir palaikymą visų doktorantūros studijų metu ir disertacijos rašymo laikotarpiu.

Trumpiniai:

AER – aeruginozinai; **AP** – anabaenopeptinai, **ATX-a** – anatoksinas-a, **Cianotoksinai** – melsvabakterių sintetinami toksinai, **CYN** – cilindrospermopsinas, **CP** – cianopeptolinai, **MC** – mikrocistinai, **P** – fosforas; $P_{\min}$ – mineralinis fosforas, **N** – azotas, $N_{\min}$ – mineralinis azotas, **NRP** – biologiškai aktyvūs neribosominiai peptidai, **STX** – saksitoksinas.

1. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR DARBO METODAI

Darbo objektas yra vandens „žydėjimus“ sukeliančios melsvabakterės, jų sintetinami cianotoksinai ir biologiškai aktyvūs neribosominiai peptidai (NRP).

Darbas atliktas Gamtos tyrimų centre (Lietuva), kur buvo nustatyti fizikiniai-cheminiai vandens parametrai, chlorofilas-*a*, atlikta fitoplanktono analizė, izoliuoti melsvabakterių kamienai, vykdyti eksperimentiniai tyrimai. Gdanskio Universitete (Lenkija), vadovaujant prof. habil. dr. H. Mazur-Marzec, atlikta antrinių metabolitų (cianotoksinų ir NRP) kokybinė ir kiekybinė analizė skysčių chromatografijos su masių spektrometrijos metodu, molekuliniai tyrimai (16S rRNR, PC-IGS ir *sxtA* geno sekvenavimas). Helsinkio Universitete (Suomija), vadovaujant prof.

K. Sivonen, buvo atlikta cianotoksinų analizė taikant cheminius ir molekulinis metodus (qPGR analizė, *mcyE*, *anaC* genų nustatymas).

Vandens telkinių charakteristika. Tyrimai vykdyti dviejuose sekliuose eutrofiniuose Lietuvos ežeruose (Širvio ež., 54° 59' 16.27", 25° 12' 54.13" ir Jiezno ež., 54° 35' 33.67", 24° 10' 48.95"). Širvio ežeras priskiriamas probleminiams, o Jiezno – kritinės būklės ežerams, kurie praeityje ir dabartiniu metu patiria nuolatinę maistinių medžiagų prietaką dėl gyvulininkystės, žemdirbystės ir urbanizacijos baseine ir apyežeryje (Balevičius, 2009). Ežerai itin svarbūs vietinei bendruomenei, kadangi telkšo prie gyvenviečių ir naudojami rekreacijai ir mėgėjiškai žvejybai.

Vandens paviršinių mėginių rinkimas ir fitoplanktono analizė. Mėginiai rinkti ir vandens fizikiniai-cheminiai parametrai matuoti balandžio–lapkričio mėn. Širvio (2014–2015 m., kartą per dvi savaites) ir Jiezno (2015 m., kartą per mėnesį) ežeruose. Chlorofilo-*a* (*chl-a*) kiekis įvertintas fluorometru. Azoto ir fosforo, jų formų kiekybinę analizę atliko UAB „Vandens tyrimai“. Vilniaus Meteorologijos Stoties oro temperatūros ir kritulių duomenis pateikė Lietuvos Hidrometeorologijos Tarnyba.

Fitoplanktono mėginiai ($n=34$) imti batometru, fiksuoti formaldehidu, analizuoti remiantis Olrik ir kt. (1998). Melsvabakterių rūšys identifikuotos pagal Komárek, Anagnostidis (1998; 2005), Komárek (2013).

Vandens stulpo mėginių surinkimas fitoplanktono ir cianotoksinų analizei. Vandens stulpo mėginiai ($n=2$), palyginimui su paviršiniais vandens mėginiais, surinkti ir fitoplanktono analizė atlikta pagal standartizuotą metodiką (Mantzouki et al., 2018a), taikytą vykdant projektą „European Multi Lake Survey“ (Mantzouki et al., 2018b). Mėginiai imti specialiu vertikaliu prietaisu 2015 m. rugpjūčio mėn. Širvio ir Jiezno ežeruose. Fitoplanktono mėginiai fiksuoti liugoliu ir analizuoti Utermöhl metodu (Utermöhl, 1958). *Chl-a* kiekis nustatytas fluorometru. MC, CYN ir ATX analizė atlikta sertifikuotose Olandijos ir Vokietijos laboratorijose.

Melsvabakterių kamienų izoliavimas. Melsvabakterių kamienai buvo izoliuoti mikrokapiliarų metodu iš surinktos gamtinės medžiagos, siekiant nustatyti potencialius cianotoksinų produkuotojus cheminiais ir/arba molekuliniiais metodais ir atlikti eksperimentinius tyrimus. Kultūros buvo auginamos modifikuotoje MWC mitybinėje terpėje (Lebret et al., 2012) prie 20 °C temperatūros, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ šviesos intensyvumo, 12:12 val. dienos:nakties sąlygomis. Izoliuoti 274 kamienai, priklausantys 15 rūšių, galinčių potencialiai sintetinti MC, STX, ATX-a ir/ar CYN.

Cianotoksinų ir neribosominių peptidų analizė. Cianotoksinais ir NRP analizuoti ežerų paviršinio vandens sluoksnio mėginiuose (n=34) ir melsvabakterių kamienų biomasėje (n=57). MC, NRP, ATX-a ir CYN ekstrakcija atlikta naudojant 75 % metanolį, STX – amonio formiato buferį su acetoniitrilu (95:5, v/v). Analizė atlikta naudojant skysčių chromatografiją su masių spektrometrija LC–MS/MS pagal Grabowska ir kt. (2014), Chernova ir kt. (2017). Duomenys analizuoti Analyst QS® 1.5.1 programa.

Microcistino geno (*mcyE*) nustatymas gamtiniuose mėginiuose. Mėginiai *Planktothrix agardhii mcyE* sintetazės geno kopijų skaičiaus nustatymui buvo surinkti 2014 m. balandžio–spalio mėn. Širvio ežere (n=13). Fitoplanktono biomasė sukoncentruota ant GF/F filtrų. DNR išskirta naudojant PowerWater®DNA Isolation Kit rinkinį ir atlikta kiekybinė *mcyE* geno (qPGR) analizė remiantis Vaitomaa ir kt. (2003), Rantala ir kt. (2006; 2008).

***Aphanizomenon* sensu lato kamienų molekulinė analizė.** Morfologiškai panašių *Aphanizomenon* sensu lato rūšių (iš viso 22 *A. gracile*, *A. flos-aquae*, *S. aphanizomenoides* rūšių kamienų) identifikavimas patvirtintas atlikus molekulinę 16S rRNR ir PC-IGS analizę. DNR išskirta naudojant FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, JAV) rinkinį. 16S–23S rRNR fragmentas su vidiniu transkribuotu tarpikliu (ITS) buvo amplifikuotas, remiantis Nübel ir kt. (1997), Lepère ir kt. (2000), Koskenniemi ir kt. (2007) darbais. Fikocianino *cpcB-cpcA* intergeninio tarpiklio (PC-IGS) pagausinimas buvo atliktas pagal

Neilan ir kt. (1995), o saksitosino sintetazės *sxtA* geno fragmentas tirtas remiantis Ballot ir kt. (2010a) pateikta metodika.

PGR produktai atskirti 1 % 1 × TBE agarozės gelyje ir valyti su Extractme® DNA clean-up Kit (Blirt S.A., Gdanskas, Lenkija) rinkiniu, remiantis gamintojo protokolu ir sekvenuoti (Genomed S.A., Varšuva, Lenkija). Nukleotidų sekos įkeltos į Genų banko duomenų bazę.

***mcyE* ir *anaC* genų analizė kamienuose.** Genai tirti 141-ame *P. agardhii*, *Microcystis* spp. ir *Dolichospermum crassum* kamienne. Melsvabakterių biomasė centrifuguota prie 8000 rpm 6–12 min. DNR išskirtas naudojant E.Z.N.A SP rinkinį. Atitinkami pradmenys buvo naudojami patvirtinti *mcyE* (Rantala et al., 2006; Vaitomaa et al., 2003) ir *anaC* (Rantala-Ylinen et al., 2011) genus kamienuose. Amplifikuoti produktai buvo vizualizuoti 1 % TAE agarozės gelyje.

Eksperimentiniai tyrimai. Siekiant nustatyti temperatūros ir maistinių medžiagų poveikį melsvabakterių augimui, cianotoksinų ir NRP sintezei bei tarprūšinei konkurencijai, laboratorinėmis sąlygomis atlikti eksperimentai su vietinių ir svetimžemių melsvabakterių rūšių, izoliuotų iš Lietuvos ežerų, kamienais (1 lentelė). Eksperimentai vykdyti auginimo spintose esant ~90 μmol m⁻² s⁻¹ šviesos intensyvumui ir 16:8 val. dienos:nakties sąlygoms. Augimo greitis įvertintas remiantis chl-*a* kiekio pokyčiu matuotu kas antrą dieną fluorometru. Kamieno koncentracija eksperimento pradžioje buvo 10 ± 0,5 μg chl-*a*/l. Eksperimentų (I ir II) pabaigoje, kiekvieno varianto trys pakartojimai buvo sumaišomi ir centrifuguojami 7000 rpm, užšaldyta biomasė liofilizuota, cianotoksinais ir NRP analizuoti pagal anksčiau aprašytą metodiką.

I eksperimentas: Temperatūros poveikis. Temperatūros (nuo 18 °C iki 30 °C) poveikis melsvabakterių kamienų augimui, antrinių metabolitų (toksinų, NRP) sintezei tirtas 14 dienų (1 pav., A). Kultūros augintos MWC terpėje ir dvi dienas prieš eksperimentą adaptuotos prie eksperimentui pasirinktų temperatūrų.

II eksperimentas: Maistinių medžiagų poveikis. P_{min} ir N_{min} koncentracijų, jų atominio santykio (N:P) poveikis melsvabakterių

kamienų augimo greičiui, cianotoksinų ir NRP sintezei tirtas vykdant 12 dienų trukmės eksperimentą. Eksperimentiniams tyrimams pasirinktos fosforo koncentracijos, būdingos mezotrofiniams (0,035 mg P/l), eutrofiniams (0,071 ir 0,140 mg P/l) ir hipertrofiniams (0,255 ir 0,51 mg P/l) vidutinių platumų ežerams remiantis Wetzel (1983) (1 pav., B). Azoto kiekis eksperimento variantuose atitiko N:P santykį 7:1; 16:1 ir 30:1. Melsvabakterių kultūros tris dienas iki eksperimento adaptuotos 24 °C temperatūroje ir MWC terpėje be N ir P elementų.

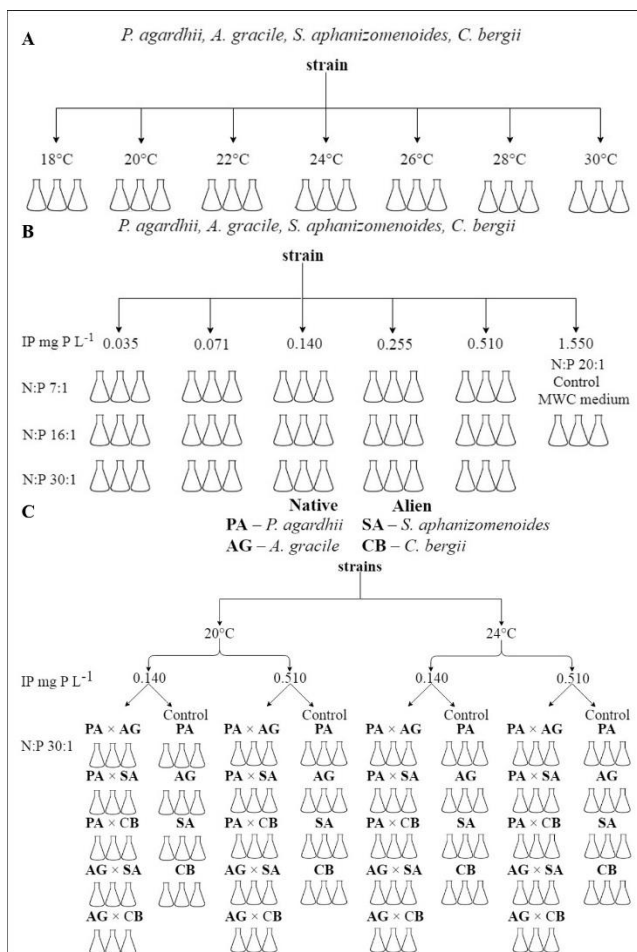
1 lentelė. Melsvabakterių kamienai pasirinkti eksperimentiniams tyrimams

Table 1. Cyanobacteria strains selected for the experiments

Species		Strain	Lake	Cyanotoxins and NRPs
Native	<i>Planktothrix agardhii</i>	F5-09	Širvys	MCs, NRPs
		E9-07	Jieznas	–, NRPs
	<i>Aphanizomenon gracile</i>	B41-09	Širvys	STX, –
		C10-07	Širvys	–
Alien	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i>	G11-07	Jieznas	–
		F11-07	Jieznas	–
	<i>Chrysosporum bergii</i>	D2-08	Rėkyva	–
		B6-08	Gineitiškės	–

III eksperimentas: Tarprūšinė konkurencija. Vietinių *P. agardhii* ir *A. gracile* melsvabakterių (toksiniai kamienai) tarpusavio konkurencija ir jų galimas poveikis svetimžemių *S. aphanizomenoides* ir *C. bergii* rūšių įsikūrimui dabartinėmis klimato sąlygoms (20 °C) ir klimatui šylant (24 °C) bei didėjant vandens telkinių eutrofikacijai (0,140; 0,51 mg P/l prie N:P santykio 30:1) tirtas vykdant 12 dienų trukmės eksperimentą. Kiekvienos melsvabakterių rūšies kamienas buvo auginamas atskirai (kontrolė) ir tiriamuosiuose variantuose kartu su vienu iš kitų trijų melsvabakterių kamienu (1 pav., C). Kas ketvirtą dieną iš kiekvieno tiriamojo varianto buvo imamas ir fiksuojamas 1 ml mėginys formaldehidu,

melsvabakterių ir biomasė apskaičiuota pagal Olrik ir kt. (1998). Kamienai tris dienas prieš eksperimentą auginti MWC terpėje be N ir P elementų 20 °C ir 24 °C temperatūrose.



1 pav. Eksperimentinių tyrimų, skirtų įvertinti abiotinių ir biotinių veiksnių poveikį melsvabakterių kamienų augimo greičiui, cianotoksinų ir NRP sintezei, schemas: A – temperatūros eksperimentas; B – maistinių medžiagų eksperimentas; C – tarprūšinės konkurencijos eksperimentas.

Fig. 1. Schematic design of performed experiments to test effect of abiotic and biotic variables on growth rate and production of cyanotoxins, NRPs of cyanobacteria strains: A – Temperature experiment; B – Nutrient experiment; C – Competition experiment.

Statistinė analizė. Linijinis modelis (GLM) ir regresijos analizė buvo atlikti naudojant STATISTICA 6.0, o RDA analizė – Brodgar 2.7.5. programomis.

2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

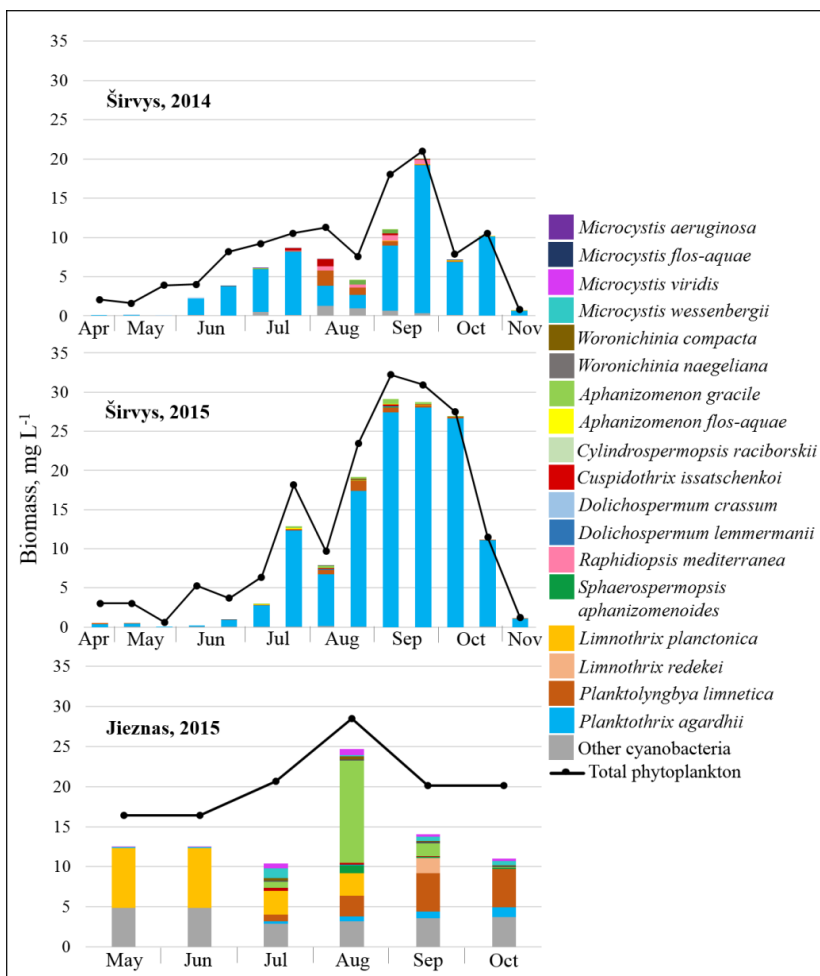
2.1. Vandens „žydėjimai“ ir juos sukeliančios melsvabakterių rūšys

Intensyvūs toksiniai melsvabakterių sukelti vandens „žydėjimai“, keliantys grėsmę žmogui ir biotai, Europoje žinomi jau nuo 1980 m. (Skulberg et al., 1984). Pastaruoju metu tai tapo globalia problema, todėl plačiai tiriama melsvabakterių įvairovės ir biomasės kaita gėluosiuose vandens telkiniuose. Iki šiol sprendžiami svarbūs klausimai, susiję su cianotoksinų grėsme žmonių sveikatai kintančioje aplinkoje (Meriluoto et al., 2017).

Maksimali melsvabakterių biomasė (iki 29,2 mg/l Širvio ir 24,7 mg/l Jiezno ežere; 2 pav.) du kartus viršijo Pasaulinės sveikatos organizacijos maudykloms nustatytą aukščiausią leistiną ribinę koncentraciją (12 mg/l) (WHO, 2003). Panašios arba didesnės melsvabakterių biomasės reikšmės aptinkamos kituose Lietuvos (iki 30 mg/l; Kasperovičienė, 2007) ir Europos ežeruose (iki 200 mg/l; Dembowska, 2011; Humbert, Fastner, 2017; Stoyneva-Gärtner et al., 2017). Melsvabakterės tirtuose ežeruose sudarė iki 98 % bendros fitoplanktono biomasės vasarą ir/arba rudenį. Melsvabakterių dalis fitoplanktone panaši būna ir kituose Lietuvos (50–96 %; Kavaliauskienė, 1996; Kasperovičienė et al., 2005) ir Europos vandens telkiniuose (> 90 %; Yéprémian et al., 2007; Grabowska et al., 2014). Tirtuose ežeruose aptikta 19 potencialiai toksinių rūšių,

priklausančių *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Woronichinia*, *Limnothrix*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Raphidiopsis*, *Sphaerospermopsis*, *Planktolyngbya* gentims. Širvio ir Jiezno ežeruose dominavo *Planktothrix agardhii* ir *Aphanizomenon gracile*. Šios rūšys dažnai aptinkamos sekliuose polimiktiniuose, eutrofiniuose gėluosiuose vandens telkiniuose (Häggqvist et al., 2017).

Širvio ežere *P. agardhii* biomasė siekė 28 mg/l ir sudarė iki 97 % bendros fitoplanktono biomasės rugsėjo mėn. Eutrofiniuose Vokietijos ir Lenkijos vandens telkiniuose minėta rūšis taip pat intensyviai vystėsi rudenį (15–70 mg/l) ir sudarė iki 78–100 % bendros fitoplanktono biomasės (Rücker et al., 1997; Grabowska et al., 2014). Kavaliauskienės (1996) duomenimis, Jiezno ežeras priklausė hipertrofinių ežerų grupei, kuriame dominavo *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae* ir *Dolichospermum macrospora* melsvabakterės. Fitoplanktono analizė šio tyrimo metu atskleidė struktūros pokyčius, kadangi dominavo *Aphanizomenon gracile*, o vyravo *Limnothrix planctonica*, *Planktolyngbya limnetica* rūšys. Panaši vyraujančių rūšių struktūra charakteringa ir Lenkijos sekliam eutrofiniam ežerui (Zębek, 2006). Maksimali *A. gracile* biomasės reikšmė rugpjūtį Jiezno ežere siekė 12,7 mg/l (iki 45 % bendros fitoplanktono biomasės) (2 pav.). Kituose Europos ežeruose plačiai paplitusi *A. gracile* dažnai dominuoja fitoplanktone ir sukelia vandens „žydėjimus“; rūšies biomasė gali siekti iki 15–33 mg/l ir sudaryti iki 80 % bendros fitoplanktono biomasės (Rücker et al., 2007; Mischke, Nixdorf, 2003).



2 pav. Potencialiai toksinių rūšių biomasės sezoninė kaita tirtuose ežeruose.

Fig. 2. Seasonal variation in potential toxin producing species biomass in the studied lakes.

2.2. Cianotoksinių ir neribosominių peptidų struktūra

Meriluoto ir kt. (2017), apžvelgdami toksinių melsvabakterių ir cianotoksinių tyrimus Europoje, pabrėžė, kad duomenų apie MC

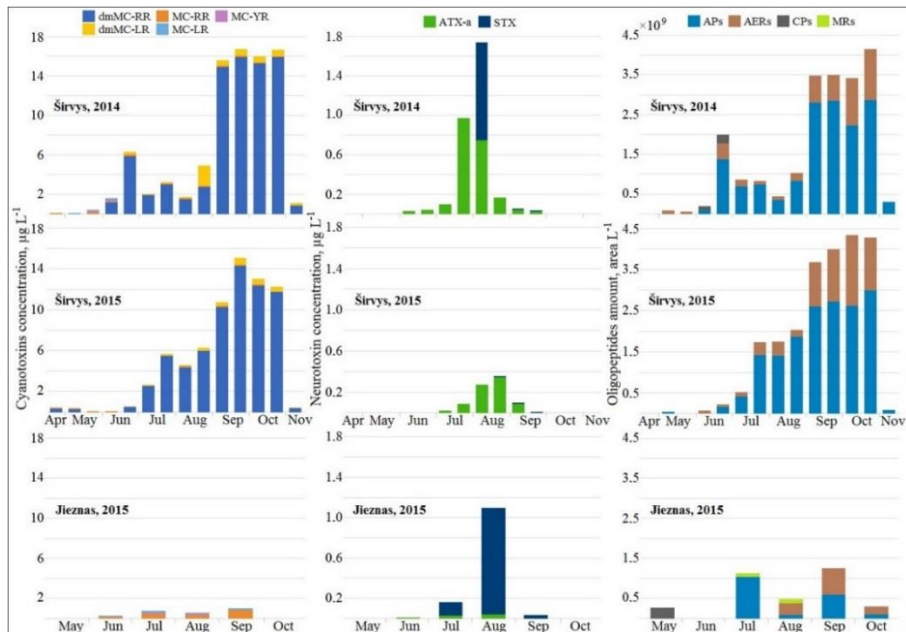
paplitimą Europos ekosistemose yra žymiai daugiau nei apie kitus cianotoksinus. Tirtuose ežeruose dominuojančios potencialiai toksinės melsvabakterių rūšys nulėmė skirtingą cianotoksinų struktūrą ir jų sezoninę kaitą. Širvio ežere melsvabakterių vystymosi laikotarpiu MC, ATX-a ir NRP koncentracijos buvo žymiai didesnės nei Jiezno ežere, tuo tarpu rugpjūčio mėn. nustatytos didžiausios STX koncentracijos buvo panašios abiejuose ežeruose (3 pav.). MC Lietuvos ežeruose buvo nustatyti ir ankstesnių tyrimų metu (Kasperovičienė et al., 2005; Kasperovičienė, 2008), tuo tarpu ATX-a, STX ir NRP pirmą kartą aptikti šio tyrimo metu.

Mikrocistinus sintetinančių melsvabakterių sukeliama vandens „žydėjimai“ stebimi 80-je pasaulio šalių (Catherine et al., 2017). Europos gėlavandenėse ekosistemose dažniausiai aptinkamų hepatotoksinų MC koncentracijos paprastai svyruoja nuo 0,1 iki 10 µg/l (Greer et al., 2016; Pitois et al., 2018), o paviršinėse melsvabakterių santalkose (angl. *scum*) gali siekti net 2800 µg/l (Faassen, Lürling, 2013). Mikrocistiniai Širvio ežere buvo nustatyti balandžio–lapkričio mėn. ir jų koncentracija siekė iki 16,72 µg/l (vidutiniškai $5,63 \pm 6,14$ µg/l), tuo tarpu Jiezno ežere hepatotoksinais aptikti nuo birželio iki rugsėjo ir didžiausi jų kiekiai tesiekė 0,96 µg/l (vidutiniškai $0,59 \pm 0,34$ µg/l). Kituose Lietuvos ežeruose MC koncentracija vasarą ir rudenį svyravo 0,25–1,71 µg/l ribose (Kasperovičienė et al., 2005; Kasperovičienė, 2008).

Svarbu įvertinti ne tik MC bendrą koncentraciją, bet ir ištirti jų kokybinę sudėtį, kadangi skirtingi MC variantai yra nevienodai toksiški (Faassen, Lürling, 2013). Tirtuose ežeruose aptikti penki skirtingi MC variantai: MC-YR, dmMC-RR, MC-RR, dmMC-LR ir MC-LR (3 pav.). Širvio ežere dominavo mažiau toksiškas dmMC-RR variantas; maksimali reikšmė 16,00 µg/l ir sudarė 96 % bendros MC koncentracijos. Jiezno ežere vyravo MC-RR variantas (84 % bendro MC kiekio), o didžiausia koncentracija sudarė tik 0,81 µg/l. Toksiškiausio MC-LR varianto koncentracija (0,15 µg/l) tirtų ežerų melsvabakterių biomasėje neviršijo rekomenduojamą maudykloms leistiną 20 µg/l ribą (WHO, 2003). MC vandens telkinyje dažniausiai

aptinkami kartu su NRP (Janssen, 2019). Tai patvirtina šio tyrimo duomenys, kadangi esant didesniems MC kiekiams santykinai didėjo ir NRP kiekis. Širvio ežere dažniausiai aptinkami buvo AP ir AER. Grabowska ir kt. (2014), taip pat nustatė, kad MC, AP, AER ir planktociklinas vyraavo gamtiniuose mėginiuose, kur dominavo *Planktothrix agardhii*. Yra nustatyta, kad *P. agardhii* ekstraktai, kuriuose be MC, buvo AP ir AER, toksiškai veikė zooplanktono vystymąsi (Pawlik-Skowrońska et al., 2019). Taigi, NRP kartu su MC gali padidinti toksišią biotai melsvabakterijų ekstrakto poveikį, kuris varijuoja priklausomai nuo melsvabakterijų sintetinamų antrinių metabolitų struktūros.

Neurotoksinai Europos vandens telkiniuose nustatomi žymiai rečiau nei MC. Iš neurotoksinų dažniau aptinkami ATX-a ir/arba homo-ATX-a lyginant su ATX-a(s) ir STX (Meriluoto et al., 2017). Nors tirtuose ežeruose nustatytos mažos neurotoksinų koncentracijos (ATX-a siekė 0,97 µg/l ir STX siekė 1,06 µg/l), jie prisidėjo prie didesnio vandens „žydėjimo“ toksiškumo vasaros mėnesiais (3 pav.). Europoje nustatytos didesnės iki 2,19 µg/l ATX-a koncentracijos (Carrasco et al., 2007; Dolman et al., 2012; Toporowska et al., 2016; Pitois et al., 2018). Saksitoksino kiekis Europos gėlavandenėse ekosistemose dažniausiai siekia iki 2,5 µg/l, o maksimali 26,1 µg/l šio toksino koncentracija nustatyta Ispanijos ežeruose (Wörmer et al., 2011; Gkelis, Zaoutsos, 2014; Stoyneva-Gärtner et al., 2017; Pitois et al., 2018). Pasaulio sveikatos organizacija neurotoksinams nėra nustačiusi saugios leistinos koncentracijų ribos. Nustatytos šios grupės toksinų reikšmės Lietuvoje nesiekė rekomenduotinų leistinų ribinių reikšmių STX 3 µg/l (Fitzgerald et al., 1999) ir ATX-a 1 µg/l (Fawell et al., 1999).



3 pav. Viduląstelių cianotoksinų ir biologiškai aktyvių NRP kiekio kaita Širvio (2014–2015) ir Jieznos ežerų (2015) gamtiniuose mėginiuose.

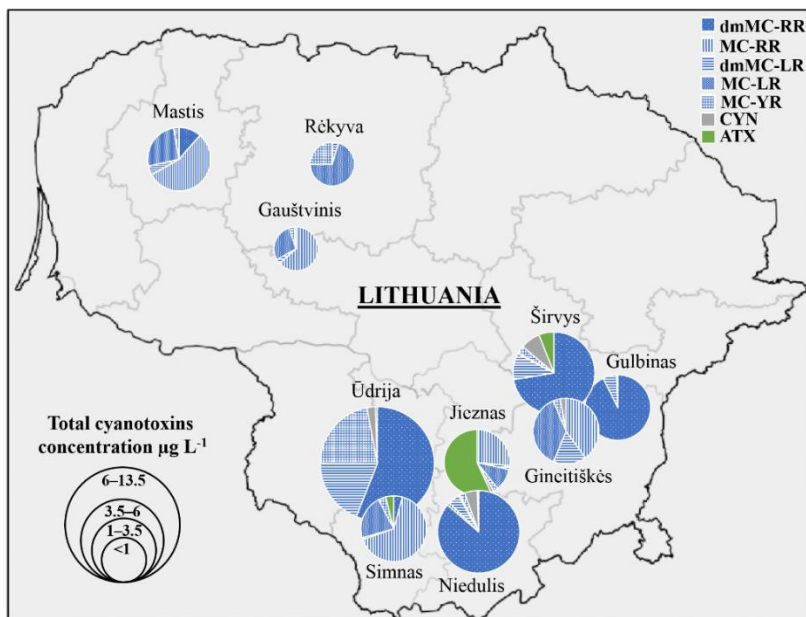
Fig. 3. Variation in intracellular cyanotoxin and bioactive NRP structure in field samples of Lakes Širvys and Jieznas (2015).

Meriluoto ir kt. (2017) pastebėjo, kad dažniausiai yra tiriami tik vienos klasės cianotoksinai. Skirtingų cianotoksinų (MC, CYN ir ATX) tyrimas Europoje atskleidė, kad 75 % iš 137 ežerų bendra toksinų koncentracija integraliniuose vandens mėginiuose buvo mažesnė nei 1 µg/l (Mantzouki et al., 2018b). Cianotoksinų bendra koncentracija ir struktūra integraliniuose ir paviršiaus vandens mėginiuose Širvio (6,62 µg/l ir 4,83 µg/l, atitinkamai) ir Jiezno (1,85 µg/l ir 2,10 µg/l, atitinkamai) ežeruose buvo panaši. Nustatyta cianotoksinų struktūra Širvio ežere buvo panaši į kitų tirtų Lietuvos ežerų, kurių vandens stulpė dominavo MC ir dažniausiai aptinkamas variantas buvo dmMC-RR (4 pav.). Mantzouki ir kt. (2018b) duomenimis, dmMC-RR retai aptinkamas Europoje, tačiau nustatytos koncentracijos ežeruose buvo didelės. Dažniausiai žemyne aptinkami MC-YR ir dmMC-LR, mažiau MC-LR, todėl Mantzouki ir kt. (2018b) pateikė rekomendaciją įtraukti daugiau MC variantų vertinant „žydėjimų“ grėsmę žmonių sveikatai. Citotoksinas CYN (0,03–0,38 µg/l) buvo nustatytas Širvio ir Jiezno ežerų integraliniuose mėginiuose. Nors ATX nustatytas 52-se Europos ežeruose (Mantzouki et al. 2018b), šio neurotoksino koncentracija Jiezno ežere buvo didžiausia (1,33 µg/l).

2.3. Cianotoksinius ir neribosominius peptidus sintetinančios melsvabakterių rūšys

Dauguma vandens „žydėjimus“ sukeliančių melsvabakterių rūšių gali produkuoti toksiškus ir biologiškai aktyvius junginius. Tyrimo metu nustatyta sezoninė *mcyE* sintetazės geno kopijų skaičiaus kaita gamtiniuose mėginiuose koreliavo su dominuojančios *Planktothrix agardhii* rūšies biomase ir MC koncentracija (5 pav., A). Panaši tendencija pastebėta ir kituose Europos ežeruose (Dolman et al., 2012; Papadimitriou et al., 2013; Grabowska et al., 2014). Šio tyrimo metu nustatyta, kad 93 % tirtų *P. agardhii* kamienų turėjo *mcyE* geną (5 pav., B). Kurmayer ir kt. (2004) ir Yéprémian ir kt. (2007)

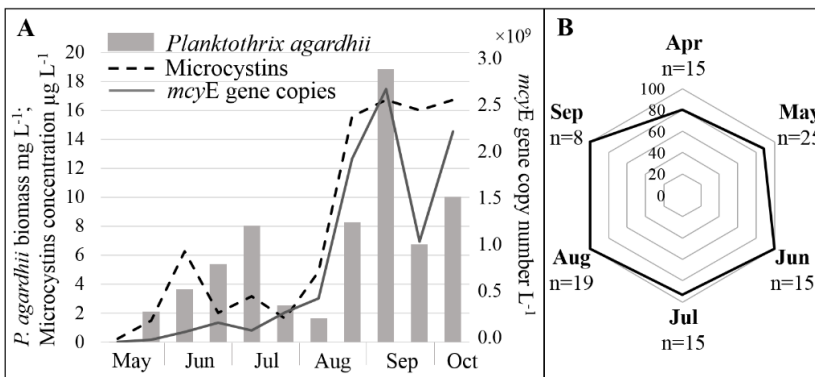
rezultatų duomenimis didžioji dalis (88 % ir 52 %) tirtų *P. agardhii* kamienų taip pat buvo toksiški.



4 pav. Cianotoksinų struktūra (MC variantai, CYN ir ATX) Lietuvos ežeruose, įtrauktuose į bendrą Europos gėlo vandens telkinių tyrimą 2015 m. (pagal Mantzouki et al., 2018b).

Fig. 4. The profile of cyanotoxins (MCs variants, CYN and ATX) in Lithuanian lakes included in snap-shot analysis in 2015 (after Mantzouki et al., 2018a).

Cianotoksinai ir NRP tirti cheminiais ir/arba molekuliniais metodais 274-iose kamienuose, priklausančiuose 15 melsvabakterių rūšių. *Planktothrix agardhii* buvo patvirtinta kaip pagrindinis MC produkuotojas, taip pat MC nustatyti *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae* ir *M. viridis* kamienuose. *P. agardhii* ir *Microcystis* spp. kamienai produkavo tuos pačius keturis MC variantus, nustatytus ir gamtiniuose mėginiuose: dmMC-RR, MC-RR, dmMC-LR ir MC-YR.



5 pav. **A** – *Planktothrix agardhii* biomasės, MC koncentracijos ir *mcyE* geno kopijų skaičius kaita gamtiniuose Širvio ežero mėginiuose 2014 m. **B** – Santykinis *P. agardhii* toksigeninių kamienų skaičius (%) (n – tirtų kamienų skaičius).

Fig. 5. **A** – Variation of *Planktothrix agardhii* biomass, microcystins concentration and *mcyE* gene copy numbers in the environmental samples of Lake Širvys in 2014. **B** – Relative number (%) of toxigenic strains of *P. agardhii* (n – number of strains tested).

Širvio ežero melsvabakterių biomasėje aptikti dideli kiekiai NRP, iš kurių vyravo AP ir AER. Šių NRP sintezė patvirtinta *Planktothrix agardhii* kamienuose. *Aphanizomenon gracile*, *Dolichospermum lemmermannii* ir *Microcystis* spp. kamienai taip pat sintetino NRP. Konkrečių oligopeptidų produkcija buvo specifiška rūšiai ir/ar kamienui. Kiti tyrėjai nurodo, kad visos minėtos rūšys, išskyrus *A. gracile*, gali sintetinti didelę NRP įvairovę (Grabowska et al., 2014; Harke et al., 2016; Kurmayer et al., 2016; Sivonen, Börner, 2008; Welker et al., 2004).

Aphanizomenon gracile yra žinoma kaip STX produkuotojas Europos ežeruose (Pereira et al., 2004; Ballot et al., 2010a; Ledreux et al., 2010). Neurotoksino STX koncentracija sutapo su *A. gracile* biomase. Neurotoksinų paieška buvo vykdyta 123-uose skirtingų melsvabakterių rūšių kamienuose. STX sintetino ir *sxtA* sintetazės

genas buvo nustatyti tik 17% *A. gracile* kamienų iš 63 tirtų. Panašius rezultatus pateikia Ballot ir kt. (2010a) *A. gracile* kamienams, izoliuotiems iš Vokietijos ežerų. ATX-a produkuotojai nebuvo nustatyti. Nors svetimžemės *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, *Chrysosporum bergii* ir *Raphidiopsis mediterranea* gali produkuoti įvairius cianotoksinius (Sembri et al., 2001; Namikoshi et al., 2003; Sabour et al., 2005; Ledreux et al., 2010), tačiau kamienai izoliuoti iš Lietuvos ežerų nebuvo toksiški.

2.4. Aplinkos veiksnių įtaka vietinių ir svetimžemių melsvabakterių vystymuisi ir cianotoksinų sintezei

Klimato šiltėjimas ir antropogeninė eutrofikacija šiuo metu yra didžiausia problema (Huisman et al., 2018). Didėjanti temperatūra reikšmingai veikia fitoplanktono bendrijas ir skatina svetimžemių rūšių įsikūrimą (Sukėnik et al., 2012). Pastaraisiais dešimtmečiais padidėjusi maistinių medžiagų prietaka paspartino eutrofikacijos procesus, kurie nulėmė melsvabakterių bendrijų pokyčius ir vandens ekosistemų „žydėjimus“ (Huisman et al., 2005; Paerl, Fulton, 2006). Gamtinių ir laboratorinių eksperimentinių tyrimų sinergija yra svarbi norint suprasti ir prognozuoti tolesnę kintančių aplinkos veiksnių įtaką vandens „žydėjimų“ tendencijoms (Heisler et al., 2008). Šiame darbe eksperimentiniais tyrimais buvo siekiama įvertinti maistinių medžiagų (P_{min} , N_{min} , N:P) ir temperatūros poveikį vietinių vandens „žydėjimus“ sukeliančių rūšių (*Planktothrix agardhii* ir *Aphanizomenon gracile*) augimo greičiui, toksinų produkcijai ir svetimžemių rūšių (*Sphaerospermopsis aphanizomenoides* ir *Chrysosporum bergii*) įsikūrimo galimybėms.

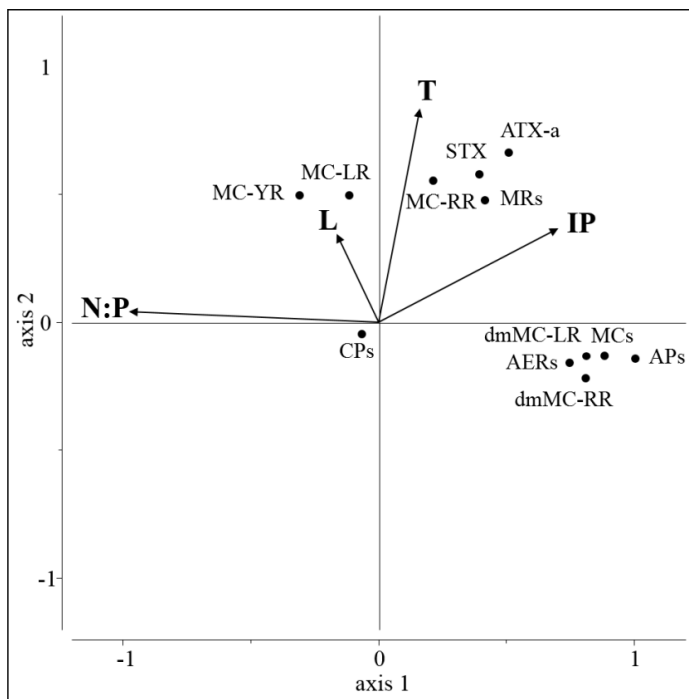
2.4.1. Temperatūros poveikis vandens „žydėjimus“ sukeliančių rūšių augimui ir cianotoksinų produkcijai

Europoje pastaraisiais dešimtmečiais temperatūra pakilo $1,3 \pm 0,11$ °C laipsniu (Kovats et al., 2014) ir iki 2100 m. prognozuojamas 4 °C laipsnių temperatūros padidėjimas (Brown, Caldeira, 2017). Tokios

prognozės kelia nerimą dėl galimo intensyvesnio vandens telkinių „žydėjimo“, svetimžemių rūšių plitimo ir sėkmingo jų įsikūrimo naujose buveinėse. Eksperimentiniai tyrimai parodė, kad temperatūra buvo reikšminga tirtų melsvabakterių rūšių augimo greičiui ($F_{(6,161)}=15,83$, $p<0,001$). Gamtoje atlikti tyrimai ir laboratoriniai eksperimentai su monokultūromis atskleidė panašias vietinių *P. agardhii* ir *A. gracile* rūšių augimo greičio tendencijas plačiame temperatūrų spektre. Tirtuose ežeruose abi rūšys aptinkamos vasaros ir rudens laikotarpiu esant 7,9–26,1 °C vandens temperatūrai, panašiai kaip ir kituose Europos vidutinių platumų ežeruose (10,3–22,6 °C) (Mischke, Nixdorf, 2003; Toporowska et al., 2010, 2016; Karosienė et al., 2019). Kitų autorių eksperimentiniai tyrimai parodė, kad optimali temperatūra *P. agardhii* kamienų augimui buvo 27 °C ir *A. gracile* – 28 °C (Mehnert et al., 2010; Lürling et al., 2013; Gomes et al., 2015).

Sphaerospermopsis aphanizomenoides ir *Chrysoosporum bergii* yra mažai ištirtos svetimžemės melsvabakterių rūšys, neseniai išplitusios Europoje (Meriluoto et al., 2017; Kokociński, Soininen, 2019). Lietuva yra šiauriausias šių rūšių paplitimo taškas (Koreivienė, Kasperovičienė, 2011; Savadova et al., 2018). *C. bergii* pirmą kartą Lietuvoje aptikta 2008 m. Gineitiškių ežere, rūšis sudarė nežymią biomasės dalį (0,26 mg/l; Koreivienė, Kasperovičienė, 2011). *S. aphanizomenoides* pirmą kartą Lietuvoje aptikta šio tyrimo metu. Jiezno ežere rūšies biomasė siekė 1,03 mg/l, Širvio ežere aptikti tik pavieniai individai. Dažniausiai minėtos svetimžemės rūšys aptinkamos mažais kiekiais ir Europos ežeruose (Stūken et al., 2006; Ledreux et al., 2010; Kokociński, Soininen, 2019). Tačiau panašu, kad *S. aphanizomenoides* greitai įsitvirtina naujose buveinėse, o biomasė gali siekti iki 22,3 mg/l (iki 62 % bendros fitoplanktono biomasės) (Budzyńska, Gołdyn, 2017). Eksperimentų rezultatai parodė didesnę abiejų rūšių augimo greitį prie aukštesnių temperatūrų, tačiau *S. aphanizomenoides* geba vystytis platesniame temperatūros diapazone (20–30 °C) lyginant su *C. bergii* (26–30 °C). Panašius rezultatus paskelbė Mehnert et al. (2010), *S.*

aphanizomenoides kamienams optimali augimo temperatūra nustatyta 29 °C, *C. bergii* – 26 °C.



6 pav. Cianotoksinų ir neribosominių peptidų kiekio ir aplinkos veiksnių tarpusavio sąveika, pritaikius daugiamatės statistikos (RDA) analizę.

Aplinkos veiksniai: T – paviršinio vandens sluoksnio temperatūra; N:P – mineralinio azoto ir fosforo atominis santykis; IP – mineralinis fosforas; L – šviesos intensyvumas. **Antriniai metabolitai:** STX – saxitoksinas; ATX-a – anatoksinas-a; MCs – mikrocistina; APs – anabaenopeptinai; AERs – aeruginozinai; CPs – cianopeptolinai, MRs – mikroglininas.

Fig. 6. Redundancy analysis (RDA) biplot showing interaction between environmental factors as explanatory variables and cyanotoxins also bioactive NRPs amount.

Environmental variables: T – surface water temperature; N:P – atomic ratio of inorganic nitrogen and phosphorus; IP – inorganic phosphorus; L –

illumination. **Secondary metabolites:** STX – saxitoxin; ATX-a – anatoxin-a; MCs – total microcystins concentration; APs – anabaenopeptins; AERs – aeruginosins; CPs – cyanopeptolins, MRs – microginins.

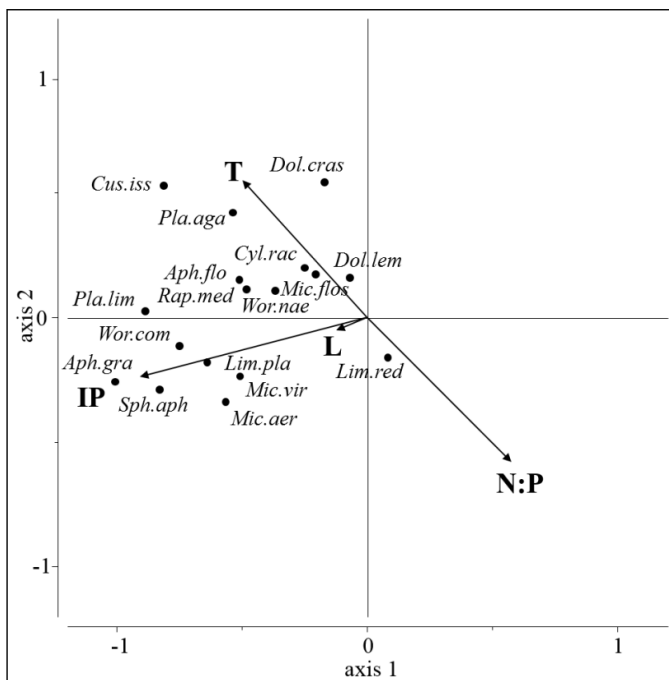
Svarbu nustatyti ne tik globalaus atšilimo poveikį skirtingų melsvabakterių rūšių dominavimui, bet ir jų „žydėjimų“ toksiškumui. Temperatūra nėra reikšmingas veiksnys cianotoksinų koncentracijai tirtuose ežeruose ir teigiamai koreliavo tik su ATX-a kiekiu (6 pav.). Ekperimentų rezultatai parodė, kad temperatūra įtakojo *P. agardhii* rūšies MC ir NRP sintezę, didžiausi toksinų antrinių metabolitų kiekiai biomasėje nustatyti prie žemesnių 18–24 °C temperatūrų. Lürling ir kt. (2017), Bui ir kt. (2018) nustatė, kad temperatūrai didėjant MC koncentracija *Microcystis* kamieno biomasėje mažėjo. Tačiau Gianuzzi ir kt. (2016) rezultatai parodė didesnį viduląstelinio MC kiekį *M. aeruginosa* kamieno prie 29 °C temperatūros nei esant 26 °C.

2.4.2. Maistinių medžiagų poveikis vandens „žydėjimus“ formuojančių rūšių augimui ir cianotoksinų produkcijai

Fosforas ir azotas kontroliuoja vandens „žydėjimų“ procesus ir jų intensyvumą (Paerl et al., 2008; Paerl, Huisman, 2009). Širvio ežero fitoplanktone dominuojanti *Planktothrix agardhii* intensyviai vystėsi esant $P_{\min}$ koncentracijoms 0,011–0,052 mg P/l ir $N_{\min}$ 0,17–0,33 mg N/l. Kitų šaltinių duomenimis, *P. agardhii* Europos ežeruose dažniausiai dominuoja esant $P_{\min}$ koncentracijoms 0,020–0,158 mg P/l (Yéprémian et al., 2007; Toporowska et al., 2018). Panašūs duomeys gauti eksperimentiniuose tyrimuose, kurie parodė, kad didžiausias šios rūšies augimo greitis buvo esant eutrofinėms-hipertrofinėms sąlygoms ir N:P santykiui 30:1.

Jiezno ežere dominuojanti *Aphanizomenon gracile* vystėsi esant $P_{\min}$ koncentracijoms 0,021 mg P/l, ir $N_{\min}$ 0,070 mg N/l. Nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas ryšys tarp $P_{\min}$ ir *A. gracile* biomasės tirtuose ežeruose (7 pav.). *A. gracile* augimo greitis palaipsniui didėjo didėjant $P_{\min}$ koncentracijai eksperimentinėmis

sąlygomis, tačiau N:P santykis nebuvo reikšmingas (8 pav.). Dolman ir kt. (2012) rezultatai parodė, kad *A. gracile* augo vienodai gerai plačiose N ir P koncentracijų ribose, todėl tikėtina, kad rūšis yra prisitaikiusi prie skirtingų aplinkos sąlygų.



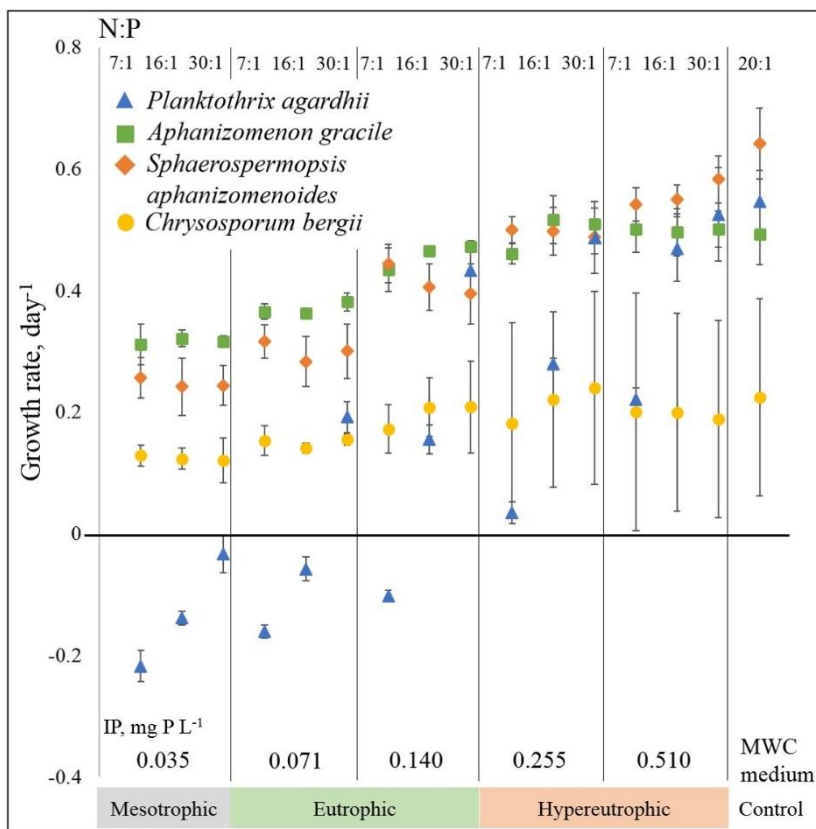
7 pav. Cianotoksinus produkuojančių melsvabakterių rūšių biomasės ir aplinkos veiksnių tarpusavio sąveika, pritaikius daugiamatės statistikos (RDA) analizę.

Fig. 7. Redundancy analysis (RDA) biplot showing interaction between the environmental factors as explanatory variables and potential toxin producing cyanobacterial species biomass.

Environmental variables: T – surface water temperature; N:P – atomic ratio of inorganic nitrogen and phosphorus; IP – inorganic phosphorus; L – illumination.

Species: *Mic. aer* – *Microcystis aeruginosa*; *Mic. flos* – *Microcystis flos-aquae*; *Mic. vir* – *Microcystis viridis*; *Wor. com* – *Woronichinia compacta*;

Wor. nae – *Woronichinia naegeliana*; *Aph. gra* – *Aphanizomenon gracile*; *Sph. aph* – *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*; *Dol. cra* – *Dolichospermum crassum*; *Dol. lem* – *Dolichospermum lemmermanii*; *Aph. flos* – *Aphanizomenon flos-aquae*; *Cus. iss* – *Cuspidothrix issatschenkoi*; *Raph. med* – *Raphidiopsis mediterranea*; *Cyl. rac* – *Cylindrospermopsis raciborskii*; *Pla. lim* – *Planktolyngbya limnetica*; *Lim. pla* – *Limnithrix planctonica*; *Lim. red* – *Limnithrix redekei*; *Pla. aga* – *Planktothrix agardhii*.



8 pav. Skirtingų maistinių medžiagų koncentracijų ir N:P santykio poveikis vietinių ir svetimžemių rūšių augimo greičiui prie 24 °C temperatūros.

Fig. 8. Growth rates (day⁻¹) of native and alien cyanobacteria species cultured under different nutrient concentrations and N:P ratio at 24 °C.

Maistinių medžiagų eksperimentas parodė, kad $P_{\min}$ buvo reikšmingas veiksnys *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* augimo greičiui; teigiamas poveikis šiai rūšiai buvo didesnis nei *Chrysosporum bergii*. Remiantis Sabour ir kt. (2009) atliktais eksperimentais, *S. aphanizomenoides* taip pat pasiekė maksimalų augimo greitį prie didesnių maistinių medžiagų koncentracijų. Budzyńska, Góldyn (2017) fitoplanktono tyrimai patvirtino, kad *S. aphanizomenoides* pasižymi dideliu poreikiu maistinėms medžiagoms. Kokociński, Soininen (2019) gamtiniai tyrimai parodė, kad *C. bergii* geriau vystosi ežeruose, esant didesnėms fosforo koncentracijoms. Tačiau, šiame darbe atlikti eksperimentai neparodė šios rūšies reikšmingo augimo skirtumo prie didesnių maistinių medžiagų kiekio.

Pagal stoichiometrijos teoriją (Van der Waal et al., 2014), N ir/ar P trūkumas lemia konkrečių antrinių metabolitų sintezę, tačiau maistinių medžiagų pertekliaus sąlygoms produkuojamus junginius yra sunkiau nuspėti. Kai kurie tyrimai parodė, kad esant dideliame N kiekiui, tikėtinas toksiškesnis vandens „žydėjimas“, nes tokioje aplinkoje skatinamas toksinių kamienų augimas (Vézie et al., 2002) ir nustatytos didesnės MC sintezės galimybės (Welker et al., 2007; Davis et al., 2010). Tyrimų rezultatai Širvio ir Jiezno ežeruose parodė, kad N:P santykis buvo reikšmingas veiksnys cianotoksinų ir biologiškai aktyvių NRP kiekiui (6 pav.) ir neigiamai koreliavo su MC, dmMC-RR, dmMC-LR, AP ir AER. Panašios tendencijos gautos ištyrus *Planktothrix agardhii* kamienus eksperimentų metu; nustatytas neigiamas ryšys tarp $P_{\min}$ koncentracijos ir dmMC-RR, AP bei CP kiekiu ($r = -0,86$, $r = -0,81$ and $r = -0,85$, $p < 0,05$, atitinkamai).

Fosforo koncentracija kartu su kitais aplinkos veiksniais galimai gali reguliuoti STX sintezę (Kellmann et al., 2008). Šio tyrimo gamtinės medžiagos rezultatai parodė, kad STX kiekis teigiamai

koreliavo su $P_{\min}$ koncentracijomis. Tačiau atlikta regresinė analizė su eksperimentų duomenimis neatskleidė ryšio tarp *Aphanizomenon gracile* augimo greičio, $P_{\min}$ koncentracijų, N:P santykio su STX koncentracijomis.

2.5. Aplinkos veiksnių poveikis tarprūšinei konkurencijai

Gėlavandenėse ekosistemose eutrofikacija ir klimato šiltėjimas melsvabakterių bendrijas veikia kartu (O'Neil et al., 2012), todėl eksperimentiniai tyrimai, apjungiantys abiotinius ir biotinius veiksnius, leistų įvertinti bendrą poveikį vandens „žydėjimų“ formavimuisi. Siekiant atskleisti vietinių vandens „žydėjimus“ sukeliančių ir svetimžemių melsvabakterių rūšių konkurencijos ypatumus, sumaišytos dviejų skirtingų melsvabakterių kamienų kultūros augintos esant skirtingoms maistinių medžiagų koncentracijoms, būdingoms eutrofiniams ir hipertrofiniams vandens telkiniams dabartinio (20 °C) ir šiltėjančio (24 °C) klimato sąlygomis.

Eksperimentinis tyrimas patvirtino, kad maistinių medžiagų koncentracija turėjo didžiausią poveikį skirtingų rūšių biomasės kiekiui ir tarprūšinei konkurencijai ($F_{(1, 112)} = 29,50$, $p < 0,001$), tačiau atskirais atvejais temperatūra ir konkreti rūšis buvo svarbūs veiksniai ($F_{(1, 112)} = 23,10$, $p < 0,001$ ir $F_{(3, 112)} = 14,02$, $p < 0,001$, atitinkamai). Eksperimentiniai tyrimai parodė, kad N ir P koncentracijos gali lemti dominuojančių vietinių rūšių biomasės pokyčius, t.y. *A. gracile* nukonkuruotų *P. agardhii* esant maistinių medžiagų trūkumui. Dolman ir kt. (2012) nurodo, kad abi rūšys intensyviai augo plačiose maistinių medžiagų koncentracijų ribose. *A. gracile* gali fiksuoti molekulinį azotą, o *P. agardhii* kaupia mineralinius N ir P junginius biomasėje, tokiu būdu gali augti aplinkoje esant maistinių medžiagų trūkumui (Reynolds, 2006; Van de Waal et al., 2010).

Ma et al. (2015) nustatė, kad alelopatija gali lemti dominuojančių melsvabakterių rūšių sezoninius pokyčius. Kiti tyrėjai taip pat įrodė

antrinių metabolitų svarbą tarprūšinei melsvabakterių konkurencijai (Rzymiski et al., 2014; Ma et al., 2015; Briand et al., 2018). Šio eksperimento metu pirmą kartą buvo nustatytas vietinių *A. gracile* melsvabakterių slopinantis poveikis *P. agardhii* ir svetimžemių *S. aphanizomenoides*, *C. bergii* rūšių augimui. Rūšių konkurencijos eksperimentas skirtingomis abiotinėmis sąlygoms tiksliau atspindėjo situaciją ežeruose nei eksperimentai su monokultūromis ir atskleidė, kad vidutinių platumų ežeruose paplitusi *A. gracile* gali slopinti svetimžemių rūšių įsikūrimą.

IŠVADOS

1. Širvio ir Jiezno ežeruose melsvabakterių biomasė (iki 29,2 ir 24,7 mg/l, atitinkamai) viršijo maudykloms leistinas didžiausias koncentracijas, atitinkančias aukštą pavojaus lygį. Rūšys, priklausančios Nostocales ir Oscillatoriales eilėms, formavo vandens „žydėjimus“ liepos–rugsėjo/spalio mėn. Aptikta devyniolika potencialiai cianotoksinus produkuojančių rūšių, kurių bendra biomasė fitoplanktone sudarė iki 76–98 %. *Planktothrix agardhii* dominavo (iki 28,1 mg/l) Širvio ežere, vandens „žydėjimą“ Jiezno ežere formavo *Aphanizomenon gracile* (iki 12,7 mg/l), *Limnothrix planctonica* (iki 7,5 mg/l) ir *Planktolygbya limnetica* (iki 5,5 mg/l).
2. Maksimalios atskirų viduląstelių cianotoksinų koncentracijos tirtuose ežeruose neviršijo rekomenduojamų reikšmių gėlavandeniams telkiniams, tačiau nustatytas suminis cianotoksinų kiekis gali būti pavojingas žmonių sveikatai ir biotai. Hepatotoksinams priklausančių mikrocistinų (MC) koncentracija rugsėjo/spalio mėnesiais Širvio ežere siekė 16,72 µg/l (dominavo dmMC-RR), o Jiezno ežere sudarė 0,96 µg/l (dominavo MC-RR variantas). Didžiausios neurotoksinų grupės saksitoksino (STX, 1,06 µg/l) ir anatoksino-a (ATX-a, 0,97 µg/l) bei citotoksino cilindrospermopsino (CYN, 0,38 µg/l) koncentracijos nustatytos liepą/rugpjūtį. Bendras neribosominių peptidų (NRP) kiekis Širvyje

buvo 3,5 karto didesnis nei Jiežno ežere. STX, ATX-a, CYN ir NRP pirmą kartą nustatyti Lietuvos ežeruose.

3. Gamtinės medžiagos analizė ir izoliuotų kamienų tyrimai patvirtino, kad *Planktothrix agardhii* ir *Aphanizomenon gracile* yra pagrindiniai cianotoksinų MC ir STX produkuotojai, atitinkamai. *mcyE* genas aptiktas 93 % tirtų *P. agardhii* kamienų. *sxtA* genas ir STX sintezė nustatyta 17 % tirtų *A. gracile* kamienų. MC produkuotojais taip pat patvirtinti *Microcystis viridis*, *M. aeruginosa* ir *M. flos-aquae* kamienai. NRP sintetino *A. gracile*, *Dolichospermum lemmermannii*, *P. agardhii* ir *Microcystis* spp. rūšims. ATX-a produkuotojai nebuvo nustatyti. Tirtuose ežeruose aptiktos svetimžemės rūšys *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Chrysosporum bergii* buvo netoksinės.

4. Vietinių melsvabakterių rūšių augimo greitis buvo panašus eksperimentiškai testuotų temperatūrų ribose (18–30 °C). Svetimžemės rūšys greičiausiai augo prie aukščiausių temperatūrų, tačiau *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* vystymuisi buvo palankus platus 20–30 °C temperatūrų diapazonas. *Aphanizomenon gracile* ir *S. aphanizomenoides* augimo greitis buvo didžiausias nepriklausomai nuo testuotų maistinių medžiagų koncentracijų, mažesnis greitis nustatytas *Chrysosporum bergii*. Visų tirtų rūšių augimo greitis teigiamai koreliavo su $P_{\min}$ koncentracija, tik *Planktothrix agardhii* buvo jautri maistinių medžiagų trūkumui ir mažam N:P santykiui.

5. Statistiškai reikšminga neigiama koreliacija nustatyta tarp temperatūros ir MC bendros koncentracijos bei NRP kiekio *Planktothrix agardhii* biomasėje eksperimentiniuose tyrimuose. STX kiekis *Aphanizomenon gracile* kamieno biomasėje nekoreliavo su tirtomis temperatūromis ir maistinių medžiagų koncentracijomis.

6. Maistinių medžiagų koncentracija turėjo didesnę įtaką tarprūšinei konkurencijai nei temperatūra ar rūšies biologiniai ypatumai. Vietinės *Planktothrix agardhii* ir *Aphanizomenon gracile* rūšys konkuravo dėl maistinių medžiagų. *A. gracile* slopino vietinės *P. agardhii* ir svetimžemių rūšių augimą, o svetimžemė

Sphaerospermopsis aphanizomenoides neigiamai veikė *P. agardhii* vystymąsi.

7. Gamtiniai ir laboratoriniai tyrimai atskleidė, kad P_{min} yra reikšmingesnis veiksnys melsvabakterių augimui ir biomasės formavimui lyginant su temperatūra. Tačiau abu veiksniai buvo svarbūs cianotoksinų ir NRP kiekybiniais ir struktūros pokyčiams.

SUMMARY

INTRODUCTION

Cyanobacteria are autotrophic ancient prokaryotes that form blooms almost in all continents including Europe (Merel et al., 2010; Meriluoto et al., 2017). Species from over the forty genera have ability to produce cyanotoxins (Carmichael et al., 2001). Worldwide blooms are recognized as a major water quality management issue limiting water resource availability for drinking use, recreational purposes (Carmichael et al., 2001), cause economic losses (Ho et al., 2012) and posing serious health problems or even death to humans and biota (Buratti et al., 2017). The toxicity of cyanobacteria bloom depends on cyanobacteria species and their biomass, the ability to produce toxic metabolites (Buratti et al., 2017) and number of toxic individuals in the population (Kardinaal et al., 2007).

Global challenges such as climate warming and anthropogenic eutrophication will primarily affect more vulnerable ecosystems such as shallow temperate lakes stimulating harmful cyanobacteria proliferation (Kosten et al., 2012). Increase of temperature and nutrient concentrations have been suggested as top drivers that shift cyanobacteria composition, amount as well as intensify bloom events and alien species establishment (Pearl and Huisman, 2008; Carey et al., 2012; Sukenik et al., 2015). Combined field and laboratory experimental studies have revealed more accurate predictions addressing ecological, physiological and molecular mechanisms of cyanotoxin accumulation in freshwaters that are of primary

importance for providing a solid background for practical recommendations of bloom management (El-Shehawy et al., 2012; Humbert and Fastner, 2017).

Aim: To investigate diversity, biomass dynamics of potentially toxic bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins profile variations in response to environmental variables under field and laboratory experimental studies.

Objectives:

1. To investigate the diversity and biomass dynamics of potentially toxic bloom-forming cyanobacteria in two shallow eutrophic lakes.
2. To study qualitative and quantitative variations in cyanotoxins and bioactive non-ribosomal peptides during cyanobacteria vegetation period.
3. To identify cyanobacteria species responsible for cyanotoxin production and evaluate the proportion of toxic/non-toxic genotypes in the studied lakes.
4. To determine experimentally, the significance of temperature and nutrient availability on the growth of native and alien cyanobacteria strains, the contents of cyanotoxins and interspecies competition.

Defence statements:

1. Single or a few potentially toxic cyanobacteria species dominate and form intense blooms in summer and early autumn in shallow eutrophic temperate lakes.
2. High diversity of potentially toxic cyanobacteria species gives a broad profile of cyanotoxins and non-ribosomal peptides in eutrophic lakes, however, dominant species reflect prevalent toxic secondary metabolites.
3. Production of cyanotoxins and non-ribosomal peptides in cyanobacteria are species and/or strain specific.

4. Temperature and nutrients affect differently the growth rate, production of cyanotoxins, non-ribosomal peptides and interspecies competition of native and alien cyanobacteria.

Novelty of the work. The strength and novelty of this work is the interrelation of field and laboratory experimental studies on local cyanobacteria at strain level to investigate harmful blooms. The study also diminishes disproportionality of knowledge on cyanotoxins and bioactive non-ribosomal peptides in European freshwaters providing a profile of toxic secondary metabolites. Additionally, the data from the lakes sampled by standardized manner of snapshot survey performed across 28 European countries allowed to compare profile of cyanotoxins with those in other 135 lakes of the continent. The study substantially contributes to quantitative and qualitative data on cyanotoxins of STX, ATX-a, CYN and NRPS insufficiently studied Lithuanian freshwaters and cyanobacteria strains. Up to 300 strains of potential toxic bloom-forming native and alien species were isolated and tested for their ability to synthesize cyanotoxins. The presence of listed cyanotoxins and alien *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* species in Lithuanian freshwaters were recorded for the first time. It also provides novel data on distribution, productivity and ability of toxin production of recently expanded alien to Europe cyanobacteria species disclosing their competitive abilities with native species and possibility to establish into temperate lakes under changing environmental conditions.

Relevance of the study. Recent global warming aggravates anthropogenic eutrophication effect that subsequently intensifies blooms in freshwater ecosystems making predictions, control and management more complicated. The combined effect of climate warming and eutrophication promoting blooms can be understood applying complex field and laboratory experimental investigations.

Presentation of the results. The results were presented at three international conferences. Four papers published and one under

review that correspond to ISI Web of Science. Two scientific publications were published in other periodical refereed journals.

Volume and structure of the dissertation. The dissertation consists of the following chapters: Introduction, Literature Review, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References (327 literature sources). Volume of the dissertation is 122 pages, illustrated with 10 tables and 20 figures. The dissertation is written in English with the summary in Lithuanian and English.

Acknowledgements. I express my sincere gratitude to my supervisor Dr. Judita Koreivienė for the continuous support, patience, invaluable advice during research and the thesis writing. I largely appreciate the contributions of my colleagues Dr. Jūratė Karosienė, Dr. Jūratė Kasperovičienė, Dr. Irma Vitonytė for the support during the expeditions, experiments and valuable comments to the monograph. I am grateful to Violeta Ptašekienė for editing the thesis English language. I gratefully thank my former supervisor Dr. Ričardas Paškauskas for encouragement and consultations. I exclusively thank the reviewers Dr. Sigita Jurkonienė, Assoc. Prof. Dr. Renata Pilkaitytė for detailed analysis, constructive suggestions and comments, which helped to improve the work.

My sincere appreciation goes to Prof. Dr. Hab. Hanna Mazur-Marzec (University of Gdańsk, Poland) for provided opportunity to join the team several times as intern and develop skills in LC-MS/MS analysis, molecular methods, to perform secondary metabolites and cyanotoxin genes analysis and highly valuable advice on the data analysis. For warm acceptance and great help in this laboratory, I thank Dr. Anna Toruńska-Sitarz, Dr. Agata Błaszczyk, Dr. Justyna Kobos and Anna Krakowiak. I also greatly appreciate the possibility and valuable experience during the internship in Finland under the supervision of Prof. Kaarina Sivonen (University of Helsinki, Finland). I am highly grateful for the help and contribution in performing genetic analysis to Dr. Suvi Suurnäkki, and LC-MS/MS analysis to Dr. Matti Wahlsten during the visit.

Financial support for Short Term Scientific Missions (STSMs) were funded by COST programme (ES1408 EUAlgae and ES1105 CYANOCOST) and the internship – by Education Exchanges Support Foundation. Research Council of Lithuania assigned scholarship in 2017 and 2018, also funded participation at the 11th International Phycological Congress.

I thank my family: my husband, parents and sister for their patience and supporting me throughout doctoral studies and thesis writing.

List of abbreviations:

AERs – aeruginosins, **APs** – anabaenopeptins, **ATX-a** – anatoxin-a, **Cyanotoxins** – toxins produced by cyanobacteria, **CYN** – cylindrospermopsin, **CPs** – cyanopeptolins, **IN** – inorganic nitrogen, **IP** – inorganic phosphorus, **MCs** – microcystins, **N** – nitrogen, **NRPs** – bioactive non-ribosomal peptides, **P** – phosphorus, **STX** – saxitoxin.

1. MATERIALS AND METHODS

The object of the study was bloom-forming cyanobacteria and production of cyanotoxins and bioactive non-ribosomal peptides (NRPs).

Determination of physico-chemical parameters, *chl-a* and phytoplankton analysis, isolation of cyanobacteria strains as well as all experiments were carried out at the Nature Research Centre (Lithuania). Analysis of secondary metabolites structure (cyanotoxins, quantitative analysis and NRPs evaluation using LC-MS/MS) and molecular analysis (sequencing of 16S rRNA, *PC-IGS* and *sxtA* gene) were performed at the Division of Marine Biotechnology under supervision of Prof. Dr. Hab. H. Mazur-Marzec (University of Gdańsk, Faculty of Oceanography and Geography, Poland). Cyanotoxin analysis and molecular analysis (qPCR

analysis, detection of *mcyE*, *anaC* genes) were performed at the Department of Food and Environmental Sciences under supervision of Prof. K. Sivonen (University of Helsinki, Finland).

Study area. The study was carried out in two shallow eutrophic water bodies: Lake Širvys (54° 59' 16.27", 25° 12' 54.13") and Lake Jieznas (54° 35' 33.67", 24° 10' 48.95") situated in Lithuania. Lake Širvys is assigned as problematic and Lake Jieznas is referred as lake with critical conditions water bodies due to past and present farming, agriculture and urbanization (Balevičius, 2009). Lakes are highly important for the local communities used for recreation and fishing.

Surface water sampling and phytoplankton analysis. Samplings and measurement of physico-chemical parameters were performed from April to November in Lake Širvys (2014 – 2015, biweekly) and Lake Jieznas (2015, monthly). Chlorophyll-*a* (chl-*a*) was evaluated using a fluorometer. Phosphorus and nitrogen and their forms were analysed in „Vandens tyrimai“. Air temperature and precipitation data of Vilnius Meteorological Station were provided by Lithuanian Hydrometeorological Service.

Surface water samples (n=34) were preserved with formaldehyde and analyzed according to Olrik ir kt. (1998). Cyanobacteria species were identified and classified, after Komárek and Anagnostidis (1998; 2005), Komárek (2013).

Water column sampling for phytoplankton and cyanotoxins. To reveal the differences of cyanobacteria biomass and cyanotoxin profile in the water column of Lakes Širvys and Jieznas, the one per lake integrated sample (n=2) was added to the surface water sampling in August 2015. For phytoplankton analysis, the lake water was fixed with Lugol's solution and investigated by Utermöhl's method (Utermöhl, 1958). Chl-*a* was evaluated by fluorometer. MCs, CYN and ATX analysis were performed at dedicated laboratories in the Netherlands and Germany. The detailed methodological information is provided in Mantzouki et al. (2018a). The samplings and analysis were performed by fully standardized manner for

snapshot survey by implementing European Multi Lake Survey project (Mantzouki et al., 2018b).

Isolation of cyanobacteria strains. Totally, 274 strains of 15 cyanobacteria species (potential cyanotoxin MCs, STX, ATX-a and/or CYN producers) were isolated in order to reveal presence of cyanotoxins, their genes, and for the experiments. The cultures were maintained in MWC medium (Lebret et al., 2012) at 20°C, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination and 12:12 day:night regime.

Analysis of cyanotoxins and non-ribosomal peptides. Cyanotoxins and NRPs were analysed in cyanobacteria material collected from lakes' surface water layer (n=34) and in the biomass of isolated strains (n=57). The extraction of MC, NRPs, ATX-a and CYN was performed using 75% methanol. The STX was extracted with a mixture containing ammonium formate buffer and acetonitrile (95:5, v/v). The analysis was performed using liquid chromatography tandem with mass spectrometer LC-MS/MS as described in Grabowska et al. (2014) and Chernova et al. (2017). Data were analysed using Analyst QS® 1.5.1 software.

Microcystin (*mcyE*) gene copy number evaluation in field samples. For detection of specific to *Planktothrix mcyE* gene copy number, the phytoplankton biomass from Lake Širvys was collected biweekly during April–October in 2014 on GF/F filters (n=13). The DNA was extracted following PowerWater®DNA Isolation Kit. The quantification of *mcyE* gene was performed using quantitative real-time PCR analysis according to Vaitomaa et al. (2003), Rantala et al. (2006; 2008).

***Aphanizomenon sensu lato* strains molecular analysis.** Due to morphological similarities between *Aphanizomenon sensu lato* species strains molecular analysis of partial 16S rRNA and PC-IGS was performed in 22 strains belonging to *A. gracile*, *A. flos-aquae*, *S. aphanizomenoides*. The DNA was extracted using FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). For this work, 16S–23S rRNA fragment with internal transcribed spacer was amplified according to Nübel et al. (1997), Lepère et al. (2000) and

Koskenniemi et al. (2007). Amplification of the phycocyanin *cpcB-cpcA* intergenic spacer was performed based on Neilan et al. (1995) and partial saxitoxin synthetase gene, was amplified according to Ballot et al. (2010a).

All PCR products were visualized by 1% 1 × TBE agarose gel electrophoresis. The amplified products were purified with Extractme® DNA clean-up Kit (Blirt S.A., Gdańsk, Poland) and sequenced (Genomed S.A., Warszawa, Poland). Nucleotide sequences were submitted to the GenBank database.

***mcyE* or *anaC* gene analysis in strains.** Strains (n=141) of *P. agardhii*, *Microcystis* spp. ir *Dolichospermum crassum* species were examined in order to check the presence of genes. The cultures biomass was centrifuged at 8000 rpm for 6–12 min.. DNA was extracted using E.Z.N.A SP Kit. The specific primers for *mcyE* gene (Rantala et al., 2006; Vaitomaa et al., 2003) and *anaC* (Rantala-Ylinen et al., 2011) detection were used. The amplified products were separated on a 1% TAE agarose gel.

Experimental approach. The experiments were carried out to assess impact of temperature, nutrients on cyanobacteria growth, cyanotoxins and bioactive NRPs production, and species competitive abilities. The experiments were performed with native and alien cyanobacteria strains isolated from Lithuanian lakes (Table 1.). All experiments were performed at the day cycle (16:8 light:dark) and light intensity ($\sim 90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in growth chambers. The growth rate was evaluated based on chl-*a* as a proxy of biomass using a fluorometer every other day. An initial concentration $10 \pm 0.5 \mu\text{g chl-}a \text{ L}^{-1}$ per strain was used. At the end of the experiments I and II, each treatment triplicate (n=3) were mixed, centrifuged at 7000 rpm and freeze-dried for evaluation of cyanotoxins and NRPs as described above.

Experiment I: Temperature effect. Temperatures ranging from 18°C to 30°C with intervals of 2°C were tested to examine temperature effect on growth of cyanobacteria strains, production of secondary metabolites (toxins, bioactive NRPs) (Fig. 1., A). The

cultures were maintained in MWC medium and acclimated for two days prior the 14 day experiment.

Experiment II: Nutrients effect. The effect of inorganic nitrogen and phosphorus concentrations, their atomic ratio (N:P) on growth rate of strains, production of cyanotoxins and bioactive NRPs was examined. According to Wetzel (1983), tested phosphorus (P) concentration 0.035 mg P L⁻¹ corresponded to mesotrophic lakes; 0.071 and 0.140 mg P L⁻¹ – eutrophic; 0.255 and 0.51 mg P L⁻¹ – hypertrophic (Fig. 1, B) temperate lakes. Nitrogen (N) was added in the treatments according to N:P ratio of 7:1; 16:1 and 30:1. Before 12 days experiment, cyanobacteria strains were maintained for 3 days in MWC medium free of N and P elements at 24°C temperature.

Experiment III: Interspecies competition. Competitive properties of native *P. agardhii* and *A. gracile* cyanobacteria species (toxic strains) and their ability to cope with alien *S. aphanizomenoides* and *C. bergii* species under current (20°C) climate conditions and in predicted warming (24°C) and eutrophication scenarios (P 0.140; 0.51 mg P L⁻¹ at N:P ratio of 30:1) were assessed. Four strains, one of each tested species, were co-cultured in pairs for 12 days for the evaluation of their biomass changes (Fig. 1., C). The aliquot of 1 ml was removed from each treatment every fourth day and preserved with formaldehyde and cyanobacteria biomass was counted according to Olrik et al. (1998). The strains were maintained for three days in MWC medium free of N and P elements at respective temperatures prior the experiment.

Statistical analysis. General linear model (GLM) and the linear regression analyses were processed using STATISTICA 6.0 and Redundancy analysis (RDA) was performed by Brodgar 2.7.5. softwares.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Cyanobacteria blooms and bloom-forming species

Since early 1980s proliferation of toxic cyanobacteria in Europe has already been recognized as a growing problem (Skulberg et al., 1984). Recently, harmful cyanobacteria blooms is a global problem, therefore, the diversity and dynamics of cyanobacteria in phytoplankton have been extensively investigated in freshwaters. Still, some key questions are open and the recent cyanotoxin poisonings in continent clearly illustrate serious health hazard to the human population (Meriluoto et al., 2017).

Maximum total biomass of cyanobacteria in both lakes (up to 29.2 mg L⁻¹ in Lake Širvys and up to 24.7 mg L⁻¹ in Lake Jieznas; Fig. 2) was two times greater than high alert level threshold (12 mg L⁻¹) assessed to bathing waters (WHO, 2003). Similar or higher biomass of cyanobacteria has been found in other Lithuanian (up to 30 mg L⁻¹; Kasperovičienė, 2007) and European lakes (up to 200 mg L⁻¹; Dembowska, 2011; Humbert and Fastner, 2017; Stoyneva-Gärtner et al., 2017). Cyanobacteria comprised up to 98% of total phytoplankton biomass during the blooms that appeared in summer and/or autumn in the studied lakes. It is also in line with the studies in Lithuanian freshwaters (50–96%; Kavaliauskienė, 1996; Kasperovičienė et al., 2005) and in other European water bodies (> 90%; Yéprémian et al., 2007; Grabowska et al., 2014). Nineteen species of potentially toxic cyanobacteria belonging to *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Woronichinia*, *Limnothrix*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Raphidiopsis*, *Sphaerospermopsis*, *Planktolyngbya* were found in the lakes. *Planktothrix agardhii* and *Aphanizomenon gracile* species dominated in the studied shallow lakes. Those species are related to frequently mixed shallow turbid eutrophic freshwaters (Häggqvist et al., 2017).

In Lake Širvys, the biomass of *P. agardhii* reached up to 28 mg L⁻¹ (max. 97% of total phytoplankton biomass in September). In eutrophicated German and Polish freshwaters, species forms the highest biomass (from 15 to 70 mg L⁻¹) in autumn reaching up to 78–100% of total phytoplankton biomass (Rücker et al., 1997; Grabowska et al., 2014). Lake Jieznas is described as hypertrophic lake, where cyanobacteria species *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Dolichospermum macrospora* dominate (Kavaliauskienė, 1996). These species have been replaced recently by dominant *Aphanizomenon gracile* and prevailing *Limnithrix planctonica*, *Planktolygbya limnetica*. Similar prevailing species composition is also characteristic of shallow eutrophic Lake from Poland (Zębek, 2006). Maximum *A. gracile* biomass was 12.7 mg L⁻¹ in August (max. 45% of total phytoplankton biomass) (Fig. 2). In other European lakes, *A. gracile* is frequent and dominant species that form biomass up to 15–33 mg L⁻¹ and comprise up to 80% of total phytoplankton biomass (Rücker et al., 2007; Mischke and Nixdorf, 2003).

2.2. The profile of cyanotoxins and non-ribosomal peptides

Meriluoto et al. (2017) have highlighted disproportionalities in the knowledge about MCs versus other cyanotoxins in Europe. Potentially toxic cyanobacteria species that dominated in the studied lakes determined different profiles of cyanotoxins and their seasonal variation. In general, concentrations of MCs, ATX-a and NRPs were significantly higher in Lake Širvys along cyanobacteria growth season, whereas STX occurred mainly in August and the concentrations were similar in both lakes (Fig. 3). ATX-a, STX and bioactive NRPs were detected in inland water bodies of Lithuania for the first time. The previous few studies on cyanotoxins have been focused on assessment of MCs (Kasperovičienė et al., 2005; Kasperovičienė, 2008).

MCs producing cyanobacteria blooms have been described in eighty countries worldwide (Catherine et al., 2017). Concentrations of MCs in Europe usually found in the range of 0.1–10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Greer et al., 2016; Pitois et al., 2018) and in the scums can reach 2800 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Faassen and Lüring, 2013). MCs were detected from April to November in Lake Širvys and constituted up to 16.72 $\mu\text{g L}^{-1}$ (average $5.63 \pm 6.14 \mu\text{g L}^{-1}$), whereas hepatotoxins were detected in Lake Jieznas from June to September with the maximum concentration 0.96 $\mu\text{g L}^{-1}$ (average $0.59 \pm 0.34 \mu\text{g L}^{-1}$). In the studied Lithuanian lakes, MCs concentrations in summer and autumn vary from 0.25 to 1.71 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kasperovičienė et al., 2005; Kasperovičienė, 2008).

It is crucial to determine not only the total MCs concentration, but also to reveal the profile as contribution of particular MC variant to bloom toxicity is not similar (Faassen and Lüring, 2013). Five different variants of MCs were detected in the studied lakes: MC-YR, dmMC-RR, MC-RR, dmMC-LR and MC-LR (Fig. 3.). In Lake Širvys, less toxic dmMC-RR was the dominant variant with maximum value reached up to 16.00 $\mu\text{g L}^{-1}$ that comprised 96% of total MCs concentration. In Lake Jieznas, the prevailing variant was MC-RR with maximum value 0.81 $\mu\text{g L}^{-1}$ that comprised 84% of total MCs concentration. The most toxic MC-LR was up to 0.15 $\mu\text{g L}^{-1}$ and did not exceed the recommended guideline 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for bathing waters (WHO, 2003). MCs typically co-occur with other bioactive NRPs and never occur alone (Janssen, 2019). This coincided with the data of the current study, where MCs production coupled with higher relative amount of bioactive NRPs with the most common APs and AERs in the studied Lake Širvys. Similarly, MCs, APs, AER and planktocyclin were prevailing in field samples with dominant *Planktothrix agardhii* (Grabowska et al., 2014). *P. agardhii* extract rich in MCs, APs and AERs is found to be toxic to zooplankton (Pawlik-Skowrońska et al., 2019). Thus, non-ribosomal oligopeptides, other than MCs, has an essential contribution to the toxicity to invertebrates and their toxic effect can vary depending on the profile of secondary metabolites.

Neurotoxins are much less common compared to MCs. ATX-a and/or homo-ATX-a are more often recorded than ATX-a(s) and STX (Meriluoto et al., 2017). Despite low quantities of neurotoxins (ATX-a up to $0.97 \mu\text{g L}^{-1}$ and STX up to $1.06 \mu\text{g L}^{-1}$), they contributed to the toxicity of blooms in the studied lakes mainly in the summer months (Fig. 3). In Europe, the ATX-a has been detected at higher concentrations up to $2.19 \mu\text{g L}^{-1}$ (Carrasco et al., 2007; Dolman et al., 2012; Toporowska et al., 2016; Pitois et al., 2018). Usually, STX has been recorded in the continental freshwaters up to $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$; max. $26.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in Spain (Wörmer et al., 2011; Gkelis and Zaoutsos, 2014; Stoyneva-Gärtner et al., 2017; Pitois et al., 2018). There are no guidelines for neurotoxins in Europe; however, concentrations of neurotoxins in Lithuanian lakes did not exceed recommended alert values for STX – $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fitzgerald et al., 1999) and for ATX-a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fawell et al., 1999).

The major part of investigations usually is focused on one type of cyanotoxin (Meriluoto et al., 2017). The pioneering large-scale research on profile of various cyanotoxins (MCs, CYN and ATX) in integrated water column samples across Europe have revealed that total concentration of toxins is below $1 \mu\text{g L}^{-1}$ in 75% out of 137 lakes (Mantzouki et al., 2018b). The integrated water samples from Lakes Širvys and Jieznas were taken and analysed by standard method as well. The profiles of cyanotoxins in the integrated water samples compared to the surface samples were similar in Lake Širvys ($6.62 \mu\text{g L}^{-1}$ and $4.83 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively) and Lake Jieznas ($1.85 \mu\text{g L}^{-1}$ and $2.10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). The profile of cyanotoxins in Lake Širvys was similar to other Lithuanian lakes, where MCs dominated (Fig. 4.). The dmMC-RR was the most often detected and abundant among five MCs variants recorded. It is in agreement with the data from other European lakes (Mantzouki et al., 2018b), where dmMC-RR is rare, but shows the highest concentrations in the profile of tested cyanotoxins. According to Mantzouki et al. (2018b), the most abundant are MC-YR and dmMC-LR, followed by MC-LR and suggested that risk assessment should be broaden to address not only

MC-LR. Cytotoxin CYN ($0.03\text{--}0.38\ \mu\text{g L}^{-1}$) was detected in the integrated samples from Lakes Širvys and Jieznas. Although ATX have also been detected in 52 other European lakes (Mantzouki et al. 2018b), neurotoxin concentration ($1.33\ \mu\text{g L}^{-1}$) in Lake Jieznas was the highest.

2.3. Producers of cyanotoxins and non-ribosomal peptides

Bloom-forming cyanobacteria species are distinguished by different abilities to produce toxic and bioactive compounds. The current study determined seasonal dynamics of *mcyE* synthetase gene copy number of *Planktothrix agardhii* in the environment samples that mainly concur with the species biomass and MCs concentration (Fig. 5., A). Similarly, high positive correlation between *P. agardhii* biomass and total MCs concentration has been observed in some other European lakes (Dolman et al., 2012; Papadimitriou et al., 2013; Grabowska et al., 2014). The obtained results can be explained due to findings of high 93% proportion of toxic *P. agardhii* strains (Fig. 5., B). This is consistent with Kurmayer et al. (2004) and Yéprémian et al. (2007), where 88% and 52% rate of toxic *P. agardhii* strains has been detected.

A total of 274 strains of 15 species were tested for the presence of cyanotoxins and NRPs in the current study. *Planktothrix agardhii* was confirmed as the main MCs producer, because most isolates contained *mcyE* synthetase gene. *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae* and *M. viridis* were confirmed as MCs producers in tested strains. In general, *P. agardhii* and *Microcystis* spp. strains were able to produce four MCs variants that were also determined from the biomass in studied lakes: dmMC-RR, MC-RR, dmMC-LR and MC-YR.

High amount of NRPs in Lake Širvys environmental samples were detected with the dominant APs and AERs which production for *Planktothrix agardhii* was confirmed based on strain analysis. The strains of *Aphanizomenon gracile*, *Dolichospermum*

lemmermannii, *Planktothrix agardhii* and *Microcystis* spp. were rich in NRPs but a particular oligopeptide production was species and strain specific. Similarly, great variety of bioactive compounds was confirmed to those species in other studies with exception for *A. gracile* (Grabowska et al., 2014; Harke et al., 2016; Kurmayer et al., 2016; Sivonen and Börner, 2008; Welker et al., 2004).

The neurotoxin STX concentrations coincided with the greatest biomass of *A. gracile* in the lakes. *A. gracile* is well recognized STX producer in European freshwaters (Pereira et al., 2004; Ballot et al., 2010a; Ledreux et al., 2010). In the current study, 123 strains from different species were tested for neurotoxins, but STX synthesis was confirmed only for *A. gracile* of which 17% (of 63 tested strains) contained *sxtA* synthetase gene. Similar data have been obtained for *A. gracile* strains from German lakes (Ballot et al., 2010a). The producer of ATX-a was not confirmed for strains of various cyanobacteria species tested. In the current study, alien species *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, *Chrysosporum bergii* and *Raphidiopsis mediterranea* were not determined as producers of cyanotoxins, even they are known able to synthesise toxins (Schembri et al., 2001; Namikoshi et al., 2003; Sabour et al., 2005; Ledreux et al., 2010).

2.4. Environmental variables important for proliferation of native and alien cyanobacteria and production of cyanotoxins

The most important recent challenges are warming and anthropogenical eutrophication (Huisman et al., 2018). Temperature rise will have a significant influence on already existing phytoplankton communities and support alien species establishment (Sukenik et al., 2012). Over-enrichment of nutrients during recent decades accelerate eutrophication processes resulting in cyanobacteria community changes and proliferation of harmful blooms (Huisman et al., 2005; Paerl and Fulton, 2006). Combination

of field and experimental studies are critical for further understanding of environmental variable role in harmful algae bloom trends (Heisler et al. 2008). Therefore, the experimental part of the current study brought to light how changes in nutrients (IP, IN, N:P) and temperature rise affect the growth rate of particular dominant in the studied lakes native bloom-forming species (*Planktothrix agardhii* and *Aphanizomenon gracile*), the production of toxins and the alien cyanobacteria establishment (*Sphaerospermopsis aphanizomenoides* and *Chrysosporum bergii*).

2.4.1. Temperature effect on bloom-forming species growth and cyanotoxin production

In Europe, during the last decade the temperature has increased by $1.3 \pm 0.11^{\circ}\text{C}$ (Kovats et al., 2014) and is expected to rise by 4°C close to 2100 (Brown and Caldeira, 2017). It causes concern associated with formation of cyanobacteria blooms and alien species distribution, also success of their establishment in new habitats. Experimental study showed that the temperature had a significant effect on the tested cyanobacteria growth rate ($F_{(6,161)} = 15.83$, $p < 0.001$). The field study and monoculture laboratory experiments revealed similar growth characteristics of native *P. agardhii* and *A. gracile* under wide range of temperatures. In the studied lakes, during summer and autumn both species appeared at temperature range of $7.9\text{--}26.1^{\circ}\text{C}$ that is in agreement with similar range of temperature ($10.3\text{--}22.6^{\circ}\text{C}$) in other temperate lakes (Mischke and Nixdorf, 2003; Toporowska et al., 2010, 2016; Karosienė et al., 2019 under review). According to other researches, 27°C optimal temperature for *P. agardhii* (Lürling et al., 2013; Gomes et al., 2015) and 28°C for *A. gracile* (Mehnert et al., 2010) strains have been assessed.

Sphaerospermopsis aphanizomenoides and *Chrysosporum bergii* are less studied alien cyanobacteria species recently dispersed to Europe (Meriluoto et al., 2017; Kokociński and Soininen, 2019), and Lithuanian lakes are the northernmost occurrence point of both

species (Koreivienė and Kasperovičienė, 2011; Savadova et al., 2018). *C. bergii* has been recorded since 2008 in Lithuanian Lake Gineitiškės with low up to 0.26 mg L⁻¹ biomass (Koreivienė and Kasperovičienė, 2011). *S. aphanizomenoides* was detected in Lithuania for the first time during this study, where it formed the highest biomass up to 1.03 mg L⁻¹ in Lake Jieznas and single individuals in Lake Širvys. Usually these species are found in small amounts in different European lakes (Stüken et al., 2006; Ledreux et al., 2010; Kokociński and Soininen, 2019). However, *S. aphanizomenoides* seems to be established in the new habitats and forms biomass up to 22.3 mg L⁻¹ (comprised 62% of total phytoplankton biomass) (Budzyńska and Gołdyn, 2017). The experimental results have shown greater growth rate of both species under higher temperatures, however, temperature range favourable for growth of *S. aphanizomenoides* was wider (20–30°C) compared to *C. bergii* (26–30°C). The results are in agreement with the findings by Mehnert et al. (2010), where optimum growth temperature for *S. aphanizomenoides* has been determined 29°C and for *C. bergii* 26°C.

It is crucial to evaluate not only the impact of global warming on formation of cyanobacteria blooms, but also on bloom toxicity. In the studied lakes, temperature was not determined as a significant factor for variation of cyanotoxins concentrations and only a positive correlation with ATX-a was found (Fig. 6.). The laboratory experiments with species monocultures revealed that temperature was important for MCs and NRPs production by *P. agardhii* as a higher amount of toxins was detected under the lower tested temperatures 18–24°C. This coincide with Lürling et al. (2017) and Bui et al. (2018), who have revealed a decline of MCs concentration in *Microcystis* at warmer temperatures. However, it is in contrary to the Gianuzzi et al. (2016) results, where higher MCs cell quota in *M. aeruginosa* strain has been detected at 29°C than at 26°C.

2.4.2. Effect of nutrients on bloom-forming species growth and cyanotoxin production

Phosphorus and nitrogen control the occurrence and intensity of the blooms (Paerl et al., 2008; Paerl and Huisman, 2009). *Planktothrix agardhii* was the single dominant that formed prolonged bloom in Lake Širvys, where IP ranged from 0.011 to 0.052 mg P L⁻¹ and IN from 0.17 to 0.33 mg N L⁻¹. Similarly, the species tend to dominate at IP concentrations 0.020–0.158 mg P L⁻¹ in other European lakes (Yéprémian et al., 2007; Toporowska et al., 2018). The current experimental study proved that species growth was the best under eutrophic-hypertrophic conditions at N:P ratio 30:1.

Another native species *Aphanizomenon gracile* was the dominant in Lake Jieznas, when IP was 0.021 mg P L⁻¹, and IN concentration 0.070 mg N L⁻¹. Statistical analysis in the studied lakes and nutrients experiment showed that IP had the strongest positive relationship to biomass of *A. gracile* (Fig. 7.). *A. gracile* growth rate gradually raised with increasing IP concentrations, however, N:P ratio effect was insignificant (Fig. 8.). According to Dolman et al. (2012), *A. gracile* grow well over a wide range of N and P, suggesting that species is highly adapted to various environmental conditions.

The nutrients experiment revealed that IP was significant factor for *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* growth rate increase and the effect was greater than for *Chrysosporum bergii*. This is in agreement with Sabour et al. (2009), who have shown experimentally the maximum growth rate of *S. aphanizomenoides* under the highest nutrients concentrations. This also supports the findings by Budzyńska and Gołdyn (2017) from the field studies as *S. aphanizomenoides* is characterized as high nutrient demand species. The analysis of environmental studies performed by Kokociński and Soininen (2019), also have shown *C. bergii* preference of higher total phosphorus concentration. However, the performed experiments in the current study revealed species indifference to the increase of nutrients.

Stoichiometric theory (Van der Waal et al., 2014) have stated that N and/or P limitation cause production of different type of secondary metabolites. Several studies have suggested that under N enrichment conditions, toxic blooms are more expected due to faster growth of toxic strains than non-toxic (Vézie et al., 2002) and higher MCs production (Welker et al., 2007; Davis et al., 2010). The studies in Lakes Širvys and Jieznas revealed that N:P ratio was a significant factor for the amount of cyanotoxins and bioactive NRPs (Fig. 6), and correlated negatively with total MCs, dmMC-RR, dmMC-LR, APs and AERs. Similarly, experimental testing of *Planktothrix agardhii* demonstrated strong negative relationship of IP concentration and the amount of dmMC-RR, APs and CPs ($r = -0.86$, $r = -0.81$ and $r = -0.85$, $p < 0.05$, respectively).

Kellmann et al. (2008) concluded that availability of phosphate and other environmental factors probably regulate STX production. The results of the current study showed that STX positively correlated with IP concentration in field samples. The regression analysis did not reveal a relationship of *Aphanizomenon gracile* growth rate, IP concentrations, N:P ratio to STX concentrations during experiments.

2.5. Combined effect of environmental factors on interspecies competition

Eutrophication and climate warming simultaneously affect cyanobacteria community in natural ecosystems (O'Neil et al., 2012), therefore, more complex controlled experimental systems with multiple factors and mixes of species could give better understanding about the role of abiotic and biotic variables for the harmful algae blooms. In order to elucidate competitive abilities between native bloom-forming and alien cyanobacteria species in studied lakes, strains were co-cultured under eutrophic and hypertrophic conditions at ambient (20°C) and warming scenario (24°C) simultaneously.

The performed experiments revealed that nutrient concentration had the greatest effect on species biomass formation and interspecies competition ($F_{(1, 112)} = 29.50$, $p < 0.001$), but temperature and species origin were important at some extent also ($F_{(1, 112)} = 23.10$, $p < 0.001$ and $F_{(3, 112)} = 14.02$, $p < 0.001$, respectively). Experiments of the similar type are very limited, therefore, the obtained results are further compared to the data from field studies. The multi-lake study performed by Rigosi et al. (2014) has proved nutrients as a more powerful predictor of cyanobacterial biomass than temperature.

In the performed experiment, native *P. agardhii* and *A. gracile* species competed mainly for nutrients. It is likely that nutrients predetermined the dominant species and *P. agardhii* would be outcompeted by *A. gracile* under nutrients limited conditions. According to Dolman et al. (2012), both species grow well over a wide range of N and P concentrations, however, *A. gracile* forms the highest biomass at high nitrogen relative to phosphorus concentration. Non-diazotroph *P. agardhii* is able to store N and P (Reynolds, 2006; Van de Waal et al., 2010) and this way withstand nutrient limitation periods.

Ma et al. (2015) have found that allelopathic effect is likely to play a role in driving the seasonal alteration of dominant cyanobacteria species. Several studies has been proved importance of secondary metabolites to interspecies competition among cyanobacteria (Rzymiski et al., 2014; Ma et al., 2015; Briand et al., 2018). It was first time demonstrated that native *A. gracile* cyanobacteria suppressed biomass formation of native *P. agardhii* and both alien species likely due to alelopathic effect. Competition more accurately than monoculture experiments reflected the situation in the lakes, showing that alien species establishment was mainly suppressed by native species.

CONCLUSIONS

1. Cyanobacteria biomass in Lakes Širvys and Jieznas exceeded high alert level for bathing waters (up to 29.2 and 24.7 mg L⁻¹, respectively) and species belonging to the Nostocales and Oscillatoriales formed blooms from July to September/October. Nineteen species of potential cyanotoxin producers altogether constituted up to 76–98% of total phytoplankton biomass. *Planktothrix agardhii* was a single dominant (up to 28.1 mg L⁻¹) in Lake Širvys, whereas several species *Aphanizomenon gracile* (up to 12.7 mg L⁻¹), *Limnothrix planctonica* (up to 7.5 mg L⁻¹) and *Planktolygbya limnetica* (up to 5.5 mg L⁻¹) composed the bloom in Lake Jieznas.

2. Maximum concentration of the particular intracellular cyanotoxin did not exceed recommended values for freshwaters; however, the effect of co-occurring cyanotoxins can pose threat to humans and biota. Hepatotoxins microcystins (MCs) reached up to 16.72 µg L⁻¹ in Lake Širvys (dominant dmMC-RR) and up to 0.96 µg L⁻¹ in Lake Jieznas (dominant MC-RR) in September/October. Saxitoxin (STX), anatoxin-a (ATX-a), cylindrospermopsin (CYN) and bioactive non-ribosomal peptides (NRPs) were detected in Lithuanian lakes for the first time. Concentrations of STX (up to 1.06 µg L⁻¹), ATX-a (up to 0.97 µg L⁻¹) and cytotoxin CYN (up to 0.38 µg L⁻¹) were the highest in July/August. Total amount of NRPs was 3.5 times higher in Lake Širvys. Anabaenopeptins and aeruginosins prevailed in the lakes.

3. Investigations of the environmental samples and the strains confirmed that *Planktothrix agardhii* and *Aphanizomenon gracile* were the main producers of MCs and STX, respectively. *mcyE* gene was found in 93% of the tested *P. agardhii* strains, while 17% of *A. gracile* strains contained *sxtA* gene and produced toxin. MCs production was also detected in *Microcystis viridis*, *M. aeruginosa* and *M. flos-aquae* strains. NRPs synthesis was confirmed for *A. gracile*, *Dolichospermum lemmermannii*, *P. agardhii* and *Microcystis* spp. Producers of ATX-a were not determined. Alien to

European cyanobacteria *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Chrysosporum bergii* were non-toxic.

4. Native cyanobacteria species were characterized by the similar growth rate under experimentally tested temperatures from 18°C to 30°C. Alien species reached maximum growth rate at the highest temperature, however, *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* had wide temperature tolerance range (20°C–30°C). Under all tested nutrient concentrations, the highest growth rate was determined for *Aphanizomenon gracile* and *S. aphanizomenoides* followed by *Chrysosporum bergii* strains. All species grew apparently better at elevated inorganic phosphorus concentrations, and only *Planktothrix agardhii* growth was suppressed by nutrient limitation and low N:P ratio.

5. Significant negative correlation between the temperature and the amount of total MCs and NRPs in the biomass of *Planktothrix agardhii* was determined during laboratory experiments. No relationship was detected between STX concentrations in the biomass of *Aphanizomenon gracile* with the tested temperature and nutrients concentration.

6. Nutrient concentration had the greatest effect on interspecies competition, whereas temperature and species itself were important to some extent also. Native *Planktothrix agardhii* and *Aphanizomenon gracile* competed mainly for nutrients, but native and alien species co-cultured acted differently. *A. gracile* suppressed the growth of native and alien species. Also, *P. agardhii* growth was suppressed by alien *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*.

7. Overall, interrelated field and laboratory studies confirmed inorganic phosphorus as more significant factor than the temperature for growth and biomass formation of potential cyanotoxin producers. Both nutrients and temperature modified the profile of cyanotoxins and NRPs.

CURRICULUM VITAE

Name Ksenija Savadova-Ratkus
Date of birth April 25, 1988
Place of birth Vilnius, Lithuania
Address Nature Research Centre, Akademijos Str. 2, LT
– 08412

Education

2011–2013 Master's degree in Botany, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University, Lithuania.
2007–2011 Bachelor's degree in Biology, Lithuanian University of Educational Sciences.

Work experience

2017–2018 Junior Researcher at Nature Research Centre, Laboratory of Algology and Microbial Ecology
2015–2017 Biologist at Nature Research Centre, Laboratory of Algology and Microbial Ecology
2014–2015 Laboratory assistant at Nature Research Centre, Laboratory of Algology and Microbial Ecology.

LIST OF PUBLICATIONS

Publications corresponded to ISI Web of Science

Savadova K., Mazur-Marzec H., Karosienė J., Kasperovičienė J., Vitonytė I., Toruńska-Sitarz A., Koreivienė J., 2018. Effect of increased temperature on native and alien nuisance cyanobacteria from temperate lakes: an experimental approach. *Toxins*, 10(11):445
Karosienė J., **Savadova K.**, Toruńska-Sitarz A., Koreivienė J., Kasperovičienė J., Vitonytė I., Błaszczuk A., Mazur-Marzec H., 2019. Production of saxitoxins and anatoxin-a by cyanobacteria from Lithuanian lakes. Under review

- Mantzouki E., Campbell J., van Loon E. [...], **Savadova K.** et al., 2018. A European multi lake survey dataset of environmental variables, phytoplankton pigments and cyanotoxins. Scientific data, 5:180226.
- Mantzouki E., Lürling M, Fastner J., Senerpont Domis L., Wilk-Woźniak E., Koreivienė J., Seelen L., Teurlincx S, Verstijnen Y., Krztoń W., Walusiak E., Karosienė J., Kasperovičienė J., **Savadova K.** et al. 2018. Temperature effects explain continental scale distribution of cyanobacterial toxins. Toxins, 10(4).
- Vičkačkaitė V., Lingytė A., Kasperovičienė J., Bugelytė B., Koreivienė J., **Savadova K.**, 2016. Selection of an esterification catalyst for assay of total fatty acid content in cyanobacteria and algae using gas chromatography. Chemija, 27(4): 202–207.

Scientific publications in the other periodical refereed journals

- Grendaitė D., Stonevičius E., Karosienė J., **Savadova K.**, Kasperovičienė J., 2018. Chlorophyll-a concentration retrieval in eutrophic lakes in Lithuania from Sentinel-2 data. Geologija, Geografija, 4(1): 15–28.
- Koreivienė J., Kasperovičienė J., **Savadova K.**, Karosienė J., Vitonytė I., 2016. Collection of pure cultures of algae and cyanobacteria for research, teaching and biotechnological applications (Nature Research Centre, Lithuania). Botanica Lithuanica, 22(1): 87-92.

Abstracts of scientific conferences

Attended and presented

- Savadova K.**, Karosienė J., Toruńska-Sitarz A., Koreivienė J., Kasperovičienė J., Vitonytė I., Błaszczuk A., Mazur-Marzec H., 2017. Cyanobacterial neurotoxins and their producers in temperate lakes in Lithuania. 11th International Phycological Congress. The challenges and opportunities of the molecular era for algal research and bioprospecting. Szczecin, Poland. P. 166-167.
- Savadova K.**, Koreivienė J., Karosienė J., Kasperovičienė J., Vitonytė I., 2016. Recovery of shallow lake from cultural eutrophication in the light of climate change. XXXVth International Conference of the Polish Phycological Society. Algae in anthropogenically transformed ecosystems. Łódź-Stryków, Poland. P. 92.
- Savadova K.**, Koreivienė J., Sivonen K., Kasperovičienė J., Suurnäkki S., Karosienė J., Wahlsten M., Vitonytė I., 2015. Variation of bloom forming cyanobacteria and microcystins in shallow hypertrophic lake. Sixth European phycological congress. Algae brings life to the world. London, UK. P. 204.

Presented as co-author

- Koreivienė, J., Kasperovičienė, J., Karosienė, J., **Savadova, K.**, Vitonytė, I., Valčiukas, R., Staniulis D., Želvis, K., 2018. Prospecting of indigenous freshwater microalgae as a valuable regional resource. 37th International Conference of the Polish Phycological Society. Kraków-Dobczyce, Poland.
- Stonevičius, E., Grendaitė, D., Karosienė, J., **Savadova, K.**, Kasperovičienė, J., 2018. Sentinel 2 data for retrieval of chlorophyll- α concentration in small lakes. 17th biennial conference ERB2018 Euromediterranean network of experimental and representative basins; Innovative monitoring

techniques and modelling approaches for analysing hydrological processes in small basins. Darmstadt, Germany.

Grendaitė, D., Stonevičius, E., Karosienė, J., **Savadova, K.**, Kasperovičienė, J., 2018. Ecological water quality assessment of Lithuanian lakes using remote sensing. 61st international conference for students of physics and natural sciences. Vilnius, Lithuania.

Internships

- | | |
|------------------|--|
| 2018/03/03–03/24 | University of Gdańsk, Poland. “Production of secondary metabolites of freshwater cyanobacteria applicable in biotechnology”, supervisor Prof. dr. hab. Hanna Mazur-Marzec. Funded by COST program (ES1408 EUAlgae) |
| 2017/03/10–03/25 | University of Gdańsk, Poland. “Bloom-forming cyanobacteria, cyanotoxins and factors responsible for their dynamics“, supervisor Prof. dr. hab. Hanna Mazur-Marzec. Funded by Nature Research Centre |
| 2016/11/15–12/16 | University of Gdańsk, Poland. “Determination and quantification of cyanotoxins in cyanobacteria strains and environmental samples from eutrophic lake“, supervisor Prof. dr. hab. Hanna Mazur-Marzec. Funded by Education Exchanges Support Foundation, Nr. AM-PL-2016-LT-20 |
| 2014/11/02–12/20 | University of Helsinki, Finland. “Cyanotoxins methods acquisition: molecular and LC-MS“ supervisor Prof. Kaarina Sivonen. Funded by COST program (ES1105 CYANOCOST) |

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 31 egz.