

# **Kovaalga fajok filogenetikai és morfológiai diverzitása**

*– Doktori értekezés tézisei –*

**Duleba Mónika**

**Témavezető:**

**Dr. Ács Éva, DSc, tudományos tanácsadó**

**MTA Ökológiai Kutatóközpont, Duna-kutató Intézet**

**ELTE TTK Környezettudományi Doktori Iskola**

**Vezetője: Dr. Jánosi Imre, DSc, egyetemi tanár**

**Környezetbiológia Doktori Program**

**Vezetője: Dr. Ács Éva, DSc, tudományos tanácsadó**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 2016**

## I. Bevezetés, célkitűzések

A kovaalgák, mint elsődleges termelők, alapvető szerepet töltenek be a vízi ökoszisztémák életében, fontos tagjai mind a fitoplankton, mind a fitobentosz közösségeknek, a vízminőség indikátorai. Hagyományosan a kovaváz (frusztulum) morfológiai jellegzetességei alapján rendszerezik ezeket az élőlényeket (Round és mtsai. 1990). A fajok morfológiai alapú meghatározása azonban nagy tapasztalatot, emellett gyakran pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatot igényel. Ráadásul egyes fajok nagymértékű morfológiai variabilitása illetve fenotípusos plaszticitása is megnehezítheti a határozást. A kovaalgák tanulmányozásában ezért egyre inkább térnek hódítanak a molekuláris biológiai módszerek, egyrészt az evolúciós vizsgálatokban, másrészt a fajok elválasztását és azonosítását illetően. Ez utóbbi területen használhatóak az ún. DNS vonalkódok (Hebert és mtsai. 2003), melyek rutinszerű gyakorlati alkalmazásának kidolgozása jelenleg is zajlik (pl. Zimmermann és mtsai. 2015).

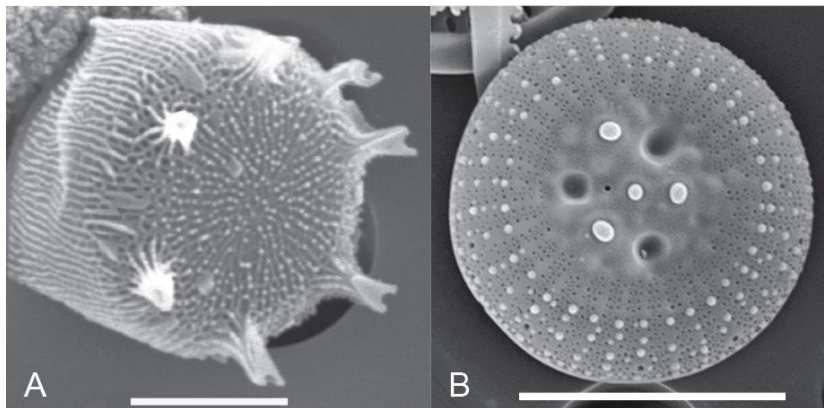
Doktori munkám során kiemelten két planktonikus kovaalga faj/fajkomplex (*Skeletonema potamos*, **1./A. ábra** és *Cyclotella ocellata*, **1./B. ábra**) filogenetikai illetve DNS vonalkód elemzésével foglalkoztam, melyet morfológiai és ökológiai vizsgálattal egészítettem ki.

A *Skeletonema potamos* (C.I. Weber) Hasle a Duna nyári fitoplankton közösségének meghatározó tagja (Kiss és mtsai. 1994), emellett a Tisza fitoplanktonjának is jellegzetes eleme. Ez az eredetileg *Microsiphonia potamos* C.I. Weber néven leírt faj az egyetlen igazi édesvízi tagja az elsősorban tengeri fajokat magába foglaló *Skeletonema* Greville nemzetségnek (Kiss és mtsai. 2012).

A *C. ocellata* Pantocsek Magyarországon igen elterjedt, számos vizünkben előforduló, jellegzetes, gyakran meghatározó (pl. Balaton) tagja a fitoplanktonnak. Nagy morfológiai variabilitást mutat, és gyakran képez folytonos morfológiai átmenetet más fajokkal, például a *C. comensis* Grunow komplex tagjaival valamint a *C. trichonidea* A. Economou-Amilli fajjal. Emiatt több szerző (pl. Edlund és mtsai. 2003) úgy véli, hogy a *C. ocellata* és közel rokon fajai egy fajkomplexbe tartoznak. A csoport tagjainak mikroszkópos elkülönítése nehéz (pl. Teubner 1995).

A *C. ocellata* más szempontból is érdekes. A korábbi morfológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a *Cyclotella* (Kützing) Brébisson nemzetség leírása túl általános, ezért új morfológiai kritériumok szerint recens és fosszilis taxonok alapján új nemzetségeket írtak le. Továbbá molekuláris biológiai elemzések (pl. Alverson és mtsai. 2007, Jung és mtsai. 2010) bizonyították, hogy a *Cyclotella* nemzetség nem monofiletikus: a *C. ocellata* és *C. bodanica* Eulenstein ex Grunow valamint a *Discostella* ág elkülönült a *C. meneghiniana* Kützing csoporttól. Mindezek alapján az eredeti *Cyclotella* nemzetség négy utódnemzetségre vált szét:

*Cyclotella* sensu stricto, *Discostella* V. Houk et R. Klee (Houk és Klee 2004), *Tertiarius* H. Håkansson et G. Khursevich (Håkansson és Khursevich 1997) és *Lindavia* (Schütt) De Toni et Forti (Nakov és mtsai. 2015). A morfológiai vizsgálatokkal ellentétben az eddigi molekuláris biológiai elemzések jóval kevesebb taxonra terjedtek ki, a *Lindavia* ágon eddig csak két fajt (*Cyclotella ocellata* és *C. bodanica*) vontak filogenetikai vizsgálatba. Azonban e két faj kapcsolatát nem vizsgálták, ezért eldöntetlen maradt a kérdés, hogy ezek valóban ugyanabba a nemzetségbe tartoznak-e.



**1. ábra:** A vizsgált fajok pásztázó elektronmikroszkóppal készült képe. A: *Skeletonema potamos*, skála: 2  $\mu$ m; B: *Cyclotella ocellata*, skála: 2,5  $\mu$ m.

Munkám során a következő kérdésekre kerestük a választ a fent említett három téma köré csoportosítva:

1. A *Skeletonema potamos*ra vonatkozó kérdések:

- Hol helyezkedik el a faj a filogenetikai fán?
- Előfordulását, mennyiségi eloszlását milyen környezeti tényezők befolyásolják?

2. A *Cyclotella ocellata*/*Cyclotella comensis* komplexre vonatkozó kérdések:

- Milyen morfológiai csoportok különíthetők el a komplexen belül? Ezek előfordulása milyen környezeti változókhoz kapcsolódik?
- A morfológiai eltérésekhez DNS-szekvencia különbségek is társulnak?

3. A *Cyclotella* nemzetség filogenetikájára vonatkozó kérdés:

- A *C. ocellata* és a *C. bodanica* egy nemzetségbe (*Lindavia*) sorolható-e?

## II. Anyag és módszer

### II.1. *Skeletonema potamos* vizsgálata

1979 óta heti rendszerességgel történik mintavétel a Dunából Gödnél a fitoplankton összetételének és biomasszájának vizsgálatára, valamint fizikai és kémiai változók mérésére. Ezeket az adatokat használtuk a *S. potamos* ökológiai vizsgálatára. A *S. potamos* relatív abundancia és biomassza adatokat összevetettük a környezeti változókkal lineáris kevert hatás modell segítségével (R program nlme csomag). Fény- és elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a faj morfológiáját.

DNS-vizsgálatra egy, a Dunából Gödnél és egy, a Tiszából Tiszaújvárosnál vett mintát használtunk fel. A dunai mintából mikromanipulátorral inverz fénymikroszkóp alatt *S. potamos* sejteket izoláltunk, és ezekből centrifugálással nyers lizátumot készítettünk. A tiszai mintából, mivel kevés *S. potamos* sejtet tartalmazott, közösségi DNS-t vontunk ki szilika oszlopon történő tisztítást tartalmazó eljárással (Qiagen DNEasy Plant Mini Kittel). A mintákból két sejtmagban kódolt (18S rDNS és 28S rDNS) és két kloroplasztisz genomban kódolt (*rbcL* és *psbC*) gén egy-egy szakaszát szaporítottuk fel polimeráz láncrekció (PCR) segítségével és az amplikonokat szekvencia-analízisnek vetettük alá. Erre a célra *Skeletonema* nemzetségre specifikus primereket terveztünk a National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank adatbázisából letölthető szekvenciák alapján. A kapott szekvenciákat az adatbázisból letöltött szekvenciákhoz és a Missouriból származó *S. potamos* tenyészet ismeretség útján megkapott, de még nem publikált szekvenciáihoz illesztettük (MEGA5.05 illetve 6 programmal), és Bayes-módszerrel (MrBayes 3.2 programmal) filogenetikai elemzést végeztünk.

Szakirodalmi adatok alapján elkészítettük a *S. potamos* elterjedési térképét ESRI ArcInfo 9.3 GIS programmal.

### II.2. *Cyclotella ocellata/C. comensis* komplex vizsgálata

Vizsgálatainkhoz tíz víztestből (Balaton, Himódi, Dunaharaszti, Nyékládházi, Hegyeshalmi Szanyi bányató, Csiszlói-tó, a horvátországi Visovac-tó, a törökországi İnli forrás és Yalovai patak) származó mintákat használtunk, melyeket pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltunk, és ennek során a *C. ocellata/C. comensis* komplex tagjairól készítettünk felvételeket. A képeken tíz morfometriai paramétert mértünk le illetve számoltunk meg. A morfológiai vizsgálat alapján morfotípusokat különítettünk el, melyeket morfometriai paramétereik alapján diszkriminancia analízissel (CVA, Past 2.16 programmal) hasonlítottunk össze. Spearman-féle rangkorrelációt számoltunk (szintén Past 2.16

programmal) a környezeti változók és a CVA-val elkülönített csoportok (morfofajok) relatív abundanciája, valamint a morfometriai paraméterek mintánként átlagolt értékei között.

Nyolc mintán végeztünk DNS-vizsgálatot. Azokból a mintákból, melyekben az elektronmikroszkópos vizsgálat során a *C. ocellata*/*C. comensis* komplexnek csak az egyik tagját láttuk (és nem láttunk más Thalassiosirales fajt), közösségi DNS-t izoláltunk DNEasy Plant Mini Kittel. Azokból a mintákból, melyekben nemcsak az egyik vizsgált faj volt jelen (Nyékládházai bányató, Visovac-tó), mikromanipulátorral sejteket válogattunk, melyekből centrifugálással, hődenaturálással és enzimatis emésztéssel nyers lizátumot nyertünk. A mintákból parciális 18S rDNS és *rbcL* szekvenciákat nyertünk ki PCR, majd az azt követő szekvencia-elemzéssel. Ehhez az előző vizsgálatban tervezett primerek közül, a több Thalassiosirales faj szekvenciáira is illeszkedő primereket használtuk. Az azonos szekvenciákat típusokba soroltuk, a különböző szekvenciatípusok közti eltérések kifejezésére p-távolságot számoltunk, illetve Bayes- és maximum likelihood módszerrel filogenetikai elemzést végeztünk.

### **II.3. A *C. ocellata* filogenetikai vizsgálata**

Ebben a kutatásban a *C. ocellata*/*C. comensis* komplex vizsgálatához használt minták egy részét valamint külföldi kutatóktól kapott mintákat és szekvenciákat használtunk. A kérdés megválaszolására, hogy a két faj egy nemzetségbe (*Lindavia*) tartozik-e, bővítettük az elemzésbe bevont taxonok számát a *C. comensis* csoport tagjaival és a *Lindavia radiosaval*, melyek a diagnosztikus morfológiai bélyegeikben a *C. ocellata*hoz (előbbi) illetve a *C. bodanicá*hoz (utóbbi) hasonlóak. A mintákat fény- és elektronmikroszkóp alatt is tanulmányoztuk. Parciális 18S rDNS és *rbcL* szekvenciáinkat a GenBank adatdázisból letöltöttekhez illesztve p-távolságot számoltunk a nemzetségeken belül illetve között, valamint Bayes- és maximum likelihood módszerrel filogenetikai elemzést végeztünk.

## **III. Új tudományos eredmények**

### **III.1. *Skeletonema potamos* vizsgálata**

a) A két sejtmagban kódolt (18S és 28S rDNS) valamint a két kloroplasztisz gén (*rbcL* és *psbC*) közel teljes szekvenciáinak filogenetikai vizsgálatával igazoltuk, hogy az eredetileg *Microsiphonia potamos* néven leírt édesvízi faj valóban a *Skeletonema* nemzetségbe tartozik, valamint meghatároztuk, hogy legközelebbi rokona a brakkvízi *S. subsalsum* (**2. ábra**). A Dunából, a Tiszából gyűjtött *S. potamos* minta, valamint a Missouriból, illetve japán brakkvízből származó törzs 18S és 28S rDNS-ének azonossága alapján megállapítottuk, hogy

a *S. potamos* nem mutat intraspecifikus variabilitást, ami a nemzetség más fajaira jellemző. Ebből feltételezhető, hogy evolúciós szempontból fiatal fajról van szó, mely csak nemrég terjedt el a Földön.

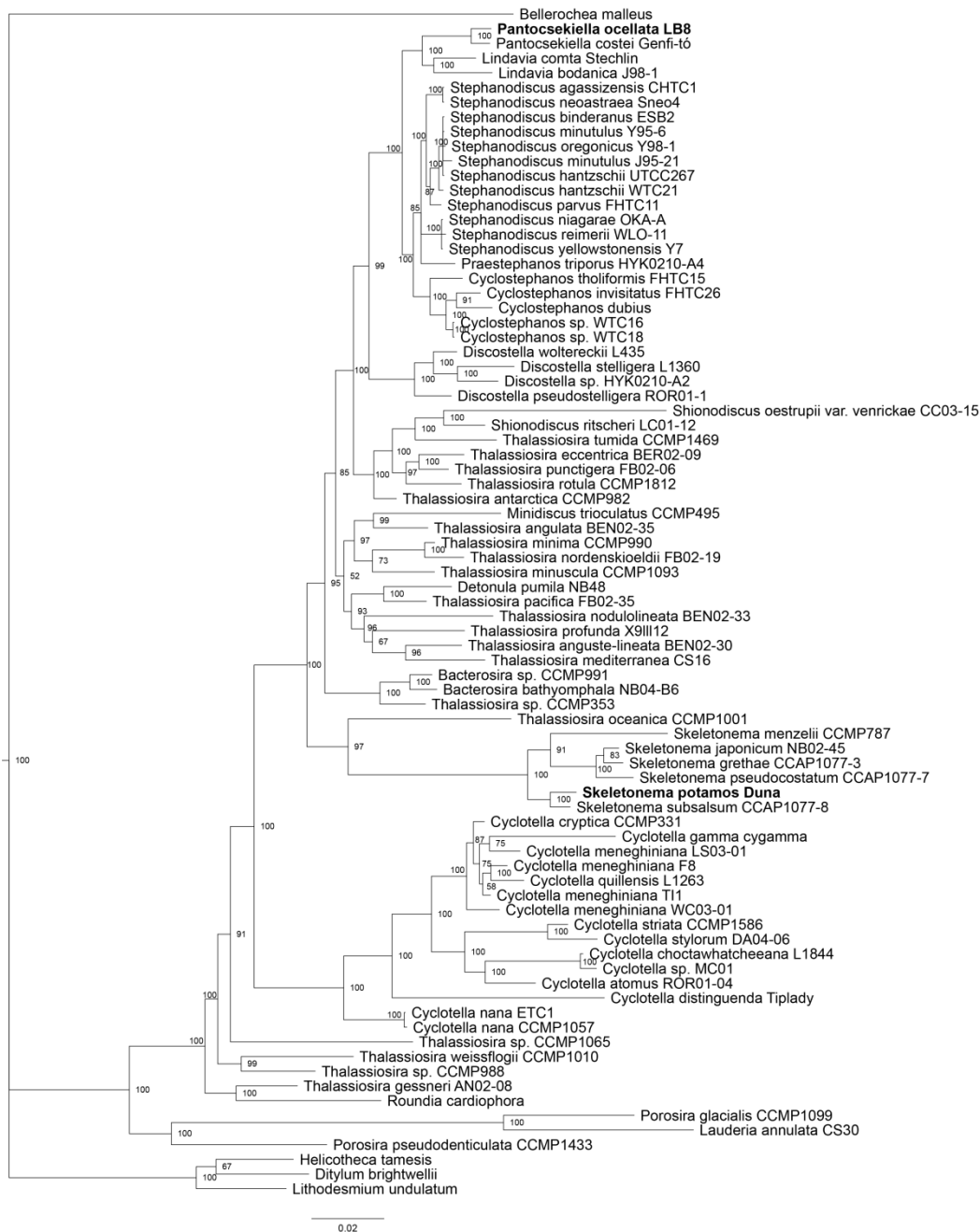
b) Az 1979 óta végzett rendszeres vizsgálatok lehetővé tették, hogy nyomon kövessük a dunai fitoplankton közösség összetételének, benne a *S. potamos* egyedszámának és biomasszájának hosszú távú változását. Ezek alapján megállapítható volt, hogy a faj részaránya jelentősen emelkedett. Ez korrelációt mutatott a Duna átlagos vízhőmérsékletének globális felmelegedés okozta hosszú távú emelkedésével. Részarányának növekedése azzal is összefügghet, hogy a Duna átlagos lebegőanyag-tartalmának hosszú távú csökkenése következtében a víz fényklímája javult.

c) Szakirodalomból összegyűjtött adatok azt mutatták, hogy napjainkban a *S. potamos* a mérsékelt övben terjedt el, de ökológiai vizsgálatunk eredménye alapján elterjedési területének növekedése várható.

### **III.2. *Cyclotella ocellata*/*C. comensis* komplex vizsgálata**

A vizsgált közösségek olyan egyedeket tartalmaztak, melyek morfológiája a *C. ocellata*hoz és közel rokon fajokhoz, a *C. comensis*hez, *C. pseudocomensis*hez, *C. costei*hez és *C. trichonidea*hoz hasonlított. Ennek megfelelően öt morfortípust különítettük el, az átmeneti formák egy hatodikat képeztek. Az alkalmazott morfometriai paraméterek önmagukban illetve párban nem választották el egymástól a nominális taxonokat a közösségekben. Azonban a többváltozós diszkriminancia analízis két csoportot különített el. Az egyik csoport (*C. cf. ocellata*) elsősorban a *C. ocellata* és *C. trichonidea* morfológiájú egyedeket, a másik csoport (*C. cf. comensis*) pedig főleg a *C. comensis*, *C. pseudocomensis* és *C. costei* morfológiájú egyedeket valamint az átmeneti formákat tartalmazta. A *C. cf. ocellata* és *C. cf. comensis* csoport elválását a környezeti DNS, illetve izolált sejt mintákból nyert 18S rDNS és *rbcL* szekvenciák alapján is kimutattuk. Azonban a minták között kicsi volt szekvencia variabilitás és egyes csoportokon belül ugyanakkora mértékű szekvencia eltéréseket találtunk, mint amekkorákat a csoportok között, így nem zárható ki, hogy a két csoport egy fajba tartozik. Ez rávilágít arra, hogy a jelenleg ismert DNS-vonalkód markerek használatát tovább kell finomítani, mert az eddig tesztelt feltételek szerint nem alkalmazhatóak a kovaalgák minden csoportjára. Ennek oka, hogy az ilyen jellegű vizsgálatokba több kovaalga csoport képviselőit nem vagy csak korlátozott számban vonták be. Ilyen alulreprezentált csoportot képviselnek a korábban a Centrales rendbe sorolt kovaalgák, amelyek közé az általunk

vizsgált taxonok is tartoznak. A megfelelő variabilitást mutató DNS-szakasz kiválasztása mellett nagyon fontos megtalálni azt a küszöbértéket, amely már faji szintű elválást jelez.



**2. ábra:** 18S rDNA és *rbcL* szekvenciákból Bayes-módszerrel készült filogenetikai fa. Az elágazásoknál a posterior valószínűségeket tüntettük fel. Skála = 0,02 szubsztitúció/hely. A két vizsgált fajt kiemelés jelzi.

### III.3. A *C. ocellata* filogenetikai vizsgálata

A morfológiai vizsgálat, valamint a 18S rDNA és *rbcL* szekvenciák filogenetikai (2. ábra) és p-távolság elemzése alapján megállapítottuk, hogy a *C. ocellata* és a *C. comensis* csoport

nem tartozik egyik korábban leírt nemzetségbe sem, hanem önálló nemzetséget alkot. Így egy új nemzetség, a *Pantocsekiella* nemzetség került leírásra.

#### IV. Hivatkozások

- Alverson A. J., Jansen R. J., Theriot E. C. (2007): Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 193-210.
- Edlund M. B., Williams R. M., Soninkhishig N. (2003): The planktonic diatom diversity of ancient Lake Hovsgol, Mongolia. *Phycologia* 42: 232-260.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270(1512): 313-321.
- Houk V., Klee, R. (2004): The *stelligeroid* taxa of the genus *Cyclotella* (Kützinger) Brébisson (Bacillariophyceae) and their transfer into the new genus *Discostella* gen. nov. *Diatom Research* 19: 203-228.
- Håkansson H., Khursevich G. (1997): *Tertiarius* gen. nov., a new genus in the Bacillariophyceae, the transfer of some cyclotelloid species and a comparison to closely related genera. *Diatom Research* 12: 19-33.
- Jung S.W., Han M.-S., Ki J.-S. (2010): Molecular genetic divergence of the centric diatom *Cyclotella* and *Discostella* (Bacillariophyceae) revealed by nuclear ribosomal DNA comparisons. *Journal of Applied Phycology* 22: 319-329.
- Kiss K. T., Ács É., Kovács A. (1994): Ecological observations on *Skeletonema potamos* (Weber) Hasle in the River Danube, near Budapest (1991-92, daily investigations). *Hydrobiologia* 289: 163-170.
- Kiss K. T., Klee R., Ector L., Ács É. (2012): Centric diatoms of large rivers and tributaries in Hungary: morphology and biogeographic distribution. *Acta Botanica Croatica* 71: 311-363.
- Round F. E., Crawford, R. M., Mann, D. G. (1990): *The diatoms: Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, pp. 747.
- Nakov T., Guillory W. X., Julius M. L., Theriot E. C., Alverson A.J. (2015): Towards a phylogenetic classification of species belonging to the diatom genus *Cyclotella* (Bacillariophyceae): Transfer of species formerly placed in *Puncticulata*, *Handmannia*, *Pliocaenicus* and *Cyclotella* to the genus *Lindavia*. *Phytotaxa* 217(3): 249-264.



Teubner K. (1995): A light microscopical investigation and multivariate statistical analyses of heterovalvar cells of *Cyclotella*-species (Bacillariophyceae) from lakes of the Berlin-Brandenburg region. *Diatom Research* 10: 191-205.

Zimmermann J., Glöckner G., Jahn R., Enke N., Gemeinholzer B. (2015): Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources* 15(3): 526-542.

## **V. Tudományos közlemények jegyzéke**

### **V.1. Az értekezés témájában készült publikációk**

#### **Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek**

1. Duleba M., Ector L., Horváth Zs., Kiss K.T., Molnár L.F., Pohner Zs., Szilágyi Zs., Tóth B., Vad Cs.F., Várbíró G., Ács É. (2014): Biogeography and phylogenetic position of a warm-stenotherm centric diatom, *Skeletonema potamos* (C.I. Weber) Hasle and its long-term dynamics in the River Danube. *Protist* 165(5): 715–729.  
DOI: 10.1016/j.protis.2014.08.001; Impakt faktor: 3,045.
2. Duleba M., Kiss K. T., Földi A., Kovács J., Borojević K. K., Molnár L. F., Plenković-Moraj A., Pohner Zs., Solak C.N., Tóth B., Ács É. (2015): Morphological and genetic variability of assemblages of *Cyclotella ocellata* Pantocsek/*C. comensis* Grunow complex (Bacillariophyta, Thalassiosirales). *Diatom Research* 30(4): 283–306.  
DOI: 10.1080/0269249X.2015.1101402; Impakt faktor: 1,868.
3. Ács É., Ari E., Duleba M., Dreßler M., Genkal S. I., Jakó É., Rimet F., Ector L., Kiss K. T. (2016): *Pantocsekiella* a new centric diatom genus based on morphological and genetic studies. *Fottea* 16(1): 56–78.  
DOI: 10.5507/fot.2015.028; Impakt faktor (2015): 2,026.

#### **Konferencia absztraktok**

1. Pohner Zs., Duleba M., Kiss K.T., Ács É. (2011): Preliminary studies of inter- and intraspecific genetic polymorphism of two Thalassiosirales species. *European Journal of Phycology*, 5th European Phycological Congress, Rhodes, Greece 2011, 46: 185.
2. Duleba M., Bíró P., Kiss K. T., Pohner Zs., Ács É. (2013): Phylogenetic study on a morphologically less variable centric diatom *Skeletonema potamos* (Weber) Hasle. 32<sup>nd</sup> Congress of the International Society of Limnology, 4-9 August 2013, Budapest, Hungary. – Heiszler Zs., Hohol R. (szerk.): 32<sup>nd</sup> Congress of the International Society of Limnology Programme and Book of abstracts, p. 73.

3. Duleba M., Bíró P., Kiss K. T., Pohner Zs., Ács É. (2013): Phylogenetic and ecological study on *Skeletonema potamos* (Weber) Hasle. 7<sup>th</sup> Central European Diatom Meeting, 18-20 September 2013, Thonon-les-Bains, France.– Rimet F., Bouchez A., Ector L., Bernard M., (szerk.): 32ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française & 7th Central European Diatom Meeting, Thonon-les-Bains, France, 16-20 September 2013. Abstracts, p. 135.
4. Ács É., Duleba M., Pohner Zs., Földi A., Kiss K.T. (2014): Phylogenetic study on *Cyclotella ocellata* Pantocsek and *Cyclotella comensis* Grunow. 8th Central European Diatom Meeting, 10-13 April 2014, Zagreb, Croatia. – Ljubešić Z., Godrijan J. and Pfannkuchen D. M. (szerk.): Abstract Book of the 8th CE Diatom Meeting, Zagreb, Croatian Botanical Society, p. 9.

## V.2. Egyéb publikációk

- Felföldi T., Duleba M., Somogyi B., Vajna B., Nikolausz M., Présing M., Márialigeti K., Vörös L. (2011): Diversity and seasonal dynamics of photoautotrophic picoplankton in Lake Balaton (Hungary). *Aquatic Microbial Ecology* 63: 273–287.  
DOI: 10.3354/ame01501; Impakt faktor: 2.393.
- Pohner Zs., Ács É., Borsodi A., Kiss K.T., Palatinszky M., Reskóné N.M., Várbíró G., Mészáros É., Duleba M., Bíró P. (2011): Bevonatban élő mikroba-közösségek genetikai diverzitásának összehasonlítása a Balaton két eltérő trofitású medencéjében. *Hidrológiai Közlöny* 91 (6): 68–71.
- Duleba M., Bíró P., Bolla B., Borsodi A.K., Kiss K.T., Palatinszky M., Pohner Zs., Reskóné N.M., Várbíró G., Ács É. (2012): Comparison of benthic microbial community patterns and diversity in three basins with different trophic levels of Lake Balaton (Hungary). *Vie et Milieu* 62 (3): 143–157.  
Impakt faktor: 0.371.
- Kiss K.T., Genkal S.I., Ector L., Molnár L.F., Duleba M., Bíró P., Ács É. (2013): Morphology, taxonomy and distribution of *Stephanodiscus triporus* (Bacillariophyceae) and related taxa. *European Journal of Phycology* 48(4): 363–379.  
DOI: 10.1080/09670262.2013.843204; Impakt faktor: 2.338.
- Ács É., Borics G., Boda P., Csányi B., Duleba M., Engloner A., Erős T., Földi A., Grigorszky I., György Á. I., Kiss K. T., K. Szilágyi E., Lukács B. A., Nagy L. Zs., Pozderka V., Sály P., Szalóky Z., Szekeres J., Trábert Zs., Várbíró G. (2015): Magyarország felszíni

vizeinek ökológiai állapotértékelő módszerei. Magyar Kémikusok Lapja 70 (11): 374-380.

Grigorszky I., Kiss K. T., Pór G., Dévai Gy., Nagy S. A., Somlyai I., Berta Cs., Duleba M., Trábert Zs., Ács É. (2017): Temperature and growth strategies as the essential factors influencing the occurrence of *Stephanodiscus minutulus* (Kützing) Cleve & Möller and *Palatinus apiculatus* (Ehrenberg) Craveiro, Calado, Daugbjerg & Moestrup. *Fundamental and Applied Limnology* 189(2):167-175.  
DOI: 10.1127/fal/2016/0941; Impakt faktor: 1.170.