

dc_881_14

Mikroalgák biotechnológiai alkalmazása a növénytermesztésben és növényvédelemben

Doktori Értekezés

Dr. Ördög Vince
egyetemi tanár

Nyugat-magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Növénybiológiai Intézet

Mosonmagyaróvár

2014

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A mikroalgák biotechnológiai alkalmazásának kutatása a mezőgazdaságban csupán több tudományterület képviselőinek az együttműködésével lehet sikeres. Az elmúlt 25 évben ennek tudatában törekedtem hazai és nemzetközi kapcsolatok kiépítésére a Növénybiológiai Intézet munkáját kiegészítő kutatással foglalkozó szakemberekkel. A közös munka eredménye számos sikeres kutatási pályázat végrehajtása és jelen értekezés megírása, amiért köszönettel tartozom, a következő tudósoknak, kutatóknak, kollégáknak:

Dr. Johannes van Staden akadémikus, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, SA

Dr. Miroslav Strnad professzor, Palacky University, Olomouc, CZ

Dr. Wendy Ann Stirk kutató, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, SA

A mikroalgák növényi hormonkutatásához nyújtott segítségükért.

Dr. Németh Lajos egyetemi adjunktus, NymE-MÉK, Mosonmagyaróvár

A mikroalgák növényi gombabetegségek elleni teszteléséért.

Dr. Tóth Miklós akadémikus, MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Budapest

Dr. Benedek Pál professzor, NymE-MÉK, Mosonmagyaróvár

A káposzta gyökérlégy elleni védekezésre kiválasztott cianobaktériumok teszteléséért és kémiai vizsgálatáért.

Dr. Vörös Lajos kutató professzor, MTA Ökológiai Kutatóközpont, Tihany,

Az MACC folyamatos taxonómiai vizsgálatáért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak a kutatás mindennapjaiban nyújtott sokoldalú segítségükért:

Dr. Molnár Zoltán egyetemi docens,

Bálint Péter intézeti mérnök

Lelkes Péter intézeti mérnök, **Lobik Ildikó** laboráns, **Milkovics Judit** intézeti mérnök,

Takács Georgina intézeti mérnök és **Takács Péterné** intézeti ügyintéző.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm mindazok segítségét, akik véleményükkel, biztatásukkal és barátságukkal hozzájárultak ahhoz, hogy nyugodt kutató munkát végezhessek és az eredményekből elkészülhessem értekezésem.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	6
2. A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC)	9
2.1. Irodalmi áttekintés	9
2.1.1. Európai algagyűjtemények	9
2.1.2. Laboratóriumi mikroalga tenyészetek	12
2.1.3. Tömegtermesztési eljárások	14
2.1.4. Mikroalga termékek és értékes anyagok	15
2.1.5. Célkitűzések	19
2.2. Anyag és módszer	20
2.2.1. Talajminta gyűjtés	20
2.2.2. Mikroalgák izolálása és fenntartása	21
2.2.3. Taxonómiai meghatározás mikroszkópos és molekuláris biológiai módszerekkel	22
2.2.4. Az MACC törzsek laboratóriumi tenyésztése	24
2.2.5. Minta előkészítés vizsgálatokhoz és kísérletekhez	25
2.3. Eredmények és megvitatásuk	26
2.3.1. Előzetes molekuláris taxonómiai eredmények	26
2.3.2. Az MACC törzsek rendszertani helye és produktivitásának jellemzői	28
2.3.3. Az MACC talajalgák rendszertani helye és produktivitásának jellemzői	36
2.3.4. Az MACC helye és jelentősége az európai algagyűjtemények között	39
2.3.5. MACC-törzsek a kutatásban – múlt, jelen és jövő	40
2.4. Új tudományos eredmények	42
3. Mikroalgák növényi hormontermelése	43
3.1. Irodalmi áttekintés	43
3.1.1. A növényi hormonok szerepe a magasabbrendű növényekben	43
3.1.2. Növényi hormonok a mikroalgákban	44
3.1.3. Tengeri algakivonatok alkalmazása a mezőgazdaságban	46
3.1.4. Célkitűzések	46
3.2. Anyag és módszer	47
3.2.1. Biotesztek	47
3.2.2. Analitikai vizsgálatok	50
3.2.3. <i>Chlorella</i> tenyészetek szinkronizálása	52
3.3. Eredmények	52
3.3.1. Mikroalgák hormonszerű hatásának a kimutatása biotesztekkel	52
3.3.2. Chlorophyta algatörzsek endogén hormontartalma	55
3.3.3. A <i>Chlorella minutissima</i> sejtciklustól függő hormontermelése	60

3.4. Eredmények megvitatása	66
3.4.1. Növényi hormonok a mikroalgákban	66
3.4.2. A mikroalgák biostimulánsként történő alkalmazhatósága a mezőgazdaságban	71
3.5. Új tudományos eredmények	73
4. Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra	75
4.1. Irodalmi áttekintés	75
4.1.1. Fungicid hatású mikroalgák	75
4.1.2. Kivonat készítésétől függő hatás	77
4.1.3. Környezeti feltételektől függő hatás	78
4.1.4. Célkitűzések	80
4.2. Anyag és módszer	81
4.2.1. Vizsgált cianobaktériumok és eukarióta algák	81
4.2.2. Vizsgált növénypatogén gombák	83
4.2.3. Bioteszt eljárások fungicid és fungisztatikus hatás kimutatására	89
4.3. Eredmények	91
4.3.1. A rendszertani helytől függő hatás	91
4.3.2. A patogének szerinti hatás	93
4.4. Eredmények megvitatása	98
4.4.1. Mikroalgák antimikrobiális hatása	98
4.4.2. Biológiai növényvédelem mikroalgákkal	100
4.5. Új tudományos eredmények	101
5. Illékony szerves vegyületeket termelő MACC-törzsek a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben	103
5.1. Irodalmi áttekintés	103
5.1.1. Mikroalgák illékony szerves vegyületei	103
5.1.2. Az AVOC anyagok ökológiai szerepe	106
5.1.3. Káposzta gyökérlégy Magyarországon	108
5.1.4. Célkitűzések	109
5.2. Anyag és módszer	109
5.2.1. Vizsgált cianobaktériumok és tenyésztésük	109
5.2.2. Káposzta gyökérlégy bioteszt	110
5.2.3. Szaganyagok vizsgálata	110
5.3. Eredmények	111
5.3.1. Tojásrakást befolyásoló cianobaktérium törzsek	111
5.4. Eredmények megvitatása	115
5.5. Új tudományos eredmények	117
6. Új tudományos eredmények összefoglalása	119
7. Irodalomjegyzék	122
8. Melléklet	145

Rövidítések

16S rRNS – prokarióta riboszómális RNS kis alegysége
18S rRNS – eukarióta riboszómális RNS kis alegysége
24-*epi*CS – 24-*epi*kasztaszteron
28-HomoCS – 28-Homokasztaszteron
6-deoxo-CS – 6-deoxokasztaszteron
6-deoxo-*epi*CS – 6-deoxo-*epi*kasztaszteron
6-deoxoTE – 6-deoxoteaszteron
6-deoxoTY – 6-deoxotifaszterol
6-oxoCN – 6-oxokampesztanol
ABA – abszcizinsav
ACKU – Culture Collection of Algae at Kyiv University – Kijevi Egyetem Algagyűjteménye, Ukrajna
ACOI – Algoteca de Coimbra / Coimbra Collection of Algae – Coimbrai Algagyűjtemény, Portugália
AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome – szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ANT – antraniliát
ARA – arachidonsav
ASIB – Algensammlung am Institut für Botanik – Növénytani Intézet Algagyűjteménye, Ausztria
ATCC – American Type Culture Collection
AVOC – Algal Volatile Organic Compounds – algák illékony szerves vegyületei
BCAC – Bashkortostan Collection of Algae and Cyanobacteria – Algák és Cianobaktériumok Bashkortostan Gyűjteménye, Oroszország
BG-11 – BG-11 tápoldat (Rippka et al. 1979)
BL – brasszinolid
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
BNA – Banco Español de Algas / Spanish Bank of Algae – Spanyol Algagyűjtemény, Spanyolország
Bristol – Bristol tápoldat (Bold 1949)
Ca-SP – kalcium-spirulán
CALU – Collection of Algae in Leningrad, St. Petersburg, State University
CCAC – Culture Collection of Algae at the University of Cologne – Kölni Egyetem Algagyűjteménye, Németország
CCALA – Culture Collection of Autotrophic Organisms – Autotróf Szervezetek Gyűjteménye, Csehország
CCAP – Culture Collection of Algae and Protozoa – Alga és Protozoa Gyűjtemény, Egyesült Királyság
CD – folyamatos sötét
CD + G – folyamatos sötét + glükóz
CR – kampesztrol

CS – kasztaszteron
CT – kataszteron
cZ – *cisz*-zeatin
cZOG – *cisz*-zeatin-O-glükozid
cZR – *cisz*-zeatin ribozid
cZRMP – *cis*-zeatin ribozid-5'-monofoszfát
d.water – desztillált víz
DHA – dokoza-hexaénsav
DHz – dihidrozeatin
DHZR – dihidrozeatin ribozid
DHZRMP – dihidrozeatin ribozid-5'-monofoszfát
DNS – dezoxi-ribonukleinsav
DPA – dokoza-pentaénsav
DW – száraz tömeg
EA – etil-acetát
ECCO – European Confederation of Conservator-Restorers' Organisation – Európai Természetgyűjtemények Szervezete
EPA – eikozapentaénsav
ET – etilén
EtOH – etanol
FW – friss tömeg
G₁ – sejtciklus növekedési fázis 1
G₂ – sejtciklus növekedési fázis 2
GA – gibberellin
GS – gibberellinsav
GS₁₂ald – GS₁₂-aldehid
HAMBI – HAMBI Culture Collection – HAMBI Algagyűjtemény, Finnország
HPLC – nagy felbontású folyadék kromatográf
IAA – indol-3-ecetsav
IAAGlu – indol-3-acetil-L-glutaminsav
IAAsp – indol-3-acetil-L-aszparaginsav
IAM – indol-3-acetamid
IBA – indol-3-vajsav
iP – izopenteniladenin
IPPAS – Culture Collection of Microalgae IPPAS – IPPAS Mikroalga Gyűjtemény, Oroszország
iPR – izopenteniladenozin
iPRMP – izopenteniladenozin-5'-monofoszfát
JA – jázmonsav
L:D – fény : sötét
LOD – méréshatár
M – mitózis

dc_881_14

MACC – Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection – Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény, Magyarország
MIB – 2-metilizoborneol
MIC – Minimum Inhibitory Concentration – minimális gátló koncentráció
NIVA/CCA – NIVA Culture Collection of Algae – NIVA Algagyűjtemény, Norvégia
NYME MÉK – Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
oxIAA – 2-oxindol-3-ecetsav
PCR – Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció
PDA – burgonya-dextróz agar (Atlas 2004)
PGPR – növényi növekedést serkentő baktérium
PUA – Polyunsaturated Aldehyde – többszörösen telítetlen aldehid
PUFA – Polyunsaturated Fatty Acid – többszörösen telítetlen zsírsav
RCC – Roscoff Culture Collection – Roscoff Algagyűjtemény, Franciaország
 R_f – kromatogram relatív futtatás jele
RNS – ribonukleinsav
S – sejtciklus DNS szintézis szakasza
SA – szalicilsav
SAG – Sammlung von Algenkulturen at University of Goettingen – Göttingeni Algagyűjtemény, Németország
SCCAP – Scandinavian Culture Collection of Algae & Protozoa – Skandináv Alga és Protoza Gyűjtemény, Dánia
SzA – szárazanyag
T/O – Taste and Odour – íz- és szaganyag
Tamiya – Tamiya tápoldat (Kuznetsov & Vladimirova 1964)
TE – teaszteron
TRA – triptamin
TRP – triptofán
TY – tifaszterol
tZ – *transz*-zeatin
tZ9G – *transz*-zeatin-9-glükózid
tZR – *transz*-zeatin ribozid
tZRMP – *transz*-zeatin ribozid-5'-monofoszfát
UPLC-MS/MS – ultra felbontású folyadék kromatográf – tandem tömegspektrográf
WFCC – World Federation for Culture Collections – Természetgyűjtemények Világszövetsége
Z – zeatin
Zehnder-8 – Zehnder-8 tápoldat (Zehnder & Gorham 1960)

1. Bevezetés

Az algológusok negyed évszázaddal ezelőtt még klorofill-*a*-t tartalmazó, telepes, valódi gyökérre, szárra és levélre nem tagolódó növényeknek tekintették az algákat (Lee 1989). A megfogalmazásba beleértették a cianobaktériumokat is. Ma a cianobaktériumokat a prokariótákhoz soroljuk, amelyek sejtmagot, Golgi apparátust, endoplazmatikus retikulumot, mitokondriumot és szintesteket nem tartalmazó élőlények, míg az eukarióták mindezen sejtalkotókat tartalmazzák (Hoek et al. 1998). Az eukarióta algák polifiletikus eredetűek, több, egymástól független fejlődési irányt követnek. Alakjuk, méretük, szerveződési szintjük, életmódjuk és anyagcseréjük nagy változatosságot mutat. Méretük a planktonikus egysejtűektől (kb. 1 μm -tól) a makroszkópikus óriás algákig (akár 60 m) terjed (Sharma & Rai 2011). Az alkalmazott algológia által használt mikroalga fogalom magában foglalja a mikroszkópikus méretű eukarióta algák különböző divízióit és az oxigéntermelő, fotoszintetikus baktériumokat, vagyis a cianobaktériumokat is (Tomaselli 2004). Az értekezésben a mikroalga kifejezést ilyen értelemben használom. A mikroalgák többnyire vízben élnek, de különböző talajtípusok felszínén is megtalálhatók. Talajalgaként említem a talaj bizonyos rétegéből vagy a talaj felszínéről gyűjtött, „talajvirágzást” okozó, zöld-sárga-kék-fekete színű foltokból izolált mikroalgákat. A talajalgák a vízi mikroalgákhoz viszonyítva sokkal szélsőségesebb és gyorsan változó fizikai, kémiai és biológiai környezetben élnek. A szinte állandó stresszhelyzethez alkalmazkodó anyagcseréjükkel, vagy éppen bioaktív anyagok termelésével válaszolnak, tehát a biotechnológia számára értékesebbek, mint a vízi mikroalgák.

Az alkalmazott algológia, vagyis a mikroalga biotechnológia kezdetét 1890-től számítjuk, amikor Beijerinck az akkor használatos mikrobiológiai módszerekkel létrehozta az első baktériummentes (axénikus) *Chlorella* tenyészetet (Beijerinck 1890). A mikroalga biotechnológia az izolált mikroalgák tenyészetét törzstenyészetnek, ill. mikroalga törzsnek nevezi. Törzsek tömeges izolálását és fenntartását algagyűjteményekben Pringsheim az 1910-es években kezdte meg. Több gyűjteményben helyezte el az izolált mikroalga törzseket, pl. Halle/Saale-ban, Berlinben, Prágában, Cambridge-ben és Göttingenben (Mollenhauer 2004). Az Európában fellelhető algagyűjtemények többsége vízből izolált mikroalga törzsekből áll. A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC) létrehozásakor az „értékesebb”, ill. annak vélt talajalgák izolálása volt a fő cél.

Mikroalgák, nevezetesen kovamoszatok tömegtermesztése a második világháború idején Németországban kezdődött biohajtóanyag előállítására. A sikertelen próbálkozásról alig áll rendelkezésre írásos közlemény (Harder & Witsch 1942). A világháborút követő élelmiszerhiány vezetett az „egysejt” fehérje termeléshez. A laboratóriumi körülmények között gyorsan szaporodó és mintegy 50% fehérjét tartalmazó *Chlorella* és *Scenedesmus* törzsek tömegtermesztése 1942-ben Németországban kezdődött, 1948-tól pedig az Egyesült Államokban, Japánban, Izraelben, Olaszországban és más országokban folytatódott (Soeder 1979). Magyarországon, Budapesten Tangl Harald, Tihanyban Felföldy Lajos, Mosonmagyaróváron pedig Márton Géza és munkatársaik már az 1950-es évektől végeztek mikroalga tömegtermesztési kísérleteket (Felföldy és mtsai 1964, Márton és mtsai 1968, Tangl & Machay 1956). A mikroalga tömegtermesztés első nemzetközi eredményeit Burlew (1953)

szerkesztette kötetbe. A túlbecsült terméseredmények elmaradása, a biomasszában lévő fehérje korlátozott emészthetősége és a magas termelési költségek egy időre a tömegtermesztés végéhez vezettek. A mikroalga biotechnológiának új lendületet az 1980-as években az értékes anyagok előállításának gondolata és zárt algatermesztő berendezések kifejlesztése adott. A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), poliszacharidok, antioxidánsok, természetes színanyagok, biológiailag aktív anyagok, valamint kozmetikai, élelmiszeripari és gyógyszeripari alapanyagok magas ára tette kifizetődővé a mikroalgákkal történő értékes anyagok termelését még a magas beruházási és üzemeltetési költségek mellett is (Borowitzka 2013, Pulz & Gross 2004).

Az üvegházhatású gázok fokozott kibocsátása által okozott globális felmelegedés és a fosszilis üzemanyag ellátás bizonytalan jövője az utóbbi évtizedben új kutatási területet adott a mikroalga biotechnológusoknak. A hektáronkénti 50 tonnához közeli éves szárazanyag termelés mintegy 100 tonna széndioxid felvételével jár. A termelt biomasszából kinyerhető 10-15 tonna bioüzemanyag és a 20-30% fehérjetartalmú biomassza maradék felhasználása nagy reményeket keltett. A mikroalgák az olajos növényekkel szemben számos előnyt mutatnak: (1) nem versenyeznek az emberi fogyasztásra vagy állati takarmányozásra használható növényekkel a földterületért; (2) nagyobb a biomassza termelésük; (3) kevesebb a vízigényük, mert szennyvízen is szaporíthatók; (4) más célra nem alkalmas területeken is termesztethők, (5) csökkentik a CO₂-kibocsátást; stb. (Chisti 2007, Mata et al. 2010). A kutatók és vállalkozók már-már 100-200 hektáros algaüzemek kialakítását vizionálták. A bioüzemanyag termelésnek azonban van két kritikus pontja, a negatív energetikai mérleg és a túl magas költségek. Ma még több energiával állítunk elő bioüzemanyagot, mint amennyi energiát maga a bioüzemanyag képvisel. Az előállítási költség sem versenyképes a fosszilis energiaforrások árával (Chisti 2007, Stephens et al. 2010). A két kihívás olcsóbb és olcsóbban működtethető algatermesztő berendezések kifejlesztésére ösztönözte a biotechnológusokat. Ennek eredményeként a korábbi 10-50 € helyett ma már 3-5 Euróra csökkent a mikroalgák száraz biomasszájának a kilogrammonkénti termelési költsége, ami lehetővé teszi a mezőgazdaság számára is piacképes mikroalga termékek előállítását.

A N₂-kötő cianobaktériumok mezőgazdasági alkalmazásának a jelentőségét De már 1939-ben felismerte. A rizsföldek oltása cianobaktériumokkal, az ún. algalizálás 1951-ben kezdődött Japánban (Watanabe et al. 1951). A hektáronként megkötött legfeljebb 30 kg nitrogén azonban nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ezért ma már csupán műtrágyát nem, vagy alig használó országokban, pl. Indiában és Mianmarban oltják cianobaktériumokkal a rizsföldeket. Magyarországon nitrogénkötési céllal nincs gyakorlati jelentősége a talajok algalizálásának.

A mikroalgák, általában a szaporodás lassuló szakaszában másodlagos anyagcsere termékeket termelnek, amelyek az emberiség számára fontos biotechnológiai termékek. Ide tartoznak egyebek között szerves savak, szénhidrátok, aminosavak és peptidek, vitaminok, növekedést szabályozó anyagok, antibiotikumok, enzimek és toxikus vegyületek. Az algák bioaktív anyagai már több mint fél évszázada állnak az érdeklődés középpontjában (Pringsheim 1949). Manapság leginkább a gyógyszeripar és a mezőgazdaság potenciális alapanyagai lehetnek. A szintetikus peszticidek és gyógyszerek társadalmi elfogadottságának a csökkenése

az utóbbi időben lökést adott a természetes eredetű hatóanyagok kutatásának, amit az Európai Unió is támogat. Az algák elsősorban növényi növekedést szabályozó és növényvédő hatású anyagaik miatt értékesek a mezőgazdaság számára.

Mosonmagyaróváron az elmúlt közel 25 évben nemzetközi, az utóbbi évtizedben pedig hazai együttműködés keretében is vizsgáljuk a mezőgazdasági hasznosíthatóság érdekében a mikroalgák: (1) növényi hormontermelését; (2) növénypatogén gombák elleni hatékonyságát; és (3) illékony szerves vegyületeit. Jelen értekezésben a két évtizedes munka tudományos eredményeit és azok gyakorlati vonatkozásait foglalom össze az alábbi **főbb célkitűzések** köré csoportosítva:

1. Hazai és nemzetközi együttműködésben végzett kutatásokra szolgáló **algagyűjtemény létrehozása**, amelynek egyediségét brazil és magyar talajokból izolált algatörzsek adják.
2. A **mikroalgák növényi hormontermelésének megismerése** annak eldöntésére, hogy a termesztett növényekre kijuttatott tengeri algakivonatokhoz hasonlóan alkalmasak lehetnek-e a termés növelésére és/vagy egyéb kedvező hatás elérésére.
3. Mikroalgák **növénypatogén gombabetegségek elleni hatásának megismerése** részint hatásos törzsek kiválasztására, részint az antimikrobiális hatás gyakoriságának az értékelésére.
4. Annak a felismerésnek az igazolása, hogy **mikroalgák illékony szerves anyagai** rovarrepellens (vagy attraktáns) hatásúak lehetnek.

A könnyebb érthetőség kedvéért az értekezésben a vonatkozó irodalmi áttekintést, a felhasznált anyagokat és módszereket, továbbá az eredményeket a fenti célkitűzéseknek megfelelően önálló fejezetekben mutatom be a célkitűzések részletesebb leírásával és az új eredmények összefoglalásával együtt.

2. A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC)

2.1. Irodalmi áttekintés

2.1.1. Európai algagyűjtemények

Az algagyűjtemények létrehozásának feltételeit Beijerinck és Pringsheim teremtették meg (**2.1. ábra**). Beijerinck létrehozta az akkori mikrobiológiai módszerek felhasználásával az első baktériummentes *Chlorella* tenyészetet (Beijerinck 1890). Pringsheim munkásságához több algagyűjtemény alapítása fűződik (Day et al. 2004). Az 1920-as években, Prágában a Károly Egyetem (Charles University) német részén dolgozott és izolált mikroalgákat. Az első 49 törzs listáját 1928-ban közölte (Pringsheim 1928). Közvetlenül a II. világháború előtt, 1938-ban Cambridge-be menekült, de magával vitte mikroalga törzseit és megeremtette az Alga és Protozoa Gyűjtemény (CCAP, Windermere – UK) alapját. Pringsheim a CCAP-ból 1953-ban Göttingenbe hozott törzsekkel megkezdte a Göttingeni Algagyűjtemény (SAG, Göttingen – Németország) létrehozását, ami részint kutatási célokat szolgált részint szolgáltató központ volt más kutatók számára (Mollenhauer 2004).



2.1. ábra: Martinus W. Beijerinck (balra) holland botanikus létrehozta az első axénikus algatenyészetet. Ernst G. Pringsheim (jobbra) jelentős algagyűjteményeket hozott létre.

Az Európai Tenyészetgyűjtemények Szervezete (ECCO) és a Tenyészetgyűjtemények Világszövetségének (WFCC) interneten hozzáférhető adatai szerint Európában 43 mikroalga gyűjtemény található. Az összes fenntartott törzs száma 32808, aminek mintegy 86%-a 23 nagyobb, 500 feletti törzset tartalmazó gyűjteményben található (**2.1. táblázat**). A Nova

Hedvigia 79(1-2) külön kötete mutatja be a legnagyobb európai gyűjteményeket, amelyek közül néhány különösen értékes.

Nagy fajgazdagságú édesvízi algatörzset tartalmaz:

- a Coimbrai Algagyűjtemény (ACOI, Coimbra - Portugália),
- a Göttingeni Algagyűjtemény (SAG, Göttingen – Németország).

Talajalgákból álló gyűjtemények:

- a Növénytan Intézet Algagyűjteménye (ASIB, Innsbruck - Ausztria),
- az Algák és Cianobaktériumok Bashkortostan Gyűjteménye (BCAC, Ufa – Oroszország).

Elsősorban cianobaktériumokból, köztük sok toxikus törzsből áll:

- a NIVA Algagyűjtemény (NIVA/CCA, Oslo - Norvégia).

Axénikus törzseket tart fenn, ill. erre törekszik:

- a Kölni Egyetem Algagyűjteménye (CCAC, Köln - Németország)

Európán kívüli országokban több, összesen 65 gyűjtemény található, de csupán 11-ben van 500-nál több törzs. Az összesen 22255 törzsnek több mint 40%-át az USA-ban, Japánban és Koreában lévő gyűjteményekben tartják fenn (2.2. táblázat).

2.1. táblázat: Az Európában fenntartott 500 törzsnél nagyobb algagyűjtemények országok szerint.

Országok	Gyűjtemények száma	Törzsek száma	*Cianobaktérium	*Eukarióta alga
Franciaország	5	4714	1674	3040
Németország	3	4139	245	3894
Portugália	1	3631	544	3087
Oroszország	4	2607	601	2006
Egyesült Királyság	2	2938	173	2765
Dánia	1	2062	48	2014
Ausztria	1	1570	33	1537
Spanyolország	1	1519	682	837
Norvégia	1	1118	823	295
Ukrajna	1	1023		
Finnország	1	1000	1000	
Magyarország	1	970	280	690
Csehország	1	844	345	499
Összesen	23	28135	6448	20664

2.2. táblázat: Az Európán kívüli országokban fenntartott 500 törzsnél nagyobb algagyűjtemények országok szerint.

Országok	Gyűjtemények száma	Törzsek száma	Cianobaktérium	Eukarióta alga
Kína	2	1158	551	607
Egyesült Államok	2	4700	315	4385
Japán	2	2748	713	2035
Korea	2	2054	44	2010
Ausztrália	1	1460	311	1149
Thaiföld	1	559		559
Brazília	1	500	25	475
Összesen	11	13179	1959	11220

A fenntartók egyik nagy szakértelmet igénylő feladata a gyűjtemény mikroalga törzseinek taxonómiai azonosítása. Már Pringsheimnek is meggyűlt a baja a taxonómiával. A sejtbiológia egésze érdekelte, például a tenyészetek segítségével vizsgálta élettanukat és alakítani változatosságukat, de egyáltalán nem érdekelte a taxonómia. Mindazonáltal állandóan és okkal bírálta a mikroalgák taxonómiájának hiányosságait, de nem volt hajlandó részt venni a megoldások keresésében, mondván ez nem az ő „üzlete” (Mollenhauer 2004). Ma már egyértelmű, hogy a mikroalgák tisztán morfológiai alapon történő azonosítása sok esetben lehetetlen. A mikroalga gyűjtemények fenntartóinak 2008 évi találkozójáról (Oban – UK) készült beszámoló szerint viszont még nagyon kevesen ismerik és még kevesebben használják a molekuláris biológiai módszerekkel DNS-alapon történő fajmeghatározást (Surek 2008). Utóbbi módszer sem tökéletes az azonosításhoz használt adatbázisokba betáplált olykor téves adatok miatt. A hagyományos taxonómia és a DNS-alapú meghatározás együtt adhat megoldást a taxonómusoknak.

A fenntartóknak nagy kihívást jelent a gyűjtemény fenntartása generációkon keresztül és a költségek finanszírozása. Gyakori eset, hogy a fenntartó távozását a gyűjtemény megszűnése vagy megszüntetése követi. Az algagyűjtemények sosem voltak a tudomány „kedvelt gyermekei”, amiket támogatni vagy fejleszteni akart. Miután nem lehet őket könnyen bemutatni, nem versenyezhetnek a banánnal, pálmafákkal és dísznövényekkel benőtt üvegházakkal, ezért nem ismertek, nem népszerűek és államilag rendszerint nem is támogatottak (Mollenhauer 2004). A nagy fajgazdagságú kutatás-orientált gyűjtemények hosszú távú finanszírozása ezért bizonytalan. A fogyasztó-orientált kis gyűjtemények fennmaradása és pénzügyi biztonsága könnyebben biztosítható. Az algagyűjtemények alapítóinak, majd fenntartóinak kell eldöntenie, hogy mindezek ismeretében milyen célokat tűznek ki és milyen feladatokat vállalnak, amelyek például az alábbiak lehetnek és persze idővel változhatnak:

- oktatás és autentikus algafajok fenntartása,
- algatörzsek eladása egyetemek, kutatóhelyek és fogyasztók számára,
- saját kutatás, pl. taxonómiai, élettani ismeretek bővítése,

- konzorciumi kutatás alkalmazott biotechnológiai célokkal.

A kutatási célú gyűjtemények fenntartói tehát pénzügyi bizonytalansággal kell szembenézzenek, de ha „eladható” kutatási témát választanak, akkor a kutatás idejére nagyobb pénzügyi forrásokat szerezhetnek, mint a törzsek egyszerű eladásából. A gyűjtemények jövőképe ezért a törzsek krioprezervációval történő fenntartása, továbbá tesztelése értékes anyagok keresésére és azok biotechnológiai alkalmazása lehet. A költségcsökkentő fagyasztva fenntartásra, a krioprezervációra megbízható szabvány eljárás sajnos még nem áll rendelkezésre.

Fentiek figyelembe vételével az MACC létrehozásával és fenntartásával hosszabb távú célunk hazai és nemzetközi konzorciumi kutatás keretében a törzsek tesztelése értékes anyagok kutatására és azok alkalmazott biotechnológiai felhasználása.

2.1.2. Laboratóriumi mikroalga tenyészetek

Törzstenyészetek előállítása és fenntartása

Algaminták gyűjtése történhet vízből, talajból szilárd felületekről, stb., attól függően, hogy cianobaktériumot, eukarióta algát, vagy konkrétan adott fajt szeretnénk izolálni. Biotechnológiai célokra a természetben gyorsan szaporodó, domináns, pl. vízvirágzást, vízszíneződést, vagy talajvirágzást okozó, tehát egy, vagy csupán néhány fajból álló algaegyüttesek gyűjtése lehet célszerű. A minták algáit minden esetben steril eszközökkel és edényekbe gyűjtjük. Adott faj célzott keresésekor mikropipettával, fordított rendszerű (Uthermöl) mikroszkóp alatt történhet az izolálás (Pringsheim 1949, Stein 1973). A vízmintákat agar felszínén szétkenhetjük, vagy agar felszínére permetezhetjük (Wiedeman et al. 1964). Ugyanezt megtehetjük, ha a talaj- vagy vízmintákat először tápoldatban laboratóriumi körülmények között felszaporítjuk. Helyezhetünk apró talajdarabokat, vagy egyéb szilárd felületről gyűjtött mintákat agar felszínére, amelyekből mikroalgák, például cianobaktérium fonalak, vagy kovamoszatok nőhetnek ki. A cél minden esetben egyetlen sejtből/sejtfonalból indított klóntenyészet létrehozása. Baktériummentes klóntenyészetek izolálási módszereit több összefoglaló cikk tárgyalja (Hoshaw & Rosowski 1973, Guillard 1973, Melkonian 1990).

A törzstenyészetek fenntartása 50 vagy 100 cm³ térfogatú lombikokban, vagy ennél kisebb térfogatú kémcsövekben, agarral szilárdított tápközeg felszínén (pl. SAG) vagy tápoldatban (pl. ACOI) történik (személyes tapasztalat). A tenyészetek szaporodásának a lassítása alacsony fényintenzitás (20-40 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) és hőmérséklet (15 $\pm$ 2°C) biztosításával érhető el (Ördög 1984). Ilyen körülmények között a törzstenyészetek átoltására rendszerint 3-12 havonta van szükség.

A gyűjtemények fenntartási költségeinek a csökkentésére és a törzsek genetikai stabilitásának a hosszú távú biztosítására szolgál a mikroalga törzsek fagyasztva fenntartása, a krioprezerváció. A Pringsheim által izolált törzseket több gyűjteményben közel egy évszázada tartják fenn. Algákkal kapcsolatban eddig ugyan még nem írták le, de a folyamatos átoltás ennyi idő alatt genetikai változást idézhet elő. Törzsek veszhetnek el fertőzések és emberi mulasztás, pl. rossz címkézés miatt. A krioprezerváció vonzó alternatív megoldást jelent a problémák

elkerülésére (Day & McLellan 1995, Brand & Diller 1998). A krioprezerváció élő sejtek határtalan ideig történő fenntartását jelenti ultra-alacsony hőmérsékleten (Karlsson & Toner 1996). A sikeres krioprezervációnál a kioltás után a sejtek genetikailag azonosak maradnak a lefagyasztás előtti sejtekkel. A határtalan idő legalább évtizedeket, az ultra-alacsony hőmérséklet pedig legalább -130 °C-ot jelent.

Brand & Diller (2004) a különböző mikroalgák krioprezerváláshoz történő előkészítésére a metilalkohol és az ennél megfelelőbbnek ígérkező dimetilszulfoxid további vizsgálatát javasolta. Megállapították továbbá, hogy a híg tenyészetek sikerebben krioprezerválhatók, mint a sűrű tenyészetek. A mikroalgák fenntartása krioprezervációval egyszerűnek tűnő kétféle folyamat, ami a legsikeresebb a cianobaktériumoknál és az egysejtű Chlorococcales zöldalgáknál. Már számos hatékony leírás áll rendelkezésre, amelyekkel bizonyos törzsek hosszú távú genetikai stabilitása és életképessége biztosítható. A cél ennek kiterjesztése minden mikroalgára, ami persze aligha megvalósítható, mert mindig lesznek olyan mikroalgák, amelyek krioprezerválással nem tarthatók fenn (Day 2004). Az Európai Unió megfelelő eljárások kidolgozásának az érdekében több algagyűjtemény részvételével támogatott egy projektet, ami számos eredményt hozott, de nem adott szabvány eljárást a mikroalgák krioprezervációjára (Day et al. 2005, Day 2007). Rastoll et al. (2013) cianobaktériumokkal végzett kísérleteik eredményeit biztatónak tartották, de még ezek is csupán 80-90%-os sikerre vezettek. A mikroalgák krioprezervációjának általános bevezetéséig, minden előnye ellenére még jelentős kutatási feladatok állnak az algológusok előtt.

Laboratóriumi algatenyészetek

Mikroalgák laboratóriumi tenyészeiről már évtizedekkel ezelőtt készültek összefoglaló művek (Fogg 1975, Marvan et al. 1979, Pringsheim 1954). A tenyésztési módok szerint vannak egyszeri és félig folyamatos vagy folyamatos tenyészetek. Az egyszeri algatenyésztésnél a tápoldatot beoltjuk algával és bizonyos inkubációs idő után szüreteljük a teljes algaszuszpenziót, majd a folyamatot kezdjük előlről. A tenyészetek lassú szaporodását a logaritmikus, gyors szaporodás követi, majd a stacioner fázisban a szaporodás megáll. A vizsgálatok céljától függően biomassza minták gyűjtése a tenyészet gyors szaporodási vagy stacioner szakaszában történhet. A másodlagos anyagcseretermékek rendszerint a stacioner szakaszban termelődnek. Az egyszeri tenyésztési eljárás mellett a másik tenyésztési módnál az ún. turbidosztátban a tápoldat adagolása és a szüretelés folyamatosan vagy félig folyamatosan történik. A szüretelés mértékével befolyásoljuk és tartjuk állandó szinten a tenyészet sűrűségét (Miller & Fogg 1957). A kemosztátnál a tápoldat adagolás mértéke állandó és folyamatos, de a tápoldatban van egy limitáló tápanyag, ami meghatározza a tenyészet sűrűségét, és ez előbb-utóbb egy állandósult, egyensúlyi állapot kialakulásához vezet (Monod 1950, Novick & Szilard 1950).

Laboratóriumban szaporíthatunk sok fajtól álló fitoplankton mintát vagy célszerűen összeválogatott 2-3 faj/törzset. A legtöbbször egyfajtenyészetrel vagy axénikus egyfajtenyészetrel dolgozunk (Ördög 1982). Utóbbiak lehetnek aszinkron vagy szinkron tenyészetek. Szinkron tenyészetekben adott időpontban minden sejt a sejtciklus azonos szakaszában van. Például a *Chlorella* és *Scenedesmus* sejtek a sötét szakasz kezdetén

osztódnak, így a fényszakaszba csupán apró, fiatal sejtek lépnek, amelyek a fényszakaszban a fotoszintézis következtében folyamatosan nőnek, a fényszakasz végén pedig felkészülnek a sötétben bekövetkező osztódásra. A szinkronizálás különböző módszerekkel érhető el. Tamiya et al. (1953) az első szinkrontenyészethez centrifugálással különítették el méret szerint a *Chlorella ellipsoidea* sejteket. A *Chlorella* és *Scenedesmus* fajok legegyszerűbben a megvilágítás hosszának a helyes megválasztásával, ún. „programozott” fény-sötét ciklusokkal és a tenyészet hígításával szinkronizálhatók (Tamiya 1966). Krupinska és Humbeck (1994) áttekintő cikkben tárgyalták, hogy egy osztódást serkentő faktor, a fény osztódást gátló hatása, a fotoszintézis vagy egy belső óra áll a szinkronizálás hátterében. Következtetésük az, hogy a fény a szinkronizáció előfeltétele, amihez a fotoszintézis révén növekvő sejtekre van szükség. A szinkron tenyészetek ideális eszközei a sejtciklushoz kötődő anyagcsere folyamatok vizsgálatának, pl. DNS-, RNS- és fehérje szintézis. Alkalmas annak megállapítására is, hogy sejtciklushoz kötött-e a növényi hormonok termelése, amit az értekezés következő fejezetében tárgyalok.

Az értekezésben leírt kísérletekhez saját tervezésű laboratóriumi tenyésztő berendezésben (Ördög 1982) egyszeri algatermesztési és szinkrontenyésztési eljárást használtunk és ugyanígy szaporítottuk a különböző vizsgálatokhoz szükséges mikroalga mintákat is.

2.1.3. Tömegtermesztési eljárások

A mikroalgákat nyitott termesztő berendezésekben, vagy zárt fotobioreaktorokban szaporítják. A nyitott rendszerek lehetnek különböző méretű tavak, változatos felépítésű „raceway” tavak, vagy kaszkádos rendszerű berendezések. Az egyszerű tavak csupán speciális esetekben használhatók, pl. Mianmarban kráter tavak lúgos, nátrium-hidrogénkarbonátos vizében a kifejezetten ilyen vízigényű *Arthrospira platensis* kiválóan szaporítható és más mikroalgákkal való fertőződéstől sem kell tartani (Min Thein 1993). A „raceway” tavakban a mikroalga szuszpenziót változatos felépítésű, hosszúkas, középen kettéválasztott sekély medencékben lapátkerekkel mozgatják. A rendszert az 1950-es évektől használják algatermesztésre és az ötlet megvalósítójáról Oswald tavaknak is nevezik. Manapság a kereskedelemben nagy tételben kapható mikroalgákat néhány kivétellel ilyen nyitott rendszerekben szaporítják (Tredici 2004). Hátrányuk, hogy a 15-30 cm mély tavakban az elérhető legnagyobb biomassa 1 g szárazanyagnál nem több literenként (Grobbelaar et al. 1990). A másik nyitott termesztő rendszer kaszkádos, amiben a végső biomassa sűrűsége 5-10 g is lehet literenként. Ebben a tetőszerűen lejtős rendszerben vékony, akár néhány milliméteres rétegben folyik lefelé a berendezés felső részére folyamatosan visszaszivattyúzott mikroalga szuszpenzió. A csekély rétegvastagság jobb átvilágítottságot és nagyobb sűrűségű szuszpenziót eredményez. A sűrű szuszpenzióból a mikroalga kinyerése kevésbé költséges, mert kevesebb szuszpenzióból lehet ugyanannyi mikroalgát kinyerni. A zárt fotobioreaktorok két fő típusa a csöves és a lapos vagy lemezes. Az intenzív algatermesztésre alkalmas fotobioreaktoroknál a csövek 3-5 cm

átmérőjűek, a lapok pedig 3-5 cm rétegvastagságúak. A 15-20 cm átmérőjű csöves berendezésekben csupán a nyitott rendszerekhez hasonló biomassza sűrűség érhető el.

A nyitott és a zárt rendszerekben egyaránt van néhány tényező, ami energiaigényes és/vagy költséges (Chisti 2007, Molina Grima et al. 1999, 2001, Oswald 1989, Pulz 2001, Tredici 1999, 2004):

1. a fotoszintézis során termelődött oxigén felhalmozódásának a megakadályozása,
2. a mikroalga szuszpenzió folyamatos mozgásban tartása,
3. hőszabályozás,
4. természetes vagy mesterséges fényforrás biztosítása,
5. széndioxid-adagolás.

A mikroalga termesztés legjelentősebb energia és költség tényezői közé tartozik a mikroalgák szüretelése, a sejtek feltárása és a szárítás (Molina Grima et al. 2003).

A mikroalga termesztés fejlődésének új iránya kezdődött a mikroalgákkal történő bioüzemanyag termelés ismételt előtérbe kerülésével. Az üvegházhatású gázok, pl. a széndioxid kibocsájtás okozta globális felmelegedés, valamint a fosszilis energiaforrások korlátozott mennyisége és az ellátás bizonytalansága a mikroalgák felé fordította a figyelmet. A nagy lipidtermelő mikroalga törzs(ek) kiválasztása mellett ugyanis kulcskérdés olcsón működtethető és olcsó mikroalga termesztő berendezések kifejlesztése. Az olaj kinyeréséhez és biodízel előállításához mindegy milyen típusú termesztő berendezésben készült a mikroalga biomassza, csak olcsó legyen. Az új fejlesztések révén Chisti szerint 2007-ben 3-4 USD-be került egy kilogramm mikroalga biomassza (Chisti 2007). Ez ugyan még nem teszi gazdaságossá a biodízel termelését mikroalgákkal, de már olyan ár, ami a mezőgazdaság számára elfogadható. Következésképp ma már reális elképzelés az, hogy a növénytermesztés és a növényvédelem számára értékes mikroalga törzsekből piacképes termékeket állítsunk elő.

Mosonmagyaróváron olcsó és olcsón működtethető zárt rendszerű tömegtermesztő rendszert dolgoztunk ki – kísérleti célokat szolgáló – nagyobb mennyiségű (száz gramm nagyságrend) mikroalga biomassza előállítására, de a berendezés bemutatása nem tárgya az értekezésnek.

2.1.4. Mikroalga termékek és értékes anyagok

Mikroalgák értékes anyagairól és mikroalgákból készült termékekről az elmúlt évtizedben több összefoglaló közlemény jelent meg (Cardozo et al. 2007, Gupta et al. 2013, Milledge 2011, Perez-Garcia et al. 2011, Pignolet et al. 2013, Pulz & Gross 2004, Rastogi & Sinha 2009, Walker et al. 2005). A mikroalgák az akvakultúra alapját jelentik. A vízi táplálékláncon át biztosítják a vízi szervezetek számára a szerves anyagokat. Egyes fajok, pl. az *Isochrysis galbana*, a *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira pseudonana* szaporítása és etetése halak lárváival, puhatestűekkel, rákokkal és kerekessérgekkel költséges, de szükséges gyakorlat (Borowitzka 1997, Hemaiswarya et al. 2011). Alga-termék előállítása mikroalgák értékes anyagaiból akkor célszerű, ha az teljesít néhány feltételt:

1. csupán az algák képesek termelni,

2. az algákban nagyobb koncentrációban fordulnak elő, mint más szervezetben.
3. algákkal állíthatók elő a legolcsóbban.

A mikroalgákban talált értékes anyagok közül csupán néhányból készült a kereskedelemben kapható termék. Emberi fogyasztásra alkalmas *Chlorella* és *Arthrospira* tabletták, készítmények mellett elsősorban színanyagokat és többszörösen telítetlen omega-3 zsírsavakat tartalmazó termékek megtalálhatók a kereskedelmi forgalomban.

Színanyagok

Tengeri mikroalgák színanyagainak, különösen a karotinoidoknak a kedvező biológiai hatását Heydarizadeh et al. (2013) foglalták össze. Az astaxantint, kantaxantint, zeaxantint, β -karotint, luteint, stb., allergia-ellenes, rák-ellenes, antioxidáns, gyulladásgátló és szemet védő hatásúnak írták le. Megállapították, hogy a színanyagok termelése nagymértékben függ a környezeti feltételektől és szinergikus hatásban lehetnek más biológiailag aktív anyagokkal, mint például az omega-3 zsírsavakkal.

Borowitzka (2013) szerint a β -karotin és az astaxantin a két legfontosabb természetes mikroalga karotinoid termék. A β -karotin az első piacra került értékes alga-termék volt, amit az 1980-as években kezdtek nagyüzemi módon előállítani a *Dunaliella salina* tengeri zöldalgából Izraelben, Ausztráliában és az USA-ban. Ausztráliában van a világ legnagyobb, ilyen célra használt, nyitott algatermesztő rendszere. Két oka is volt annak, hogy a *D. salina* volt az első értékes algatermék (300-1500 USD kg⁻¹): (1) minden más szervezettel összehasonlítva a legnagyobb a β -karotin tartalma, és (2) magas sótartalmú tápközegekben szaporodik, ami gátolja a tenyészet fertőződését más szervezetekkel.

A második kereskedelmi forgalomba került karotinoid a *Haematococcus pluvialis* édesvízi zöldalga által termelt astaxantin volt (Cysewski & Lorenz 2004). A természetben a legnagyobb természetes astaxantin forrás a *H. pluvialis*, amit mesterséges körülmények között kétszakaszos termesztő berendezésben termesztnek. Az első szakaszban zöld, mozgó alakok termelődnek a zárt fotobioreaktorban. A második szakaszban stressz hatására astaxantinban gazdag, vörös színű aplanospórák képződnek a nyitott algatermesztő berendezésbe átvitt tenyészetben. Izraelben ez a második szakasz is zárt, csöves algatermesztőben történik közel 4 hektár felületű berendezésben (Boussiba et al. 1997). Fénystressz hatására a mozgó alakok 24 órán belül elvesztik ostorukat, gömb alakot vesznek fel és astaxantin tartalmuk elérheti a szárazanyag tartalom 2-3%-át is (Boussiba et al. 1999). Az astaxantin piac kialakítása nehezebb volt, mint a β -karotiné, ugyanis túl drága volt ahhoz, hogy a lazac húsának a színesítésére használják. Antioxidáns hatása miatt azonban hamarosan sikerült engedélyeztetni emberi fogyasztásra, ami megnövelte a fizetőképes piacot.

A fikobilinek, vagyis a fikocianin, fikoeritrin és allofikocianin a cianobaktériumokban (pl. *Arthrospira*) és a vörösmoszatokban (pl. *Porphyridium*) fordulnak elő. Vízoldható, az élelmiszeriparban és a kozmetikai iparban használatos színanyagok. Az *Arthrospira* magas hidrogénkarbonát tartalmú és pH-értékű vizekben szaporodik, ami a *Dunaliella*-hoz hasonlóan megóvjá a tenyészetet a külső fertőzésektől. Mianmarban kráter tavak vizével táplált „raceway” tavakban termesztik nagy mennyiségben (Min Thein 1993).

Zsírsavak

A mikroalgák az elsődleges termelői a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen (PUFA) omega-3 zsírsavaknak, amelyek a vízi tápláléklánccal jutnak el a halakig és a halat fogyasztó emberig. Az eikozapentaénsav (EPA) és dokozahexaénsav (DHA) a mikroalgák által termelt egészségvédő PUFA-khoz tartozik. Az algákból származó omega-3 és a szárazföldi növényekben előforduló omega-6 zsírsavak alacsony aránya az ember étrendjében kardiovaszkuláris betegségek kialakulását okozhatja (Khozin-Goldberg et al. 2011). A DHA és linolsav arány csökkenése a húsevőknél a vízi tápláléklánctól való eltávolodást és a fokozottabb egészségügyi veszélyeztetettséget jelzi (Koussoroplis et al. 2008).

A mikroalga fajok/törzsek lipid tartalma és zsírsav összetétele lényegesen különbözik egymástól és a környezeti feltételektől függően változik (Basova 2005, Ördög et al. 2013). Az első forgalmazott PUFA tartalmú alga a heterotróf módon tenyésztett *Cryptocodinium cohnii* dinoflagelláta volt, aminek DHA tartalmát napraforgó olajjal 40%-ra állították be (Wynn et al. 2010). Egy DHA-ban és EPÁ-ban gazdag olaj mostanában került a piacra, amit *Schizochytrium*-mal termeltek, de egyéb hasonló termék nincs forgalomban (Borowitzka 2013). Kérdés, hogy a fototróf módon termesztett, PUFA-ban gazdag mikroalgák versenyképesek lesznek-e a heterotróf módon termesztett algákkal és a halolajjal. Új algák izolálása, vagy a termesztési eljárás optimalizálása javíthat a gazdaságosságon.

Mikroalgák egyéb értékes anyagai

A cianobaktériumok által termelt extracelluláris poliszacharidok sűrítő vagy szuszpenzióban tartó és kationokat megkötő anyagok lehetnek (De Philippis et al. 2001). Az utóbbi évtizedben szerzett ismeretek alapján az oligoszacharidokat biológiailag aktív anyagoknak tekintik. Étrend kiegészítőként serkenthetik a probiotikus baktériumok szaporodását (Cuortois 2009). Az *Arthrospira platensis*-ből izolált poliszacharid, a kalcium-spirulán (Ca-SP) hatásos az AIDS és a herpesz ellen (Hayashi et al. 1996). A magas sótartalmú tápoldatban jól szaporodó *Porphyridium cruentum* akár 0,4 g L⁻¹ poliszacharidot is képes termelni, ami 1-2%-ban vizes oldathoz/szuszipenzióhoz adagolva nagy viszkozitást biztosít (Thepenier & Gudín 1985). A gyorsan szaporodó talajalgák poliszacharidjai fontos talajmegkötő és nedvességtároló hatásuk mellett a foszfát és mikroelemek hozzáférhetővé tételével, továbbá a nitrogén tárolásával és lassú felszabadításával járulnak hozzá a talajok biotrágyázásához (Painter 1993). Az évenkénti talajoltás a talajkondicionáló *Chlamydomonas mexicana* zöldalgával gyengén, de nem jelentősen növelte a talajok szénhidrát tartalmát az USA-ban (Metting & Rayburn 1983). A *P. cruentum* egysejtű vörösmoszat mellett a cianobaktériumok termelnek sokféle poliszacharidot. Piacra azonban mégsem találtak, mert olcsóbb alternatívát jelentenek a tengeri makroalgák (Borowitzka 2013).

Az ötvenes évek „egysejt” fehérje korszakában termelt mikroalgákkal sikeres takarmányozási kísérletek folytak, de a magas költségek miatt nem váltak gyakorlattá. Az utóbbi évtizedben a mikroalgából kinyert lipidek után maradt és kihasználatlan biomasszára hivatkozva ismét megkezdődtek a takarmányozási kísérletek (Christaki et al. 2010, Kang et al. 2013, Kotrbacek et al. 2013, Panjaitan et al. 2010, Rincon et al. 2012, Saeid et al. 2013). A monogasztrikus állatok etetését egysejtű eukariótákkal, a vastag cellulóz sejtfalon kívül

korlátozza az, hogy a mikroalgákban a nyers fehérje nitrogénjének 10%-át is kiteheti a nem-fehérje nitrogén (nukleinsavak, aminosavak, glükózaminok, stb.). A nem-fehérje nitrogénből pedig csupán a bendőflóra képes fehérjét szintetizálni. A kékzöldknél további előnyt jelentenek a szoba jöhető *Chlorella* és *Arthrospira* fajok egészségvédő anyagai (Lum et al. 2013). Jóllehet az Európai Unió is keres új fehérjeforrásokat a HORIZON 2020 pályázatok keretében, de a mikroalga „maradék biomassza” gyakorlati hasznosítására még várni kell, mert még nincs tényleges bioüzemanyag termelés mikroalgákkal.

Nitrogénkötő cianobaktériumok

A cianobaktériumok a rizsföldek állandó lakói, de a legkülönbözőbb talajok felszínén és felszín alatti talajrétegében is megtalálhatók. Előfordulásukat a fényen kívül a talajok nedvességtartalma, pH-értéke, tápanyagai és nitrogéntartalma befolyásolja (Granhall 1975). Kiszáradással és vízstresszel szembeni tűrőképességük jelentős és jól megélik a magas sótartalmú környezetben is. Gyakori előfordulásuk a trópusi talajokban az eukarióta algáknál több fokkal magasabb hőoptimumukkal magyarázható (Castenholz & Waterbury 1989). Számos cianobaktérium faj túléli az erős UV sugárzást, viszont 6 alatti pH-értéken nem fordulnak elő (Whitton 2000).

A cianobaktériumok légköri nitrogénkötő képességéről már a XIX. század végén voltak ismereteink, de ennek igazolására csupán 1928-ban került sor (Drewes 1928). Alig egy évtizeddel később De felismerte a nitrogénkötő cianobaktériumok jelentőségét a rizsföldek termékenységének a megőrzésében (De 1939). A rizsnövény akkor tudja hasznosítani a megkötött nitrogént, ha a cianobaktérium azt ammónium-ion alakjában kibocsátja a környezetébe, vagy elpusztul és így szabadul ki belőle az ammónium-ion. Ha ilyen tulajdonsággal rendelkező helyi cianobaktériumot nem lehet találni és idegen helyről származó fajjal oltják a rizsföldet, akkor kérdés, hogy az képes lesz-e életben maradni a helyi cianobaktériumok között (Thomas et al. 1991).

A nitrogénkötésért felelős nitrogénáz enzim működése ammóniával elnyomható. Az enzim oxigénre érzékeny, ezért a fonális cianobaktériumokban egy speciális sejtben, a II. fotokémiai rendszert nem tartalmazó, oxigénben szegény heterocitában található és működik. A nitrogénkötés számos egyéb tényezőtől függ, pl. a növényállomány sűrűségétől, a nitrogénkötő cianobaktérium fajtól, a klimatikus viszonyoktól és a felső talajréteg minőségétől (Gaydon et al. 2012, Kimura 2005, Pampolino et al. 2008, Roger & Reynaud 1979, Roger & Kulasoorya 1980, Roger & Ladha 1992). Ezzel magyarázható, hogy a nitrogénkötés, szélsőséges értékek között változik, de egy vegetációs időszakban nem haladja meg a 20-30 kg nitrogént hektáronként (Goyal 1996, Roger & Ladha 1992, Roger 1995).

A rizsföldek cianobaktériumokkal történő oltása, az algalizálás Japánban kezdődött 1951-ben, de gyorsan abbamaradt a nitrogénkötés csekély mértéke miatt (Watanabe et al. 1951). Az eljárást ma Indiában és kisebb mértékben Burmában, Egyiptomban és Kínában alkalmazzák. Az algalizálás ott a leginkább sikeres, ahol helyi fajokból állítják elő az oltóanyagot (Whitton 2000). Ez történik Indiában, ahol helyben izolált és több fajból álló oltóanyagot állítanak elő. A kiválasztott cianobaktériumokat tálcákon, vagy kisebb medencékben szaporítják talaj és szuperfoszfát, esetleg mészhozzáadásával. A tenyészetet 1-3

hétig inkubálják, majd hagyják kiszáradni. A kiszáradt keverékből 10 kilogrammot juttatnak ki egy hektár rizsföldre. Az eljárás széleskörű elterjedését korlátozza: (1) a terméshozadék bizonytalansága; (2) az oltóanyag előállítás nehézségei, beleértve a legalkalmasabb helyi törzsek kiválasztását; és (3) a rizs gyomirtására használt gyomirtószeresek kedvezőtlen hatása a kijuttatott cianobaktériumokra (Roger 1995). Az oltóanyag újabban nem csupán több cianobaktérium fajt tartalmaz, hanem szabadon élő nitrogénkötő baktériumokat (*Azotobacter*) és mikorrhiza gombákat is, amelyek növelik az oltóanyag kedvező ökológiai hatását, tápanyagokkal látják el a növényt és javítják a talajszerkezetet (Nain et al. 2010, Saadatnia & Riahi 2009). A talajok mikroszervezetei egymásra serkentő és gátló hatást gyakorolnak, ami a fenntartható mezőgazdaság számára új lehetőségeket teremt (Parker & Bold 1961, Singh et al. 2011). Különös jelentősége van például a talajból fertőző növénypatogének ellen ható cianobaktériumoknak (Kajiyama et al. 1998, Soltani et al. 2005).

A cianobaktériumokkal történő talajoltás kedvező hatását más növényekre is közölték, úgymint árpa, zab, paradicsom, retek, gyapot, cukornád, kukorica és saláta (Thajuddin & Subramanian 2005). Indiában a talajoltás kedvező hatását egyebek között búzára megfigyelték (Karthikeyan et al. 2007, 2009). A talajoltás nitrogénkötő *Nostoc entophyllum* és nem nitrogénkötő *Oscillatoria angustissima* cianobaktériummal növelte a borsó csírázási százalékát és serkentett néhány növekedési paramétert, valamint a fotoszintetikus színanyagok mennyiségét. A biotrágyának szánt két alga hatását növelte, ha a szokásos műtrágya adag felét is kijuttatták a talajba a két cianobaktériummal együtt. A műtrágya gátolta a nitrogénkötést, ezért a pozitív hatás más tényezőkkel volt magyarázható. A mérések a *N. entophyllum* törzsből több exopoliszacharidot, auxint és citokinint, míg az *O. angustissima* törzsből több gibberellint mutattak ki, ami magyarázat lehet a borsó növényre gyakorolt hatásra (Osman et al. 2010). A nitrogénkötő cianobaktériumokból kimutatható növényi hormonok azt sugallják, hogy a nitrogénkötés mellett ezek is hozzájárulnak a növényekre gyakorolt kedvező hatás kialakításához (Hashtroudi et al. 2013, Misra & Kaushik 1989).

A mikroalgák növényi hormontermelését és növénykezelésekre való alkalmasságát, valamint antimikrobiális anyagait és illékony szerves anyagaikat, továbbá potenciális növényvédelmi használhatóságukat az értekezés következő fejezeteiben tárgyalom.

2.1.5. Célkitűzések

A fejezet célkitűzéseit a bevezetőben megfogalmazottaknál részletesebben az alábbiakban foglalom össze:

- Európai szinten is jelentős számú törzsből álló unikális, egyedi mikroalga gyűjtemény létrehozása, amely az alábbiakkal jellemezhető törzsekből áll:
 - Brazíliában a talajok felszínén színes foltként látható talajvirágzásból származnak, a természetben jól szaporodnak,
 - Magyarországon művelt és műveletlen területek talajmintáiból izolált törzsek,
 - laboratóriumi körülmények között, ezért feltehetően tömegtermesztés során is jól szaporodnak,

- törzsek molekuláris biológiai módszerekkel támogatott taxonómiai meghatározása,
- a gyűjtemény mikroalga törzseinek felhasználása hazai és nemzetközi kutatási és fejlesztési együttműködésekre.

2.2. Anyag és módszer

2.2.1. Talajminta gyűjtés

Brazília

A talajvirágzásokból származó mintákat Brazília több államában: Rio de Janeiro, Sao Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso és Goiás államokban gyűjtöttem. A mintavételeket 1986 és 1990 közötti tartós kiküldetésem idején a felsorolt államokban különböző időpontokban végeztem. A minták többségét – mintegy 220 mintát – Rio de Janeiro – Sao Paulo – Foz do Iguaco – Campo Grande – Cuiabá – Brasília – Rio de Janeiro útvonal mentén 1985. márciusban gyűjtöttem művelt, de leginkább műveletlen területeken, parkokban, halgazdaságok területén, erdők szélén, utak mentén stb. A talaj felszínén látható színes mikroalga foltokat kerestem. A foltok mérete néhány négyzetcentimétertől a fél négyzetméterig terjedt (**2.2. ábra**). A változó nedvességtartalmú, összesen 260 mintát 10 cm³-es steril centrifuga csövekbe gyűjtöttem. A száraz vagy lassan kiszáradt mintákat az izolálás megkezdéséig hűvös és sötét helyen tároltam.



2.2. ábra: Cianobaktérium talajvirágzás Rio de Janeiro közelében cukornád ültetvényben és annak szélén.

Magyarország

A Növénybiológiai Intézet PhD-hallgatója, Máté Ferenc professzor és az én témavezetésemmel a Balaton-felvidéki Nemzeti Parkban három talajtípuson, összesen 24 talajmintát gyűjtött (Lepossa, 2003). Művelt és műveletlen területeken a felszíni 1 cm-es rétegből steril spatulával, az 1-10 cm-es rétegből pedig 3,6 × 10 cm méretű alumínium hengerrel nejlonzacskókba gyűjtött

mintákat. A levegőt is tartalmazó zacskókat lezárva és hűvös sötét helyen tárolta a vizsgálatokig, ill. a mikroalgák izolálásáig.

Szerbia

A talajmintákat Zorica Svircev a Novi Sad-i Egyetem Biológia Intézetének tanára és hallgatói gyűjtötték cianobaktériumok izolálására. Az izolált törzsekből összesen 106-ot kaptunk 1996-ban az MACC-ben való fenntartásra. A törzsek mintegy fele zöldalgákkal volt fertőzött, ezért további tisztítást igényelt.

2.2.2. Mikroalgák izolálása és fenntartása

Izolálás

A brazil talajminták dúsító tenyészetéhez 4 tápoldatot választottunk: Bristol (Bold 1949), BG-11 (Rippka et al. 1979), Tamiya (Kuznetsov & Vladimirova 1964) és Zehnder-8 (Staub 1961) (**melléklet M2.1. táblázat**). Borsónyi mennyiségű talajmintát tettünk 25 cm³-es üvegfialákban lévő 10 cm³ steril tápoldatba. A fialákat alumínium fóliával lefedve 25°C-on 80 µmol foton m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson 10-14 napig tartottuk. A felsorolt tápoldatokból agarral szilárdított (1,5%) táptalajt készítettünk és töltöttünk Petri-csészékbe. A dúsító tenyészetből a mikroalga szuszpenziót 10⁵ – 10⁷-szeresére hígítottuk tápoldattal. A hígított szuszpenziót a Petri csészében lévő szilárd táptalaj felszínén szélesztettük. Az egyes mikroalga sejtekből/sejtfonalakból kifejlődött telepeket oltókacccsal ferde agarra oltottuk át. Az így létrejött, elméletileg klóntenyészetet tápoldatba oltottuk, majd egy hét elteltével mikroszkópban vizsgáltuk. A baktériummentesség ellenőrzésére szerves agart használtunk. A tápoldatokat 1% peptonnal, élesztőkivonattal, glükózzal kiegészítettük és agarral szilárdítottuk. A Petri csészékben lévő szerves agar felszínére szélesztettük a ferde agarról származó mikroalgát. Ha egyhetes inkubáció után sem alakult ki baktérium telep az agar felszínén, akkor a tenyészetet baktériummentesnek tekintettük. Cianobaktériumoknál nem próbálkoztunk axénikus tenyészetek előállításával.

A magyar talajmintáknál az eukarióta algák izolálása a fenti módszerrel történt. A cianobaktériumok izolálásához Petri csészébe töltött N-mentes BG-11 táptalaj felszínére 3-4 nedvesített kisebb talajszemese került. Az MACC törzsek laboratóriumi tenyésztési körülményei között 1-2 hétig inkubált Petri csészében a cianobaktérium fonalak kinőttek az agar felszínén. Ezeknek a cianobaktériumoknak az átoltásával és további szélesztéses tisztításával készültek a cianobaktérium törzstenyészetek (Lepossa 2003).

Fenntartás

A törzstenyészeteket az izoláláshoz használt tápoldatban vagy leginkább agarral szilárdított tápoldatban tartjuk fenn. A tápközegből 70 cm³-t töltünk 100 cm³-es Erlenmeyer lombikba, amit alumínium fóliával lefedve autoklávban sterilizálunk. A gézzel körütekert vattadugókat alufóliába tekerve hőlégmentesítjük. A tápoldatot oltókacsnyi mikroalgával beoltjuk, vagy az agar felszínét három helyen megsűrjük az algalagymok tartalmazó oltókacccsal, majd

vattadugóval lezárjuk. Az így elkészült friss törzstenyészetek vattadugóját zsírpapírral lefedjük, amit gumikarikával rögzítünk. A tenyészeteket a laboratóriumi tenyésztés körülményei között mintegy 10 napig inkubáljuk, majd törzstenyésztő szobában tartjuk fenn. A törzstenyésztő szoba hőmérséklete 15 ± 2 °C, a megvilágítás napi 12 óra, a fényintenzitás $25\text{--}50 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**2.3. ábra**). Táptalajon a tenyészetek ilyen körülmények között egy évig fenntarthatók, de a tápoldatos törzstenyészeteket 3-4 havonta át kell oltani. A törzstenyészetek állapotát legalább hetente kétszer ellenőrizzük és szokatlan kinézet, szín esetén vizsgáljuk, tisztítjuk, vagy áoltjuk.



2.3. ábra: Törzstenyészetek fenntartása agarral szilárdított táptalajon a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményben.

2.2.3. Taxonómiai meghatározás mikroszkópos és molekuláris biológiai módszerekkel

Az izolált mikroalga törzsek morfológiai alapon történő, mikroszkópos taxonómiai meghatározásában Vörös Lajos (Magyar Tudományos Akadémia, Ökológiai Kutatóközpont, Balatoni Limnológiai Intézet, Tihany) van segítségünkre. A mikroalgák rendszertanának nincs általánosan elfogadott változata, ezért az MACC törzseinek a rendszertani besorolásánál az interneten megtalálható és állandóan frissített AlgaeBase (www.algaebase.org) adatbázist használtuk. A taxonómiai munka kiegészítését molekuláris biológiai módszerekkel három PhD-hallgatónk: Horváth Nándor és Katona Szabina Mosonmagyaróváron, Makra Nóra pedig Martonvásáron végzi, akik egy TÁMOP projekt (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0003: „Mikroalga biotechnológia a fenntartható mezőgazdaságban”) keretében és pénzügyi

támogatásával dolgoznak. A munkához szükséges szekvenálásban Maróti Gergely (Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet, Szeged) segíti munkájukat.

Cianobaktériumok azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel

A riboszómális RNS kis alegységét (16S rRNS) kódoló gének szekvencia vizsgálata a legmegbízhatóbb eljárás a cianobaktériumok filogenetikai osztályozására (Wilmotte 1994). A 16S rRNS szekvenciák összehasonlító analízise további, új vizsgálati eszközt biztosít egy faj gyűjteményben fenntartott és természetes közösségben élő egyedei közti különbség kimutatására (Weller et al. 1991). Ez a génszekvencia független a tenyésztési vagy a növekedési körülményektől és már kis mennyiségű laboratóriumi vagy természetes környezetből származó mintából kivont DNS is elegendő a PCR alapú vizsgálathoz.

A primer tervezés a publikus adatbázisokban: Ribosomal Database Project (Maidak et al. 1997) és GenBank (Benson et al. 1997) fellelhető összes cianobaktérium 16S rRNS szekvencia illesztésén alapul. A primerszekvenciák és a 16S rRNS gén célszakaszainak pozíciói a **2.3. táblázatban** szerepelnek. A CYA106F és CYA359F forward primerek közül tetszőlegesen választhatunk, míg a továbbiakban CYA781R elnevezéssel jelölt reverz primer nem más, mint a CYA781R(a) és CYA781R(b) oligonukleotidok ekvimoláris keveréke.

2.3. táblázat: A primerek^a szekvenciái (59-től 39-ig) és a gének célpozíciói^b

CYA106F ^c	CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A 106–127
CYA359F ^c	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG ^d 359–378
CYA781R(a) ^e	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T 781–805
CYA781R(b) ^e	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T 781–805

^a Az R (reverz) és F (forward) elnevezések a primernek az rRNS szekvenciát kódoló komplementer DNS szálhoz viszonyított orientációjára utal. Egy 40 nukleotid hosszú GC-gazdag szekvencia (59-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCG GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-39) kapcsolódik a forward primer 59-es végéhez.

^b Az *E. coli* 16S rRNS nukleotid sorrendje alapján.

^c A CYA106F és CYA359F bármelyike használható forward primerként egy reakcióban.

^d Y a C/T degenerált nukleotid használatot jelöli.

^e A CYA781R elnevezésű reverz primer a CYA781R(a) és CYA781R(b) oligonukleotidok ekvimoláris keveréke.

Zöldalgák molekuláris taxonómiai azonosítása

A 16S/18S rRNS alapú molekuláris módszereket évtizedek óta használják taxonómiai jellemzésekhez. A 16S/18S rRNS alapú PCR azonosításhoz tisztított teljes (genomiális + kloroplasztisz) eukarióta alga DNS-t alkalmazunk. A felszorzozáshoz univerzális primereket használunk (f27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' és r1492 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3' a kloroplasztisz 16S rRNS-hez; UNI7F 5' -ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3' és UNI1534R 5'-TGATCCTTCYGCAGGTTTCAC-3' a genomiális 18S rRNS-hez). A PCR termékeket agaróz gélből visszaizoláljuk és az így

felsokszorozott 16S/18S rRNS fragmentumok pontos szekvenciáját kapilláris Sanger szekvenálással meghatározzuk. BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) alapú homológiák keresésével azonosítjuk a 16S/18S rRNS szekvenciák eredetét (Altschul et al. 1990, Suutari et al. 2010).

2.2.4. Az MACC törzsek laboratóriumi tenyésztése

Egyszeri algatenyésztés

A törzseket mikroalga tenyésztő laboratóriumban, ellenőrzött körülmények között, a korábban leírt tenyésztő berendezésben szaporítottuk (Ördög 1982). A helyiség hőmérsékletét klímaberendezéssel $25 \pm 2^\circ\text{C}$ -on tartottuk. A napi megvilágítást 14 órára állítottuk be, a látható fény intenzitást pedig a tenyészetek szintjén $130 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ értékre. Az 500 cm^3 -es lombikokban lévő 250 cm^3 tenyészeteket óránként 20 L levegővel buborékolattuk át a mikroalga sejtek lebegésben tartásához. A kiülepedés megakadályozására a tenyészeteket naponta kétszer manuálisan is felkevertük. A levegőt a megvilágítás idején palackról adagolva 1,5% széndioxiddal dúsítottuk. A buborékolatásra használt levegőt párával dúsítottuk és steril egyedi vattaszűrőn át juttattuk be a tenyészetekbe (2.4. ábra).



2.4. ábra: Mikroalga tenyésztő laboratórium az MACC törzsek szaporítására.

A mindig 10 mg L^{-1} mikroalga koncentrációval indított tenyészeteket a kísérleti célnak megfelelően Tamiya, Bristol, Zehnder vagy BG-11 tápoldatban (**melléklet M2.1. táblázat**) 4-14 napig inkubáltuk, majd mértük szárazanyag tartalmukat, szükség szerint számoltuk sejtszámukat és mértük sejtméretüket. A szárazanyag méréshez 5 cm átmérőjű Whatman GF/C

üvegrost szűrőlapon 10-50 cm³ algaszuszpenziót szűrtünk át. A szűrőlapot a szűrés előtt és után 105 °C-on 2 órán át szárítottuk, lehűtöttük és mértük a tömegét. A mért tömegek különbségéből és a szűrt szuszpenzió térfogatából számítottuk a szuszpenzió sűrűségét mg szárazanyag/liter értékben. A sejtszámot és a sejt méretet Bürker kamrában OLYMPUS BX60 mikroszkóppal és Olympus Stream[©] szoftverrel (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) határoztuk meg.

Szinkrontenyésztés

Chlorella tenyészetek szinkronizálását a megvilágítás hosszának a szabályozásával és a tenyészet hígításával értük el. A törzstenyészetet az egyszeri algatenyésztési eljáráshoz hasonlóan 250 cm³ Tamiya tápoldatba oltottuk 10 mg L⁻¹ induló szárazanyag tartalommal. Egyhetes szaporítást követően a tenyészetet továbboltottuk ismét 10 mg L⁻¹ induló szárazanyag tartalommal. A következő napon reggel a tenyészetet tízszeresére hígítottuk, amit a rákövetkező napon reggel megismételtünk. Az utóbbi tenyészet estére csupán nagy sejtekből álló szinkrontenyészet lett. Az esti tenyészetrel, egy sötét szakasszal kezdtük a 48-órás szinkronizációs kísérleteket. A mintázást a kísérletek céljának megfelelően néhány óránként végeztük. Mértük a sejtek méret-eloszlását és sejtszámát, továbbá mintát gyűjtöttünk az egyéb vizsgálatokhoz.

2.2.5. Minta előkészítés vizsgálatokhoz és kísérletekhez

A mikroalgák növényi hormontartalmának analitikai vizsgálatához a tenyészetekből kétszer 80 cm³ mintát -80 °C-on fagyasztottunk a vizsgálatok megkezdéséig. A biotesztekhez és a szaganyagok vizsgálatához a mintákat fagyasztva szárítottuk. A kísérletek céljának megfelelően a különböző korú tenyészeteket mindig ugyanabban az időben, 14 és 15 óra között leszedtük a tenyésztő berendezésről. Több lombikban lévő tenyészetet összeöntöttünk és a mikroalga szuszpenziót 15 percig centrifugáltuk (Sigma 6K15, Germany). A felülúszót kiöntöttük, a kiülepedett mikroalga biomasszát pedig Petri csészébe tettük és liofilizáltuk (Christ Gamma 1-20, Germany) 22 órán át 25±2 °C-on, 0,035 mbar nyomáson. A fagyasztva szárított mintát zárt műanyag edényben -20 °C-on tároltuk. A bioteszt vizsgálatok előtt a fagyasztva szárított mintákból desztillált vízzel 10 g L⁻¹ koncentrációjú szuszpenziót készítettünk, amit ultrahangos sejtroncsolóval (VirSonic 600, USA) kezeltünk 2 percig. Az antimikrobiális hatás vizsgálatához a 10 g L⁻¹-es szuszpenziót használtuk, a növényi hormonhatás tesztelésére a szuszpenziót 2 g L⁻¹-re hígítottuk. A biotesztekhez mindig frissen készített mikroalga szuszpenziót használtunk fel.

2.3. Eredmények és megvitatásuk

2.3.1. Előzetes molekuláris taxonómiai eredmények

Molekuláris biológiai módszerek alkalmazását egy TÁMOP projekt pénzügyi támogatásának köszönhetően 2013-ban kezdhettük meg. Az új módszerek alkalmazásától a mikroalga biotechnológiában három területen várunk eredményt:

1. az MACC törzseinek pontos taxonómiai meghatározása a hagyományos morfológiai alapon történő meghatározás kiegészítésére,
2. az MACC törzseinek a filogenetikai fái alapján a növénypatogénekre hatásos törzsekhez közel álló törzsek kiválasztása annak reményében, hogy szintén hatásosak lesznek,
3. értékes anyagokat termelő mikroalga törzsek kiválasztása az értékes anyag termeléséhez szükséges enzim(ek) termeléséért felelős gének jelenlétének a molekuláris biológiai módszerrel történi kimutatásával.

A hosszabb távra tervezett konzorciumi kutatásból az első pontban megfogalmazott taxonómiai munkára vonatkozó első eredmények már rendelkezésre állnak. Az MACC 40-40 *Anabaena*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* és *Scenedesmus* törzsének molekuláris biológiai vizsgálata a hagyományos taxonómia kiegészítésére folyamatban van. Az eredmények részletes bemutatására nem térek ki, hiszen az elsősorban a PhD-hallgatók és témavezetőik eredménye. Mindazonáltal az nyilvánvaló, hogy a *Chlorella* és a morfológiailag hasonló gömb-vagy ovális alakú törzsek elkülönítése, azonosítása csupán molekuláris biológiai módszerekkel lehetséges. Az izolált eukarióta talajalgákra ez a forma különösen jellemző. Makra és Balázs (TÁMOP jelentés, 2014) *Nostoc* és *Anabaena* törzsekre vonatkozó eddigi eredményei úgy tűnik, hogy megerősítik a molekuláris biológiai módszerek szükségességét a törzsek taxonómiai azonosításában. A 16S rRNS alapú filogenetikai fa alapján megállapították, hogy:

1. a *Nostoc* törzsek közül az MACC-71 és az MACC-139 azonosnak tűnik,
MACC-71: Greifswald-i gyűjteményből származó törzs,
MACC-139: CCALA (Trebon)-ból származó törzs,
Következtetés: A két törzs minden bizonnyal egy fajhoz tartozik, de ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy minden tekintetben azonos, sőt szembevető morfológiai eltéréseket mutatnak.
2. a *Nostoc* törzsek közül az MACC-112 és az MACC-210 azonosnak tűnik,
MACC-112: University of Novi Sad, szerb talajalga,
MACC-210: University of Novi Sad, szerb talajalga,
Következtetés: A két törzs minden bizonnyal egy fajhoz tartozik, de annak ellenére, hogy földrajzilag azonos helyről lettek izolálva jelentős morfológiai különbségeket mutatnak.
3. öt törzsről majdnem bizonyosan állítható, hogy nem a *Nostoc* nemzetségbe tartozik,

Következtetés: A morfológiai alapú taxonómiai besorolás a tenyésztésbe vont algáknál nem elég megbízható, többek között azért, mert nem jelennek meg laboratóriumi körülmények között egyes nemzetségre/fajra jellemző bélyegek.

4. az *Anabaena* törzsek közül kettő, az MACC-57 és az MACC-797 azonosnak tűnik,
MACC-57: CCAP gyűjteményből származó törzs,
MACC-797: Kijev-i gyűjteményből származó törzs,
Következtetés: A két törzs minden bizonnyal egy fajhoz tartozik, morfológiailag is azonosnak tekinthető, ennek ellenére nem állítható biztosan, hogy élettani tekintetben nincsenek különbségek közöttük.
5. az *Anabaena* törzsek közül kettő, az MACC-174 és az MACC-260 azonosnak tűnik,
MACC-174: University of Novi Sad, szerb talajalga,
MACC-260: University of Novi Sad, szerb talajalga,
Következtetés: A két törzs minden bizonnyal egy fajhoz tartozik, de annak ellenére, hogy földrajzilag azonos helyről lettek izolálva jelentős morfológiai különbségeket mutatnak.
6. azonosnak tűnik még több *Anabaena* törzs: MACC-121, MACC-124, MACC-136 és MACC-238,
MACC-121: CCAP gyűjteményből származó törzs,
MACC-124: Székesfehérvári halastó üledékéből izolált törzs,
MACC-136: Székesfehérvári halastó üledékéből izolált törzs,
MACC-238: IPPAS-Moszkva gyűjteményből származó törzs,
Következtetés: A törzsek minden bizonnyal egy fajhoz tartoznak, de jelentős morfológiai különbségeket mutatnak, ami minden bizonnyal összefügg azzal, hogy földrajzilag nagyon távol eső populációkból lettek izolálva.

További génszekvenciák meghatározása folyamatban van, ami módosíthatja a taxonómiai besorolásra vonatkozó molekuláris biológiai megállapításokat. Ezzel párhuzamosan azonban további morfológiai elemzésekre is szükség van. Siba P. Adhikary algológia professzor (India) tapasztalata szerint a molekuláris biológiai adatokat feltétlenül célszerű összevetni a morfológiai alapon történő meghatározással a végső rendszertani besorolásra vonatkozó döntés előtt („polyphasic approach”). Többek között azért is, mert a molekuláris biológiai adatbázisokban sajnos előfordulnak tévedések/hibák és a végeredményt erősen eltorzító módszertani eltérések (Felföldi et al. 2011).

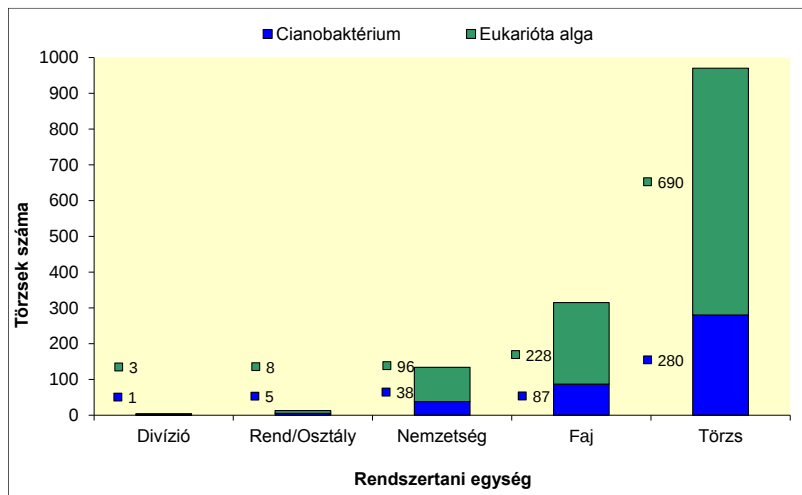
2.3.2. Az MACC törzsek rendszertani helye és produktivitásának jellemzői

Rendszertani megoszlás

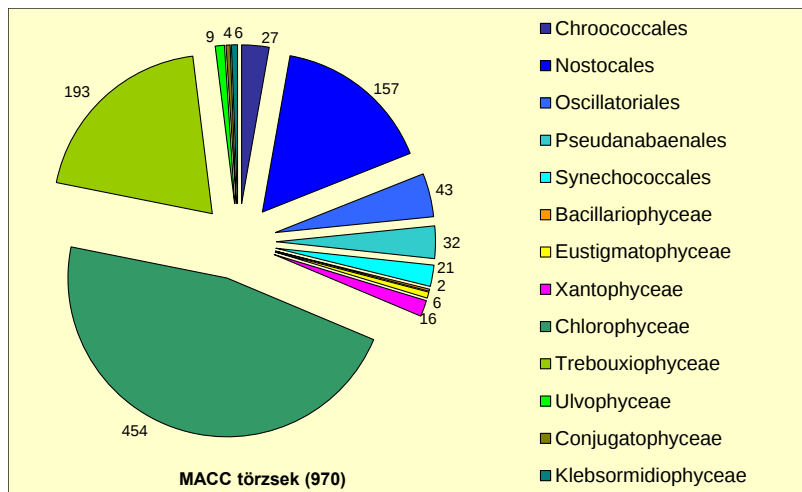
Az MACC-ben 505 saját izolálású és 465 más gyűjteményekből beszerzett mikroalga törzset tartunk fenn. A beszerzett törzsek két fő forrásból származnak: (1) CCALA – Trebon 48 talajalga és 171 édesvízi mikroalga; (2) University of Novi Sad 88 talajalga és 18 édesvízi mikroalga. A fennmaradó 140 törzset orosz, ukrán, francia, német és angol gyűjteményekből szereztük be. Az MACC édesvízből (382) és talajból (588) izolált összesen 970 mikroalga törzset tartalmaz, amelyek 134 nemzetséghez és 315 fajhoz tartoznak (**2.5. ábra**). A gyűjteményre jellemzőek a talajalgák, amelyek aránya 60%. Az összes törzs és faj közel harmada (28-29%) cianobaktérium a többi eukarióta alga. Az 500 törzsnél nagyobb európai gyűjteményekben a cianobaktériumok aránya 23% (**2.1. táblázat**), az Európán kívüliekben pedig csupán 15% (**2.2. táblázat**). Az MACC-ben fajonként átlagos három törzset tartunk fenn, a SAG-ban kettőt (Day et al. 2004), az ACOI-ban pedig négyet (Santos & Santos 2004). Az MACC létrehozásakor jól szaporodó törzsek izolálására és nem a nagy fajgazdagságra törekedtünk, aminek látható következményei is vannak. A gyűjtemény törzseinek a 83%-a mindössze 3 nagy rendszertani csoportba tartozik (**2.6. ábra**). A cianobaktériumok közül a Nostocales rendbe tartozó törzsek, míg a zöldalgáknál a Chlorophyceae és Trebouxioophyceae osztályba tartozó törzsek dominálnak. A gyűjtemény törzseinek közel fele (47%) a Chlorophyceae osztályba tartozik.

A **2.7. ábra** azokat a nemzetségeket mutatja be, amelyek a cianobaktérium törzsek 90%-át adják. Az ábra szerint az *Anabaena* (82) és a *Nostoc* (57) törzsek teszik ki a cianobaktérium törzsek felét, ami jelentős hozzájárulás az európai gyűjteményekhez, amelyekben az MACC törzseken kívül összesen 111 *Anabaena* és 232 *Nostoc* törzs található (**2.8. ábra**). A cianobaktériumok jelentős része szárazföldi ökoszisztémákban él. Metting (1981) a cianobaktériumok 38 nemzetségét találta talajlakónak, sőt a cianobaktériumok gyakran a talaj uralkodó mikroalgái (Zimmerman 1992).

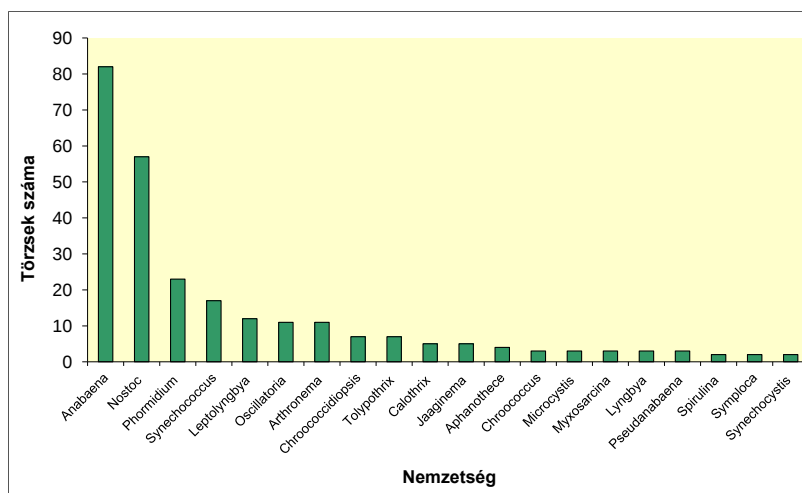
Mindemellett a cianobaktériumok a tápanyagban dús vízi ökoszisztémákban, pl. halastavakban szag- és ízrontó anyagaikkal jelentős károkat okoznak. Az *Anabaena* és a *Nostoc* fajok képesek légköri nitrogénkötésre. Heterocitás alakjaiknak a megjelenése és dominanciája egy adott ökoszisztémában nitrogénhiányos állapotot jelez. Az *Anabaena* és *Nostoc* egyes fajai toxintermelők, de antimikrobiális anyagaikkal is befolyásolják környezetüket (Prasanna et al. 2010, Skulberg 2000, Tantawy 2011). Gerwick et al. (2008) megállapították, hogy másodlagos anyagcsere termékeket elsősorban az Oscillatoriales (49%), a Nostocales (26%) és a Chroococcales (16%) rendbe tartozó fajokból, törzsekből izoláltak. Az MACC-ben az Oscillatoriales (43), a Nostocales (157) és a Chroococcales (27) törzsek száma összesen 227, ami az összes cianobaktérium 81%-a. Az MACC a cianobaktériumokat tekintve hasznos forrása a biotechnológiai kutatásnak.



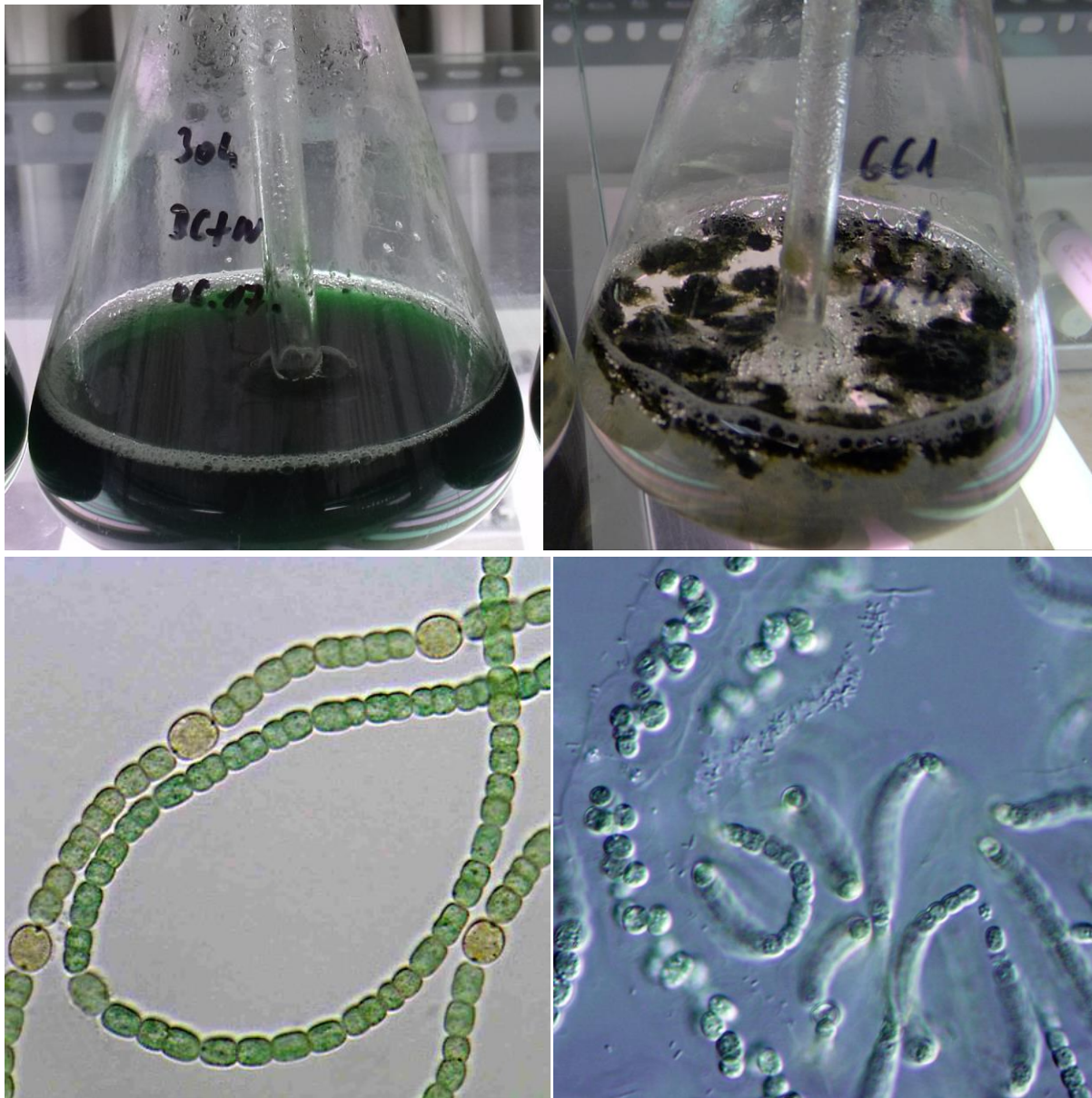
2.5. ábra: Az MACC összes törzsének rendszertani egységek szerinti megoszlása.



2.6. ábra: Az MACC cianobaktérium törzseinek rendek és eukarióta algatörzseinek osztályok szerinti megoszlása.



2.7. ábra: Az MACC összes cianobaktérium törzsének 90%-át adó nemzetségekben előforduló törzsek száma.

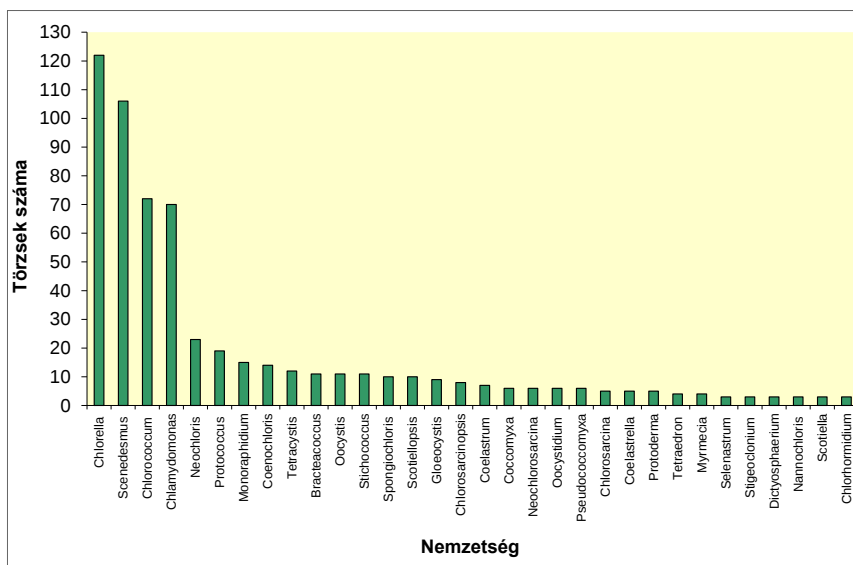


2.8. ábra: *Anabaena sphaerica* (MACC 304) mikroszkópi képe és tenyésztete (balra); *Nostoc* sp. (MACC 661) mikroszkópi képe és tenyésztete (jobbra).

A **2.9. ábra** az MACC összes Chlorophyta törzsének 90%-át kitevő nemzetségeket mutatja, amelyek közül a *Chlorella* (122), *Scenedesmus* (106), a *Chlorococcum* (72) és a *Chlamydomonas* (70) törzsek adják az összes Chlorophyta törzs felét (54%) (**2.10. ábra.**).

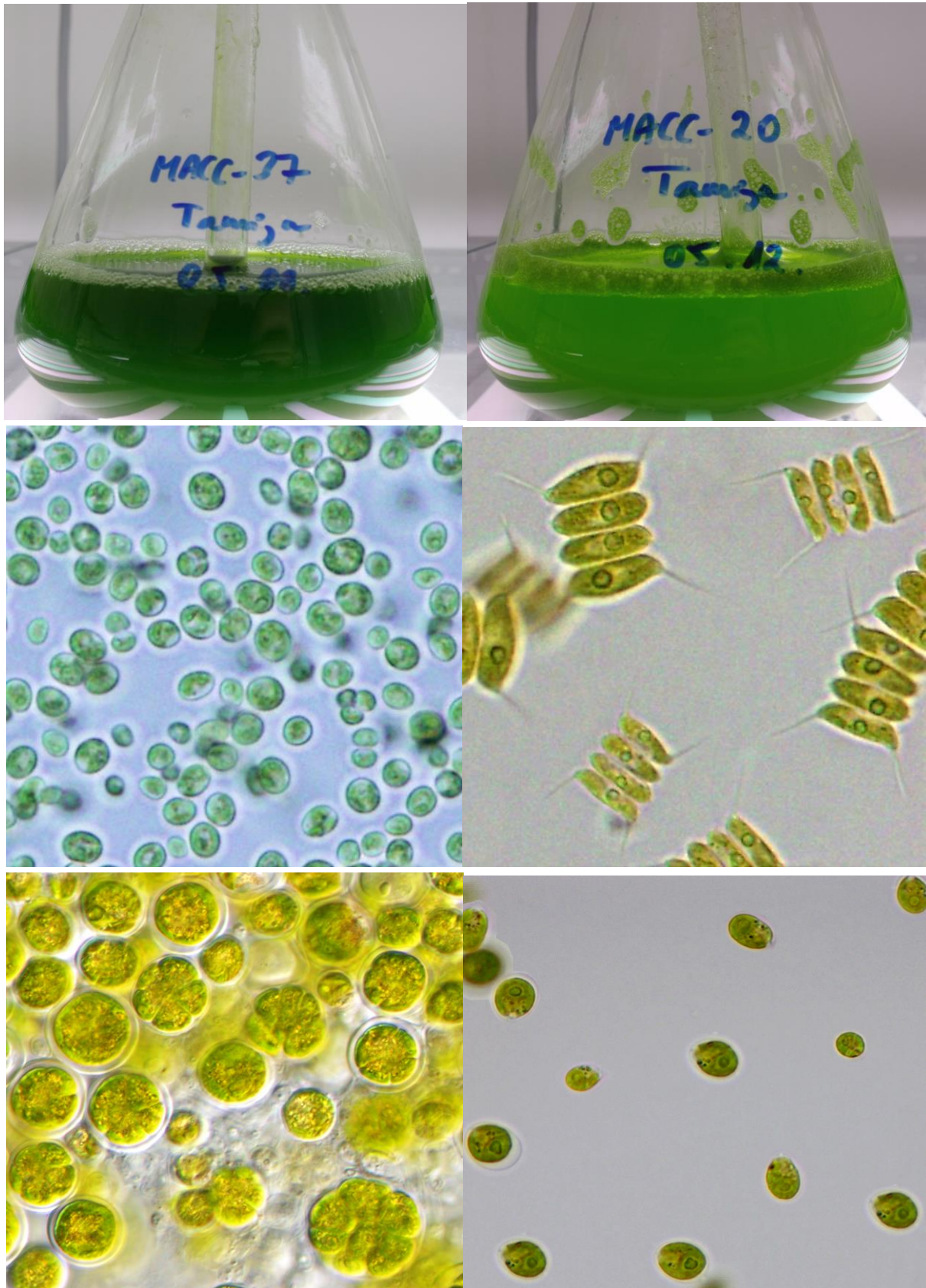
A legnagyobb gyűjtemények közül a 4 felsorolt nemzetség aránya a legnagyobb az ACOI, a CCAP, a SAG és a NIVA/CCA gyűjteményekben, de még ezekben is az összes törzsnek csupán alig több mint 5%-át teszik ki. Az MACC négy mikroalga divíziójából kettőben jelentéktelen számú törzs található: 24 Heterokontophyta és 10 Charophyta. Az MACC létrehozásával a cél jól szaporodó algák izolálása volt és ennek megfelelően választottuk ki az izolálási módszert, vagyis dúsító tenyészetek használatát az izolálás előtt. A dúsító

tenyészetekben jól szaporodó mikroalgákat izoláltuk, ezek pedig a fenti 4 nemzetséghez tartoztak.



2.9. ábra: Az MACC összes zöldalga törzsének 90%-át adó nemzetségekben előforduló törzsek száma.

Az egysejtű *Chlorella vulgaris* és *C.pyrenoidosa* a növényélettani kutatások „fehér egere” volt, tömegtermesztése pedig 1953-ban Bostonban kezdődött. Rendszertani besorolásuk csupán a morfológiai bélyegek alapján nem lehetséges (Iwamoto 2004). A *C.vulgaris* az egyetlen zöldalga, ami engedélyeztetés nélkül kereskedelmi forgalomban kapható és fogyasztható. Pozitív hatása az immunrendszert serkentő β -1,3-glükánra vezethető vissza, de van szabad gyök megkötő, a vérben pedig lipid-csökkentő hatása is. A *Scenedesmus* nemzetség fajtái 2, 4, 8, ritkán 16 sejtű cönobiumokat alkotnak, amelyek laboratóriumi tenyészetekben többnyire egy- vagy kétsejtűekké válnak. Rendszertanukat Hegewald (1978) és Komárek & Fott (1983) megváltoztatták, három nemzetségbe, *Scenedesmus*, *Acutodesmus* és *Desmodesmus* sorolták a fajokat. Mind a *Chlorella*, mind a korábban egységes *Scenedesmus* fajok értékesek a mikroalga biotechnológia számára. Tömegtermesztésük újabban a bioüzemanyag előállítás miatt is fontos. Nitrogénhiányos tápközegben ugyanis lipidtartalmuk a szokásos 10%-ról akár 50%-ra is nőhet (Ördög et al 2012, 2013). A *Chlamydomonas reinhardtii* növényélettani kutatások tárgya, a *Chlamydomonas* fajok pedig általában poliszacharid és hidrogén termelésük miatt érdemelnek figyelmet.

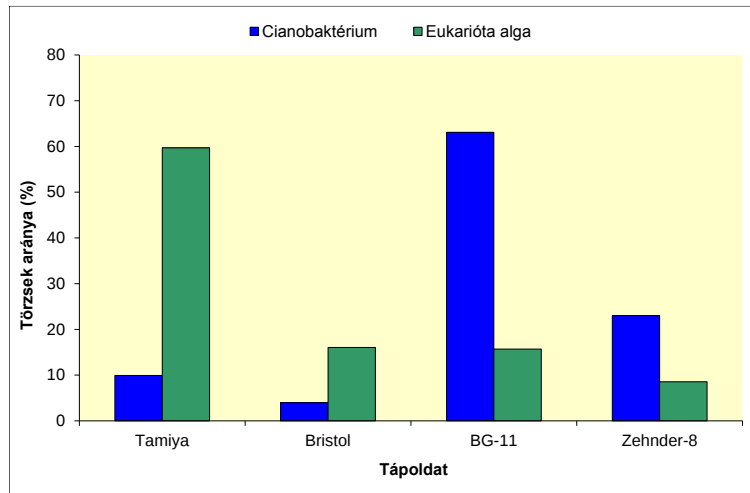


2.10. ábra: *Chlorella vulgaris* (MACC 37) tenyésztete (balra fent) és mikroszkópi képe (balra középen); *Scenedesmus quadricauda* (MACC 20) tenyésztete (jobbra fent) és mikroszkópi képe (jobbra középen); *Chlorococcum ellipsoideum* (MACC 33) (balra lent); és *Chlamydomonas debaryana* (MACC 53) (jobbra lent) mikroszkópi képe.

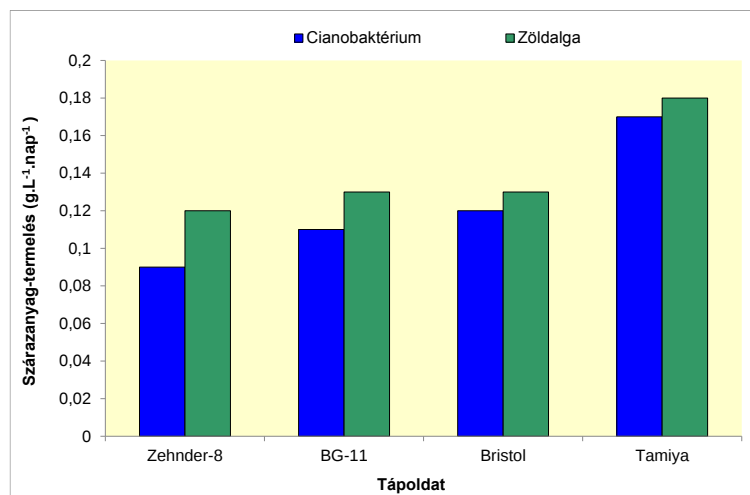
Szaporodás

Az MACC törzsek szaporodását a két évtizedes kutatás során négy tápoldatban mértük. A Zehnder-8 és a BG-11 nitrogéntartalmú vagy nitrogénmentes változata eredetileg is cianobaktériumok szaporítására készült, míg a Tamiya és a Bristol tápoldat zöldalgák tenyésztésére. Az előzetes várakozásoknak megfelelően az eukarióta algák 60%-a a Tamiya tápoldatban, a cianobaktériumoknak pedig kicsit több, mint 60%-a a BG-11 tápoldatban szaporodott a legjobban (**2.11. ábra**). A négy tápoldatban a cianobaktériumok napi biomassza termelése valamivel kisebb volt, mint az eukarióta algáké (**2.12. ábra**). Nagy különbség volt viszont a Tamiya és a másik három tápoldat között. A három tápoldatban szaporodó mikroalgák napi szárazanyag termelése 0,1 és 0,12 g L⁻¹ nap⁻¹ között változott. A Tamiya tápoldatban szaporodó mikroalgák jelentősen gyorsabban szaporodtak (0,17-0,18 g L⁻¹ nap⁻¹), ami feltehetően a másik három tápoldathoz viszonyított jóval nagyobb tápanyag koncentrációval magyarázható. Az eredményekből megállapítható, hogy a cianobaktériumok izolálása, laboratóriumi tenyésztése és tömegtermesztése BG-11 tápoldatban a legcélszerűbb, ami nitrogénmentes lehet nitrogénkötő cianobaktériumok esetén. Az eukarióta algáknál a Tamiya tápoldat használata javasolható.

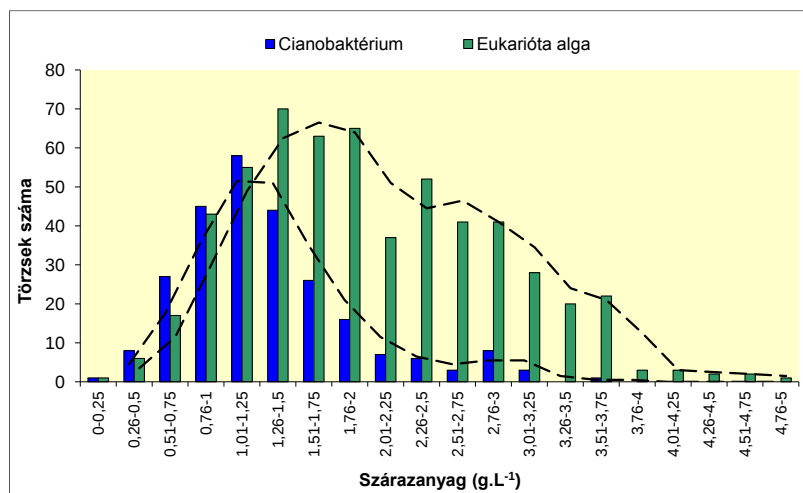
Az MACC törzsek számát a tenyészetekben a szaporodás stacioner szakaszában mérhető legnagyobb biomassza függvényében ábrázoltuk (**2.13. ábra**). Az eukarióta algák többsége legfeljebb 1 és 3 g L⁻¹ közötti szárazanyag koncentrációt volt képes elérni, míg a cianobaktériumoknál az érték lényegesen kisebb volt, 0,76 és 1,75 g L⁻¹ között változott. Tapasztalatunk szerint adott laboratóriumi körülmények között jól szaporodónak tekinthetők azok a cianobaktérium törzsek (30), amelyeknek 2 g L⁻¹ értéknél nagyobb a végső biomassza koncentrációja és azok az eukarióta algák (88), amelyeknek a koncentrációja a tenyésztés végén meghaladja a 3 g L⁻¹ értéket. Összesítve 67 jól szaporodó talajalga és 51 édesvízi alga található az MACC-ben. A kiemelkedően nagy biomasszát (4 g L⁻¹) termelő 10 eukarióta alga törzset a **2.4. táblázatban**, a kiemelkedően nagy napi termelésű törzset pedig a **2.5. táblázatban** foglaltam össze. A legsűrűbb szuszpenziót adó törzs a Charophyta, a további 9 törzs pedig a Chlorophyta divízióba tartozik. A 10 törzsből 8 brazil talajalga. A megtermelt biomassza mellett a napi szárazanyag termeléssel jellemezhetjük a törzsek szaporodását (**2.14. ábra**). A cianobaktériumok napi szárazanyag termelése 50-150 mg L⁻¹ nap⁻¹, míg az eukarióta algáké 100-200 mg L⁻¹ nap⁻¹. A talajalgák, ezen belül a brazil talajalgák nagy biomassza termelésükkel tűnnek ki a gyűjtemény törzsei közül. A cianobaktériumok eukarióta algákhoz viszonyított kisebb napi szárazanyag termelése várható volt és egyértelmű.



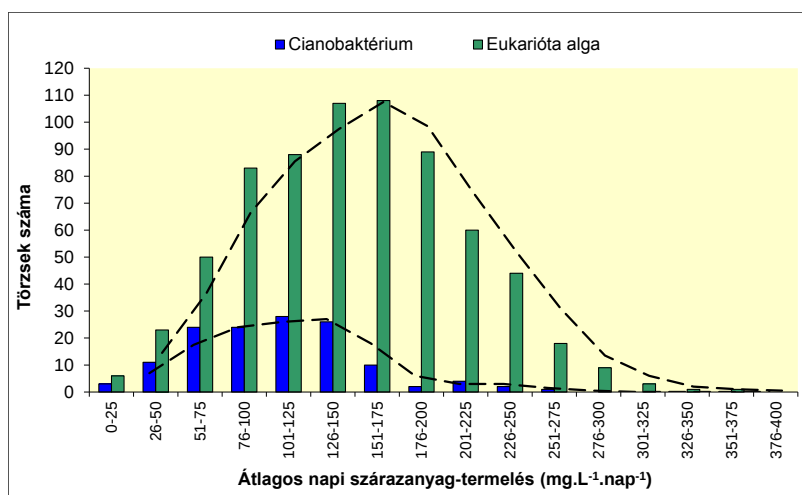
2.11. ábra: Négy kiválasztott táplódatban a legnagyobb biomasszát elért MACC törzsek aránya.



2.12. ábra: Az MACC cianobaktérium és zöldalga törzseinek az átlagos napi szárazanyag-termelése a négy kiválasztott táplódatban.



2.13. ábra: Az MACC legnagyobb biomasszát termelő törzseinek a száma a biomassza függvényében.



2.14. ábra: Az MACC törzseinek a megoszlása az átlagos napi szárazanyag-termelés függvényében.

2.4. táblázat: Az MACC 4 g L⁻¹ értéknél nagyobb biomassa termelésű törzsei.

Faj/nemzetség	Eredet	Kód	Szárazanyag (g L ⁻¹)
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Talaj, BRA	MACC-553	4,92
<i>Chlorella</i> sp.	Talaj, BRA	MACC-400	4,72
<i>Chlorella</i> sp.	Talaj, BRA	MACC-383	4,68
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Talaj, BRA	MACC-785	4,36
<i>Acutodesmus wisconensis</i>	Víz, CZE	MACC-769	4,32
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Talaj, BRA	MACC-783	4,24
<i>Chlorella</i> sp.	Talaj, BRA	MACC-385	4,24
<i>Stigeoclonium</i> sp.	Víz, CZE	MACC-711	4,08
<i>Desmococcus olivaceus</i>	Talaj, BRA	MACC-379	4,00
<i>Chlorella minutissima</i>	Talaj, BRA	MACC-386	4,00

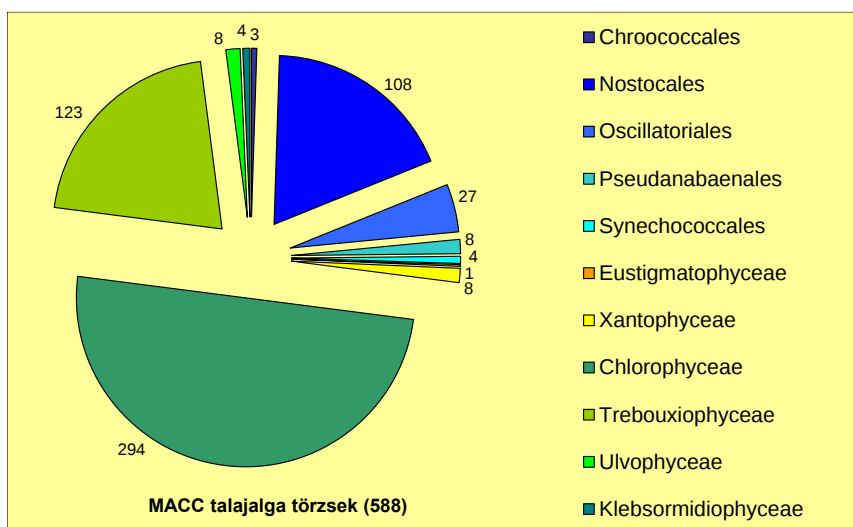
2.5. táblázat: Az MACC 300 mg L⁻¹ nap⁻¹ értéknél nagyobb napi biomassa termelésű törzsei.

Faj és/vagy nemzetség	Eredet	Kód	Szárazanyag-termelés (mg L ⁻¹ nap ⁻¹)
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	Talaj, BRA	MACC-553	351,43
<i>Desmodesmus pannonicus</i>	Víz, CZE	MACC-742	327,27
<i>Chlorella vulgaris</i>	Víz, RUS	MACC-1	316,25
<i>Chlorella</i> sp.	Talaj, BRA	MACC-400	314,67
<i>Chlorella</i> sp.	Víz, RUS	MACC-2	308,75

2.3.3. Az MACC talajalgák rendszertani helye és produktivitásának jellemzői

Rendszertani megoszlás

Az MACC talajalga törzseinek a rendek/osztályok szerinti megoszlása hasonló a teljes gyűjteményhez. A törzsek 89%-a három nagy rendszertani csoportba tartozik (**2.15. ábra**). A cianobaktériumok közül a Nostocales rendbe tartozó törzsek, míg a zöldalgáknál a Chlorophyceae és Trebouxiophyceae osztályba tartozó törzsek dominálnak. A gyűjtemény törzseinek pontosan a fele (50%) a Chlorophyceae osztályba tartozik. A trópusi (brazil) talajokból izolált törzsek között kevés (38) cianobaktérium és sok eukarióta alga (269). Európai (cseh, magyar és szerb) talajokból ugyanakkor viszonylag sok, 112 cianobaktérium és ehhez képest viszonylag kevés 168 eukarióta alga származik. A trópusi és az európai törzsek közötti különbség a cianobaktériumok és az eukarióta algák arányában két tényezőtől adódik: (1) a brazil talajmintákból a vártnál jóval kevesebb cianobaktériumot izoláltunk, ami csökkentette a trópusi talajoknál a cianobaktériumok arányát (12%); (2) a szerb mikroalga törzsek többsége cianobaktérium volt, ami növelte az európai talajoknál a cianobaktériumok arányát (40%). Az arány különbségek felhívják a figyelmet az izolálási módszer jelentőségére. A Braziliában gyűjtött talajminták 40%-ának a felszíne kék, zöldeskék, vagy kékesfekete színű volt a cianobaktériumok jelenléte miatt. Ennek ellenére a minták legfeljebb harmadából sikerült a dúsító tenyésztési módszerrel cianobaktériumot izolálni. A magyar talajmintáknál alkalmazott módszer, talajrögök helyezése nitrogénmentes BG-11 táptalaj felszínére hatékonyabb lett volna brazil talajoknál is (Lepossa 2003).



2.15. ábra: Az MACC talajból izolált cianobaktérium törzseinek rendek és eukarióta alगतörzseinek osztályok szerinti megoszlása.

A teljes gyűjteményhez hasonlóan a talajokból izolált cianobaktériumoknál is a *Nostoc* és az *Anabaena*, míg az eukarióta algáknál a *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas* és *Scenedesmus* nemzetségekhez tartozó törzsek domináltak. A cianobaktériumoknál az első

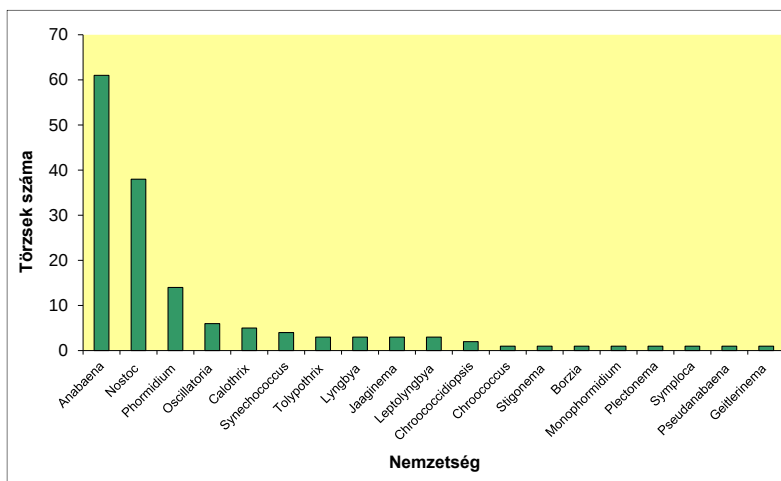
három helyen a sorrend nem változott (*Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium*), viszont előbbre került a sorban két nitrogénkötő cianobaktérium, a *Calothrix* és a *Tolypothrix* (2.16. ábra). Az eukarióta algáknál a második és harmadik helyre került a *Chlorococcum* és a *Chlamydomonas*, ugyanakkor a *Scenedesmus* nemzetség a másodikról visszaesett a negyedik helyre (2.17. ábra). A sorrend változása a talajok mikroalga összetételében a nitrogénkötők nagyobb jelentőségével, a *Chlamydomonas* törzseknél pedig a poliszacharid termeléssel indokolható. Előbbiek alkalmankénti nitrogénkötéssel, utóbbiak a talajkondicionálással lehetnek hasznosak. Mindazonáltal ez nem jelenti azt, hogy a talajoltás nitrogénkötőkkel Magyarországon nitrogénkötési céllal indokolt lenne.

Talajalgákról, ezen belül nitrogénkötő cianobaktériumok előfordulásáról számolnak be az USA-ból (Alwathnani et al. 2011, Johansen 1993), Izraelből (Dor & Danin 1996), Afrikából (Ullmann & Büdel 2001, Weber et al. 1996), Kínából és Mongóliából (Büdel 2001), Argentínából (Tell & Mataloni 2005) és Indiából (Tirky & Adhikary 2005, 2006). A leggyakrabban előforduló cianobaktériumok a következők, amelyek közül vastagítva jelölöm a talajmintákból izolált/származó MACC törzseket: ***Nostoc***, *Chroococcus*, ***Oscillatoria***, ***Phormidium***, *Plectonema*, *Schizothrix*, *Scytonema*, ***Tolypothrix***, ***Calothrix***, *Cylindrospermum* és *Microcoleus*.

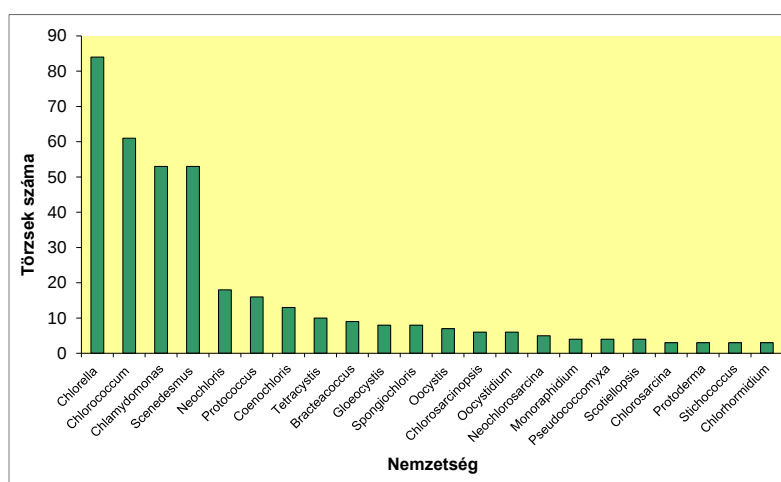
Szaporodás

A talajalgák közül az eukarióta algák kicsit több mint 60%-a Tamiya tápoldatban szaporodik a legjobban, ami a teljes MACC-re is jellemző. A talaj-cianobaktériumoknál viszont a törzsek 75%-a, azaz 15%-kal több szaporodik jól BG-11 tápoldatban (2.18. ábra). Az MACC talajalga törzseinek a szaporodása hasonló a teljes gyűjtemény törzseire jellemző értékekhez. A legnagyobb biomasszát adó cianobaktérium törzsek a talajalgáknál is a 0,75 és 1,75 g L⁻¹ tartományba esnek (2.19. ábra). A jól szaporodó, vagyis 2 g L⁻¹ biomasszát termelő törzsek száma 10. Az eukarióta talajalgák 1 és 3 g L⁻¹ közötti legnagyobb biomasszát képesek termelni, ami a teljes MACC-re jellemző érték. A 3 g L⁻¹-nél nagyobb biomasszát termelő eukarióta talajalgák száma 57. A cianobaktériumok napi szárazanyag termelése 50-150 mg L⁻¹ nap⁻¹, míg az eukarióta talajalgáké a 100-225 mg L⁻¹ nap⁻¹, ami kicsit nagyobb, mint a teljes MACC-re jellemző érték (2.20. ábra).

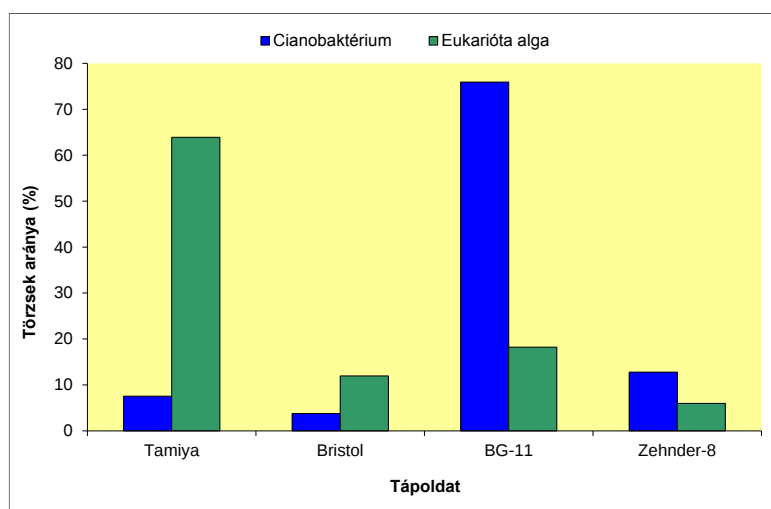
Összefoglalva megállapítható, hogy a teljes MACC-hez viszonyítva a talajalgák között több a *Chlamydomonas* és a nitrogénkötő törzs. A cianobaktériumok a BG-11 tápoldatot, az eukarióta talajalgák pedig a Tamiya tápoldatot részesítik előnyben a többi tápoldattal szemben. A talajban élő eukarióta algák kicsit gyorsabban szaporodnak és nagyobb végső biomasszát termelnek, mint a vízi eukarióta algák. A teljes MACC-t figyelembe véve a cianobaktérium törzsek lassabban szaporodnak és kisebb végső biomasszát termelnek, mint az eukarióta algák.



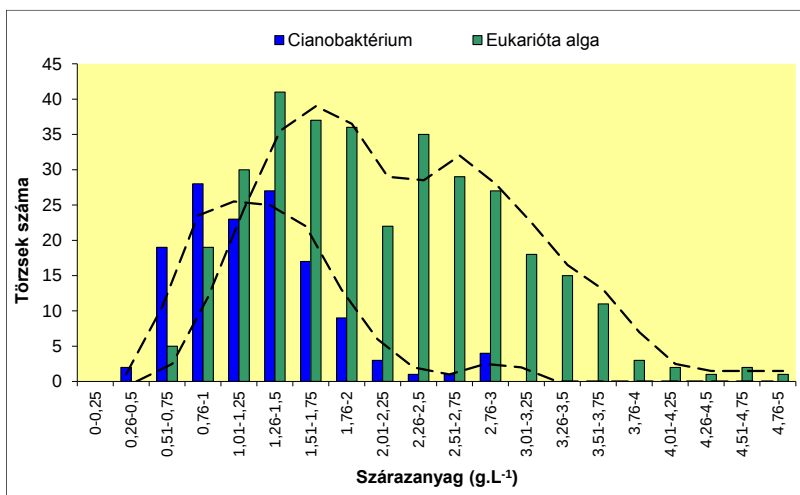
2.16. ábra: Az MACC talajból izolált cianobaktérium törzseinek nemzetségek szerinti megoszlása.



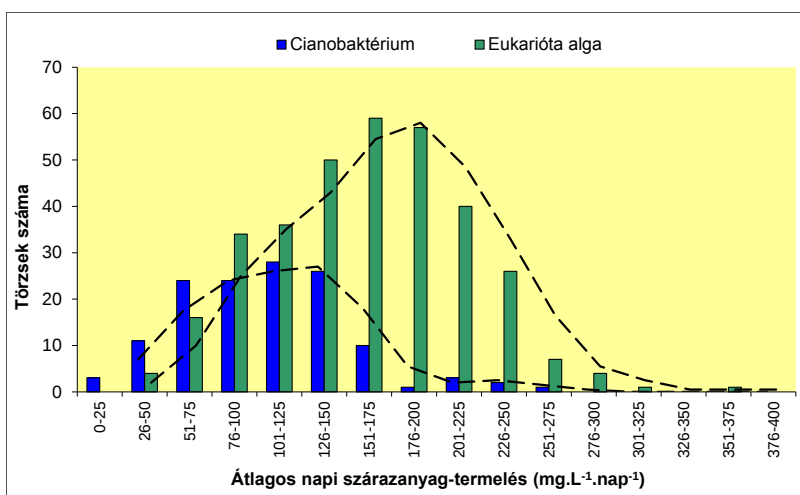
2.17. ábra: Az MACC talajból izolált zöldalga törzseinek 90%-át adó nemzetségekben előforduló törzsek száma.



2.18. ábra: Négy kiválasztott táplódatban a legnagyobb biomasszát elért MACC talajalga törzsek aránya.



2.19. ábra: Az MACC legnagyobb biomasszát termelő talajalga törzseinek a száma a biomassa függvényében.



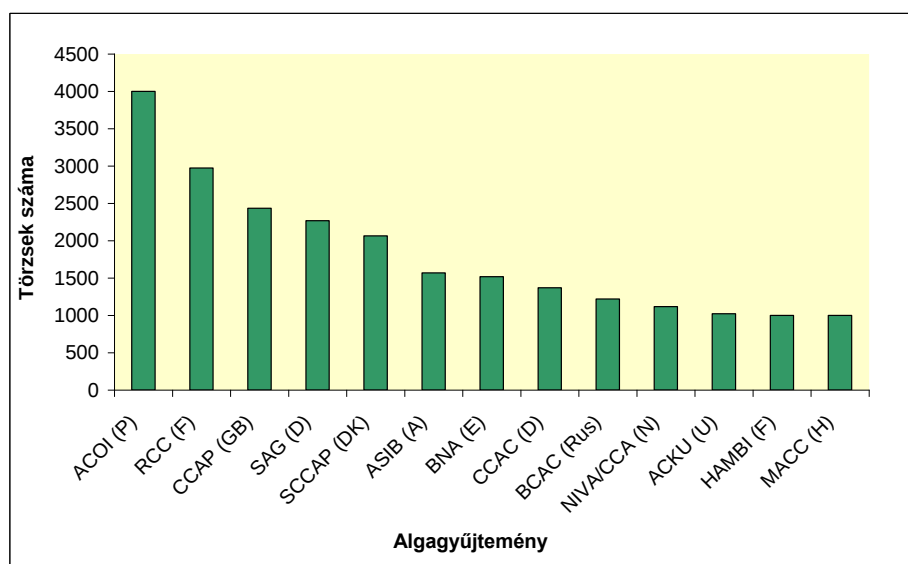
2.20. ábra: Az MACC talajalga törzseinek a megoszlása az átlagos napi száranyag-termelés függvényében.

2.3.4. Az MACC helye és jelentősége az európai algagyűjtemények között

Az MACC létrehozásakor egy francia gyógyszerkutató céggel (Thallia Pharmaceuticals S.A., Ecully, Franciaország) és egy német mezőgazdasági kutatóintézettel (IGV – Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Nuthetal, Németország) álltunk kapcsolatban. Kérésük az volt, hogy a gyógyszeripar és a mezőgazdaság számára várhatóan értékes törzsekből álló gyűjteményt hozzunk létre. A természetben szélsőséges körülmények között és számos más mikroszervezettel együtt élő talajalgák izolálását választottuk abban a reményben, hogy ezek több antimikrobiális anyagot termelnek, mint az édesvízi mikroalgák. Az MACC összesen 587 talajalga törzset tartalmaz, ebből 390 saját izolálású brazil és magyar törzs, további 197 pedig más gyűjteményekből beszerzett. Az MACC Európa tizenharmadik legnagyobb gyűjteménye

(2.21. ábra) és harmadik legnagyobb talajalga gyűjteménye az ASIB (Innsbruck) és a BCAC (Ufa) mögött.

Az MACC-ben a cianobaktérium törzsek száma (280) és aránya (29%) meghaladja az európai gyűjteményekben lévő cianobaktériumok arányát annak ellenére, hogy a brazil talajmintákból történő izoláláskor nem fordítottunk kellő figyelmet a cianobaktériumok izolálására. Az európai gyűjteményekben átlagosan 23% a cianobaktériumok aránya, az Európán kívüliekben pedig 15%. A cianobaktériumok nem csupán toxinokat, hanem más biológiailag aktív másodlagos anyagcsere termékeket is termelnek, amelyek hasznosítási lehetőségeire egyre többen hívják fel a figyelmet (Dixit & Suseela 2013, Mukherjee et al. 2013, Tan 2010, Tantawy 2011, stb.). Az MACC nem publikált gyűjtemény. Célunk nem törzsek eladása, hanem hazai és nemzetközi kutatási projektekben való részvétel. Egyedi kutatási témáinkban való részvételre és két évente szervezett tudományos üléseinken a részvételre növekvő hazai és nemzetközi igény van.



2.21. ábra: Európa legnagyobb mikroalga gyűjteményei.

2.3.5. MACC-törzsek a kutatásban – múlt, jelen és jövő

Kezdeti időszak, a múlt

Az MACC létrehozását 1990-ben kezdtük meg a mikroalgák növényi hormontermelésének és növénypatogének elleni hatásának a tesztelésére. Az első két kísérleti évet követően a Brandenburgi tartomány támogatásával ezen a témán négy éven át dolgoztunk együtt az IGV – Institute für Getreideverarbeitung GmbH (Nuthetal, Németország) kutatóintézettel. Az MACC célszerű és gyors fejlesztését jelentette egy francia (Thallia Pharmaceuticals) céggel való együttműködésünk 1995 és 1997 között. A francia cég gyógyszer alapanyagot keresett, mi pedig ezzel párhuzamosan a törzsek alkalmasságát vizsgáltuk mezőgazdasági célokra. Dél-afrikai bilaterális együttműködést a Research Centre for Plant Growth and Development,

University of KwaZulu-Natal (Pietermaritzburg) egyik kutató központjának igazgatójával 2001-ben kezdtünk a mikroalgák növényi hormontermelésének a kutatására. A következő évben a cseh Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University (Olomouc) is bekapcsolódott az együttműködésbe növényi hormonelemzésekre tökéletesen felszerelt laborjaival. A Lausitz University of Applied Sciences (Senftenberg, Németország) megbízásából 2010-11-ben gyors szaporodású és nagy lipidtermelő *Chlorella* és *Scenedesmus* törzseket kerestünk az MACC törzsei között. Korábbi norvég kutató partnerünk meghívására 2009 és 2012 között egy EU-FP7 projektben vettünk részt egyebek között a stuttgarti Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB (Németország) közreműködésével. A téma káposzta gyökérlégy ellen hatásos mikroalgák kutatása volt. Értekezésem utolsó fejezete ennek a projektnek az eredményeit mutatja be.

Magyar partnerek közül a Phylaxia Pharma Zrt. (Budapest) koordinálásával egy GAK projektben vettünk részt 2004 és 2006 között. Feladatunk többszörösen telítetlen zsírsavakat termelő mikroalgák kutatása volt. Ehhez kapcsolódott 2007-ben egy megbízásos feladatunk, ami mikroalgák biohajtóanyag (biodízel) termelésének a kutatása volt, elsősorban törzsek kiválasztása és laboratóriumi tenyésztése a lipidtermelés maximalizálására. Jedlik Ányos program keretében 2005 és 2008 között paprika gombabetegségek ellen hatásos algát kerestünk az MACC-ben. Növényvédő kollégáink az 1990-es évek elejétől több-kevesebb folyamatossággal tesztelik az MACC törzsek hatását növénypatogénekre. Növénytermesztő kollégáink 2008-tól vizsgálják a növényi növekedés és serkentés befolyásolására alkalmas mikroalgáinkat cukorrépa, burgonya, repce és paprika növényeken.

Folyamatban lévő projektek, a jelen

Nemzetközi együttműködéssel egy EU-FP7 projektben (FP7/2007-2013-31554: „ProEcoWine – Development of a Process to Generate a Novel Plant Protection Product Enriched with Micronutrients to Replace Copper in Organic Farming”) vizsgáljuk a réz kiváltásának a lehetőségét szőlőültetvényekben mikroalgákkal. Feladatunk a *Botrytis cinerea* és a *Plasmopara viticola* ellen hatásos mikroalgák kutatása. A célra már a kutatás kezdetén 3-3 MACC-törzsünk volt a korábbi teszt eredmények alapján. A projekt 2014 végén, reményeink szerint sikeresen fejeződik be. Egy amerikai-indiai cég 2013 végén érdeklődött kutatási eredményeink iránt. A tárgyalások folyamatban vannak. Dél-afrikai és cseh partnereinkkel, most már anyagi támogatás nélkül, de továbbra is együtt dolgozunk a mikroalgák növényi hormontermelése kutatási témán.

Hazai pályázati támogatást egy TÁMOP projekt (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0003: „Mikroalga biotechnológia a fenntartható mezőgazdaságban”) keretében a Martonvásári Kutatóintézetrel nyertünk a mikroalga biotechnológia tudományos támogatására molekuláris biológiai módszerekkel, egyebek között az MACC molekuláris taxonómiai jellemzésére. Egy GOP pályázat (GOP-1.1.1-11-2012-0157: „Magas lipidtartalmú szuszpenziókból szerves anyag kinyerése és iparszerű hasznosítása”) keretében magas lipidtartalmú algák kutatása, termelése és szüretelése a feladatunk. PhD-hallgatóink közül ketten kutatják mikroalgák hatását repcére és napraforgóra, hárman pedig az MACC-törzsek molekuláris taxonómiai vizsgálatát végzik.

Tervek, jövőkép

Fő célunk a gyűjtemény fenntartása és minimális bővítése talajvirágzásokból izolált cianobaktériumokkal és a törzsek állandóan megújuló tudományos nevének (rendszertani helyének) folyamatos követése alkalmas mikroszkópos és molekuláris biológiai módszerekkel. A törzsfenntartásnál a krioprezervációra csupán akkor térünk át, ha már jól bevált szabvány eljárások állnak rendelkezésre a teljes gyűjtemény fenntartására. Az elmúlt két évtizedben az MACC-t nem csupán ismertté tettük, hanem sikerült hasznosítását a kutatásban és fejlesztésben magyar, európai és világszinten egyaránt elérnünk. A gyűjtemény fenntartásának költségeit a jövőben is hasonló módon, támogatott konzorciumi kutatásokkal szeretnénk megoldani. A két évtizedes alkalmazott kutatás eredményei beértek a gyakorlati alkalmazásra. Szeretnénk, ha a K+F+I lánc végén a növénytermesztés és a növényvédelem ténylegesen hasznosítaná az eredményeket.

2.4. Új tudományos eredmények

Létrehoztuk a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményt (MACC), ami Európa 13. legnagyobb, a talajalgákat tekintve pedig a 3. legnagyobb mikroalga gyűjteménye. Az MACC 970 törzsből ezen belül 588 talajalgából áll. A saját izolálású 307 brazil és a 78 magyar talajalga törzs közül 50 cianobaktérium és 385 eukarióta alga. Megkezdtük a törzsek rendszertani besorolásának a pontosítását molekuláris biológiai módszerekkel. A gyűjtemény felét (509 törzs) a mikroalga biotechnológia számára fontos 6 nemzetség adja: a cianobaktériumok közül az *Anabaena* (82) és *Nostoc* (57), a zöldalgák közül pedig a *Chlorella* (122), *Scenedesmus* (106), *Chlorococcum* (72) és *Chlamydomonas* (70) törzsek. Jellemeztük az MACC törzsek szaporodását. Megállapítottuk, hogy a cianobaktériumok 60%-a BG-11, 20%-a a Zehnder-8 és 10%-a a Tamiya tápoldatban szaporítható. Az eukarióta mikroalgák 60%-a a Tamiya, 15-15%-a pedig a Bristol és BG-11 tápoldatban szaporodik a legjobban. A Tamiya tápoldatban szaporodó cianobaktériumok és eukarióta algák napi szárazanyag termelése hasonló ($0,17-0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ nap}^{-1}$) és lényegesen nagyobb, mint a másik három tápoldat bármelyikében szaporodó törzseké ($0,1-0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ nap}^{-1}$). A maximálisan elérhető biomassa a cianobaktériumoknál kisebb ($0,75-1,75 \text{ g L}^{-1}$) mint az eukarióta algáknál ($1-3 \text{ g L}^{-1}$).

A gyűjtemény mikroalga törzseit az elmúlt 20 évben számos hazai és nemzetközi projekt céljaira használtuk a mikroalgák növényi hormontermelésének, antimikrobiális hatásának és illékony szerves vegyületeinek a tanulmányozására a mezőgazdasági hasznosítást szem előtt tartva, míg a mikroalgák lipidtermelését megújuló energiaforrásként tanulmányoztuk.

3. Mikroalgák növényi hormontermelése

3.1. Irodalmi áttekintés

3.1.1. A növényi hormonok szerepe a magasabbrendű növényekben

A növényi hormonok természetes eredetű szerves anyagok olyan csoportja, amely kis koncentrációban befolyásolja a növények életfolyamatait (Davies 2004a). Hatásuk alapvetően a jelenlévő hormonoktól és koncentrációjuktól, valamint a növényi szövet fogékonyságától függ. A hormon aktuális koncentrációját bioszintézise, lebomlása vagy konjugációja határozza meg, a növény érzékenységét pedig a receptorok és a jelátviteli lánc tagjainak a jelenléte (Davies 2004b). A gyorsan növekvő növények sokkal érzékenyebbek a stressz hatásokra, mint a lassan növekvő növények. Ez a megállapítás vezetett a „növényi dilemma” elméletéhez, miszerint a növényeknek dönteniük kell, hogy csekély megtermelt energiájukat növekedésre, vagy stressz válasza fordítják (Herms & Mattson 1992).

A növényi sejtben a sejtosztódást és differenciálódást növényi hormonok befolyásolják (De Veylder et al. 2007). A sejtcikluson a sejt belépését értjük a négy szakaszos sejtciklusba: első növekedési szakasz (G_1), DNS szintézis (S), második növekedési szakasz (G_2) és mitózis (M), de a sejt kilépését a sejtciklusból is ide értjük (De Veylder et al. 2007). A sejtciklus szabályozása erősen konzervatív minden eukarióta sejtben, az átmenetet ciklin-függő kinázok szabályozzák (Del Pozo et al. 2005). Az auxinok és citokininek szabályozzák néhány sejtciklushoz kapcsolódó gén transzkripcióját, egymáshoz viszonyított arányuk pedig a sejtosztódás indukcióját (Del Pozo et al. 2005, Perrot-Rechenmann 2010). Növényi hormonok befolyásolják a sejtciklus lefolyását is. Az auxinok például többféle módon hatnak a sejtciklusra, befolyásolják mind a transzkripciós mind a poszt-transzkripciós szabályozást és a fehérje szintézist is (Perrot-Rechenmann 2010). A citokininek a G_1/S és G_2/S átmeneteket befolyásolják (Del Pozo et al. 2005).

A növényi hormonok koordinálják a magasabbrendű növényekben a növény választ a környezeti változásokra. A növényekben a növényi hormonok és nem-hormonális jelek többszörös, egységes rendszere alakult ki a folyamatosan változó környezeti feltételekre történő gyors válaszként (Chico et al. 2008). Ezeket a válaszokat önszabályozó negatív visszacsatolási rendszerek vagy más növényi hormonokkal való kölcsönhatások (additív, szinergista vagy antagonisták) szabályozzák. Mindez a növény túlélési esélyének a növelésére történik. Egyensúly kell legyen a növény optimális növekedése, a specifikus fejlődési folyamatok és/vagy a védekező folyamatok serkentése között (Chico et al. 2008, Lyons et al. 2013). Különböző hormonkombinációk befolyásolják azt, hogy a növény a fotoszintézis révén megkötött energiát és megtermelt biomasszát növekedésre vagy védekezésre fordítja (Lyons et al. 2013). A gibberellinek és az auxinok például szinergista módon hatnak egymásra, az auxinok pozitívan befolyásolják a gibberellin szintet. Antagonista hatás van a gibberellinek és az ABA, valamint a gibberellinek és a citokininek között (Weiss & Ori 2007, Yamaguchi 2008). A brasszinoszteroidok szinergisták az auxinoknak és kölcsönhatásban állnak az ABA-val, továbbá additív hatásúak a gibberellinokkal és növelik az etilén termelést (Bajguz & Hayat 2009).

Minthogy a mikroalgák is osztódnak, válaszolnak a környezet jeleire és védekezniük kell a számukra patogén mikroszervezetekkel szemben feltételezhetjük, hogy a sejtosztódás szabályozásában és a környezeti változásoknál a válaszadásban is növényi hormonoknak lehet koordináló szerepe.

3.1.2. Növényi hormonok a mikroalgákban

A növényi hormonok általánosan elterjedtek és létfontosságúak a magasabbrendű növények növekedésének és fejlődésének a szabályozásában, valamint a környezeti stressz hatásokra adott válaszban. A mikroalgáknak is van számos élettani válasza a környezeti hatásokra, amelyek szintén biokémiai szabályozás alá esnek (Bradley 1991). Evans és Trewavas (1991) óvatosságra int a mikroalgák növényi hormontermelő képességével kapcsolatban, mondván nem axénikus tenyészetekben az együtt élő mikroszervezetek is felelősek lehetnek a kimutatott hormonokért, vagy a hormonszerű hatásért. Jóllehet a növényi hormonok jelenlétének és szerepének kutatása messze elmarad a magasabbrendű növényekétől, egyre több bizonyíték van arra, hogy a mikroalgákban is megtalálhatók (Tarakhovskaya et al. 2007). A növényi növekedésszabályozó anyagok kutatása algákban két fő irányban halad: (1) jelenlétük meghatározása biotesztekkel és műszeres analitikai módszerekkel, és (2) algák élettani válasza az exogén növényi hormon adagolásra (Provasoli & Carlucci 1974). Utóbbi megközelítés az 1960-as évekre volt jellemző, amikor korlátozottak voltak a műszeres mérés lehetőségei, de manapság ismét előtérbe került a hormonhatás igazolására.

Auxinok

Mikroalgák endogén auxinjairól vannak korábbi közlemények. Szabad IAA-t kimutattak például hét *Chlorella* törzs stacioner szaporodási szakaszban lévő tenyészetéből. Emellett kisebb koncentrációban, de előfordult az IAM is, mint egyetlen indol konjugátum (Jirásková et al. 2009). Az exogén auxin befolyásolta a mikroalgák szaporodását. Az IAA kezelés csökkentette a *Chlorella pyrenoidosa* sejtciklusának befejezéséhez szükséges időt (Vance 1987) és serkentette a *Scenedesmus obliquus* tenyészetek növekedését (Prasad 1982). Több auxinról és auxinokkal rokon vegyületről megállapították, hogy 10^{-5} - 10^{-4} M koncentrációban serkentő hatással van *Chlorella* fajok szaporodására és egyes anyagcsere termékeinek a mennyiségére (Tate et al. 2013).

Citokininek

Néhány közlemény szól arról, hogy a tenyészetbe adagolt citokininek növelték a *Scenedesmus quadricauda* sejtszámát (Burkiewicz 1987). *Chlorella vulgaris* axénikus tenyészetét citokinin kezelésre koncentrációtól függő módon válaszolt. Optimális koncentrációban adagolva növelte a sejtszámot, az RNS tartalmat, a specifikus fehérjéket és polipeptideket, a glutaminsav dehidrogenáz aktivitásának a befolyásolásával javította a nitrogén anyagcserét, növelte a fotoszintetikus színanyagok (klorofill és karotinoidok) koncentrációját és a glikolsav tartalmat. Folyamatos sötétben tartott tenyészetekben csökkent a sejtnövekedés, kisebb lett az RNS

tartalom, a fehérjék, a polipeptidek, a fotoszintetikus színanyagok és a glikolsav mennyisége és csökkent a glikolsav dehidrogenáz aktivitása is. Citokinin adagolással részben ellensúlyozni lehetett a fény hiányát (Piotrowska & Czerpak 2009).

Gibberellinek

Korábbi közlemények nem állnak rendelkezésre mikroalgákból kimutatott gibberellinekről. Csupán egy közlemény készült mikroalgák gibberellines kezelésének élettani hatásáról, ahol a GS₃ és kisebb mértékben a GS₉ segítette a sejtsztódást és a szárazanyag felhalmozódást a *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quaricauda* és a *Dictyosphaerium pulchellum* zöldalgákban (Burkiewicz 1987).

Néhány közlemény megjelent viszont a GS₃ előfordulásáról több tengeri *Ulva* fajban (*U. fasciata*, *U. lactuca*, *U. taeniata*, *U. reticulata* és *U. linza*; Gupta et al. 2011) továbbá a *Kappaphycus alvarezii* és *Gracilaria edulis* tengeri algákban. A *Sargassum tenerrimum*-ban GS₉-et találtak (Prasad et al. 2010). Stirk és munkatársai (2014a) 18 gibberellint mutattak ki az *Ecklonia maxima* tengeri algában.

Abszcizinsav

Az első kutatási eredmény a mikroalgák ABA tartalmáról Hirsch és munkatársainak (1989) a nevéhez fűződik. Hatvannégy alfafaj vizsgálatával megállapították, hogy az ABA előfordulása valószínűleg általános a mikroalgákban. Néhány algában stressz hatására ABA felhalmozódást is megfigyeltek. Az ABA a magasabbrendű növényekben is elsősorban stresszhormonként működik. Számos folyamatban vesz részt, ami megvédi a növényt az abiotikus stressztől. A sejtben lévő ABA megnövekedett koncentrációjáról számoltak be például a *Draparnaldia mutabilis*-ban sóstressz hatására (Tietz et al. 1989). Ugyancsak a sóstressz miatt növekedett az ABA a *Dunaliella* zöldalga (Cowan & Rose 1991) és a *Trichormus variabilis* cianobaktérium (Zahradnicková et al. 1991) tenyésztésében. Az ABA kezelés csökkentette a *Scenedesmus acutus* fogékonyságát a *Phlyctidium scenedesmi* patogén fertőzéssel szemben (Pouneva 2006) és sóstresszre növelte a *Chlamydomonas reinhardtii* antioxidáns hatását (Yoshida et al. 2004).

Brasszinoszteroidok

Mikroalgák brasszinoszteroidjairól csupán egyetlen közlemény található az irodalomban, amelyben hét különböző C₂₈ brasszinoszteroidot mutattak ki (TE, TY, 6-deoxoTE, 6-deoxoTY, 6-deoxoCS, CS és BL) *Chlorella vulgaris* zöldalgából (Bajguz 2009). A kimutatott vegyületek a korai és késői C6-oxidációs út köztes termékei. A BL, CS és homoCS kezelés serkentette a *Chlorella vulgaris* növekedését (növelte sejtszámát), valamint növelte DNS, RNS és fehérje tartalmát (Bajguz 2000). A kezelések ellensúlyozták a nehézfém stressz hatását gátolva a nehézfém felhalmozódását és csökkentve a klorofill, fehérje és monoszacharid veszteséget (Bajguz 2011).

A makroalgák brasszinoszteroidjairól is mindössze két közlemény készült. Két C₂₈ brasszinoszteroidot (24-*epi*CS és 28-HomoCS) izoláltak a *Hydrodictyon reticulatum* (Yokota et al. 1987) édesvízi zöldalgából. Hasonló mennyiségben találtak BL-t és CS-t az *Ecklonia maxima* tengeri alga „szárában” és „levelében” (Stirk et al. 2014a).

3.1.3. Tengeri algakivonatok alkalmazása a mezőgazdaságban

Az első folyékony tengeri algakivonatot mezőgazdasági célokra az 1940-es évek végén fejlesztették ki és Maxicrop néven forgalmazták (Craigie 2011). Manapság számos folyékony vagy por alakú tengeri alga készítmény létezik, amelyek többnyire barnamoszatokból készülnek és növényi biostimulánsként kaphatók (Khan et al. 2009). A tengeri algakivonatokra többféle választ adnak a kezelt növények, növekszik a gyökerük és hajtásuk, növekszik a tápanyagfelvételük, megnövekszik a virág- és terméskötődésük, ami nagyobb terméshez vezet, eltolódik az öregedésük és hosszabb ideig lesznek eltarthatók a gyümölcsök (Crouch & van Staden 1994, Khan et al. 2009, Metting et al. 1990). A kezelt növények jobban ellenállnak a rovarok és patogének támadásának, egyes abiotikus stressz hatásoknak, így a szárazságnak és a fagynak (Craigie 2011, Crouch & van Staden 1994, Khan et al. 2009, Metting et al. 1990). A tengeri algakivonatokat, akár talaj, akár levélkezelésre használják, olyan kis koncentrációban és mennyiségben juttatják ki, hogy a kedvező hatások nem magyarázhatók a kivonatban lévő makro- és mikroelemekkel (Craigie 2011, Crouch & van Staden 1994). Ellenkezőleg, növényi hormonok és más elicitor molekulák, például poliszacharidok lehetnek az aktív anyagok, hiszen ezek képesek alacsony koncentrációban is élettani válaszokat kiváltani (Craigie 2011, Crouch & van Staden 1994, Khan et al. 2009).

A kezelésekre adott élettani válaszok széles skáláját tekintve nagyon valószínű, hogy számos aktív vegyület található a tengeri kivonatokban (Crouch & van Staden 1994). Dél-Afrikában az *Ecklonia maxima* tengeri algakivonat, a Kelpak többféle citokinint tartalmaz (szabad bázisokat, O-glükozid származékokat és aromás citokinineket), auxinokat (IAA, négy aminosav konjugátumot és három egyéb konjugátumot; Stirk et al. 2004), 18 gibberellint, ABA-t nagyon csekély koncentrációban, két brasszinoszteroidot (BL és BC; Stirk et al. 2014a) és poliaminokat (putreszcin és spermidin; Papenfus et al. 2012). Az etilén prekursor 1-aminociklopropán-karboxilsavat ugyancsak kimutatták a Kelpakban (Nelson & van Staden 1985). Feltételezhető, hogy a Kelpakból kimutatott sokféle természetes növényi hormon külön-külön, vagy együttesen hozzájárul a Kelpak által kiváltott kedvező élettani válaszok kialakulásához.

3.1.4. Célkitűzések

A mikroalgák növényi hormonjainak az ismerete alapkutatási és gyakorlati szempontból egyaránt fontos. Tenyésztetben serkenthetjük a mikroalgák szaporodását és javíthatjuk válaszukat a külső tényezőkre. Mikroalgák tömegtermesztésekor elérhetjük, hogy szüreteléskor az értékes anyagok, például a növényi hormonok koncentrációja és azok biológiai hatása nagy legyen és ezzel alkalmasabbak legyenek mezőgazdasági célokra, növénykezelésekre. Ennek érdekében a részletesebb célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- cianobaktériumok és eukarióta algák biotesztelése a növényi hormonszerű (auxin és citokinin) hatást mutató fajok/törzsek kiválasztására további vizsgálatokhoz;
- a kiválasztott mikroalgákban lévő hormonok minőségi és mennyiségi kimutatása műszeres analitikai módszerekkel;
- a sejtciklus és a növényi hormonok közötti kapcsolat tanulmányozása és megismerése mikroalgákban.

3.2. Anyag és módszer

A bemutatott módszerek részint a növényi hormonszerű (minőségi) hatás kimutatására szolgáló bioteszteket, részint a növényi hormonok mennyiségi mérésére alkalmas műszeres analitikai módszereket foglalják magukban. A vizsgált mikroalga mintákra vonatkozó tenyésztési körülményeket az egyes eredményeket bemutató részfejezetek tartalmazzák.

3.2.1. Biotesztek

A cianobaktérium és eukarióta alga törzsek citokininszerű hatásának a kimutatására az uborka sziklevel megnyúlási tesztet használtuk (Zhao et al. 1992). Az auxinszerű hatást az uborka sziklevel gyökérfejlődési teszttel értékeltük (Zhao és mtsai, 1992), amit kiegészítettünk a mungóbab adventív gyökérfejlődési teszttel (Crouch & van Staden 1991, Hess 1961).

Uborka sziklevel megnyúlási teszt citokininek kimutatására

Felszínileg sterilizett uborka (*Cucumis sativus* L.) magokat csíráztattunk 7 g L⁻¹ agarral megszilárdított Knop-táptalajon (Knop 1865) sötétben 5 napig, 25±2 °C-on. A magokat méretük szerint osztályoztuk annak érdekében, hogy azok eltérő mérete ne fedje el a kezelések hatását. A fagyasztva szárított mikroalga mintákat desztillált vízben szuszpendáltuk (10 g L⁻¹ szárazanyag) és ultrahangos roncsolóval a sejteket feltártuk. A szuszpenziót desztillált vízzel ötszörösére hígítottuk (2 g L⁻¹ száraz anyag) és 6 cm átmérőjű Petri csészékbe helyezett szűrőpapírra öntöttük (3 cm³). A szikleveleket zöld fényen izoláltuk, ezzel kivédtük a propasztizok érésének indukcióját. Az ötnapos csíranövényekről 10-10 db sziklevelet helyeztünk a Petri csészékbe, ügyelve arra, hogy ne maradjon mezokotil darab rajtuk, ami csökkentheti a citokininszerű hatás kimutatásának a pontosságát. A szikleveleket 3 napig sötétben, 25±2 °C-on inkubáltuk, majd ezt követően mértük a sziklevelek friss tömegét. Eltérő koncentrációjú kinetin (KIN) desztillált vizes oldatait (0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 10 mg L⁻¹) használtuk kalibrációs görbe készítésére. Kontrollként desztillált vizet használtunk. A biotesztet 4 ismétlésben végeztük és 3 különböző időpontban megismételtük. Az adatokat statisztikailag értékeltük (Microsoft Excel 2010). A mintákban a citokininszerű hatást a kalibrációs sor alapján kinetin koncentrációban adtuk meg.

Uborka sziklevel gyökérfejlődési teszt auxinok kimutatására

Felszíniileg sterilizált uborka (*Cucumis sativus* L.) magokat csíráztattunk 7 g L⁻¹ agarral megszilárdított Knop-táptalajon (Knop 1865) sötétben 5 napig, 25±2 °C-on. A magokat méretük szerint osztályoztuk annak érdekében, hogy azok eltérő mérete ne fedje el a kezelések hatását. A fagyasztva szárított mikroalga mintákat desztillált vízben szuszpendáltuk (10 g L⁻¹ szárazanyag) és ultrahangos roncsolóval a sejteket feltártuk. A szuszpenziót desztillált vízzel ötszörösére hígítottuk (2 g L⁻¹ szárazanyag) és 6 cm átmérőjű Petri csészékbe helyezett szűrőpapírra öntöttük (3 cm³). A szikleveleket zöld fényen izoláltuk, ezzel kivédtük a proplasztiszok érésének indukcióját. Az ötnapos csíranövényekről 10-10 db, a szik alatti 1 mm-es szárrészt hordozó sziklevelet Petri csészékbe helyeztünk zöld fényű megvilágítás mellett. A szikleveleket 5 napig sötétben, 25±2 °C-on inkubáltuk, majd megszámoltuk a képződött gyökerek számát. Eltérő koncentrációjú indol-3-vaajsav (IBA) desztillált vizes oldatait (0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 10 mg L⁻¹) használtuk kalibrációs görbe készítésére. Kontrollként desztillált vizet használtunk. A biotesztet 4 ismétlésben végeztük és 3 különböző időpontban megismételtük. Az adatokat statisztikailag értékeltük (Microsoft Excel 2010). A mintákban az auxinszerű hatást a kalibrációs sor alapján IBA koncentrációban adtuk meg.

Az MACC mikroalga minták vizsgálata a következő két bioteszttel a University of KwaZulu-Natal Növényi Növekedést és Fejlődést Vizsgáló Kutató Központjában, Pietermaritzburgban, Dél-Afrikában történt közös kutatási együttműködés keretében.

Mungóbab auxin bioteszt

A mungóbab biotesztet Crouch & van Staden (1991) és Hess (1961) által leírt módszerrel végeztük. A mungóbab (*Vigna mungo* L.) magok felszínét 3,5% NaOCl oldatba merítéssel 20 percig sterilizáltuk, csapvízzel alaposan leöblítettük és 6 órán át csapvízben áztattuk. Ezt követően a magokat nedves perlitbe ültettük és tenyésztő szobában 26±1 °C-on, 160 μmol foton m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson és 16:8 óra fény:sötét megvilágítás mellett csíráztattuk. Tíz nap elteltével 12 cm-es, két lomblevelű, sziklevelek nélküli hipokotilokat vágunk az egyforma növényekből és ezeket használtuk a biotesztekhez.

A mikroalga mintákat (1 g liofilezett minta) 100 cm³ 80%-os EtOH-val 24 órán át 10 °C-on extraháltuk, majd rövid ideig ultrahanggal kezeltük és szűrtük, majd ismét extraháltuk 100 cm³ 80%-os EtOH-val és szűrtük Whatman No.1 szűrőpapíron. A két kivonatot összeöntöttük, vákuumban bepároltuk és 100 cm³ 0,1 M foszfát pufferben (pH=8,0) oldottuk. A kivonathoz 100 cm³ etilacetátot adtunk és összerázás után a két fázist szétválasztottuk. Ezt még kétszer megismételtük. A 3 x 100 cm³ etilacetátos kivonatot összeöntöttük egy közös mintává. A foszfát pufferes vizes fázis pH-ját 0,1 M HCl hozzáadásával 3,0-ra állítottuk be. A 3,0-as pH-jú foszfát pufferes vizes fázishoz 100 cm³ etilacetátot adtunk és összerázás után a két fázist szétválasztottuk. A 3,0-as pH-jú foszfát pufferes vizes fázishoz még kétszer adtunk etilacetátot és választottuk szét a két fázist. A 3 x 100 cm³ etilacetátos kivonatot összeöntöttük egy közös mintává. Az extrakció végén három kivonatot nyertünk:

- a pH= 8,0 foszfát pufferes vizes fázis három etilacetátos kivonatából egyesített kivonat (300 cm³), ami a semleges indol vegyületeket tartalmazza;

- a pH=3,0 foszfát pufferes vizes fázis három etilacetátos kivonatából egyesített kivonat (300 cm³), ami a savas indol vegyületeket tartalmazza;
- az etilacetátos extrakciók után visszamaradt foszfát pufferes vizes fázis (100 cm³), ami az amfoter vegyületeket tartalmazza.

A három kivonatot vákuumban bepároltuk és a maradékot egyenként 50 cm³ desztillált vízben oldottuk. A mungóbab biotesztekhez az így elkészült három kivonatból a következő kezeléseket készítettük: (1) 15 cm³ kivonat (100%); (2) 7,5 cm³ kivonat + 7,5 cm³ desztillált víz (50%); (3) 2,5 cm³ kivonat + 12,5 cm³ desztillált víz (17%). Összehasonlító kalibrációs görbét IBA 10⁻⁷-10⁻³ koncentrációjú vizes oldataiból készítettünk.

A fentiek szerint elkészített tesztoldatokból 15 cm³-t két-két tesztcsőbe töltöttünk (2 cm átmérőjű és 50 cm³-es üvegcsövek). Csőenként 5 darab leveles mungóbab hipokotil-darabot helyeztünk minden tesztcsőbe (n=10) és 6 órán át benne hagytuk 26±1 °C-on, 160 μmol foton m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson. Hat óra elteltével a leveles hipokotil darabokat csapvízzel leöblítettük, majd tiszta, csapvizet tesztcsővekbe tettük. Az így elkészített tesztcsöveket a leveles mungóbab hipokotil darabokkal együtt tenyésztő szobában 26±1 °C-on, 160 μmol foton m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson és 16:8 óra fény:sötét megvilágításon tartottuk. Szükség esetén a tesztcsővekbe desztillált vizet töltöttünk az eredeti térfogat megőrzésére. Tíz nap elteltével megszámoltuk a gyökerek számát a leveles hipokotilokon. A gyökerek számának az átlagát és az átlagtól való eltérést számítottuk ki minden kezelésnél.

Szója kallusz bioteszt

A mikroalga minták citokinin-szerű hatásának a vizsgálatára használtuk a szója kallusz biotesztet. A mikroalga mintákat (1 g liofilezett minta) 100 cm³ 80%-os EtOH-val 24 órán át 10 °C-on extraháltuk, majd rövid ideig ultrahanggal kezeltük és szűrtük, ismét összeráztuk 100 cm³ 80%-os EtOH-val, végül szűrtük Whatman No.1 szűrőpapíron. A kivonatokat vákuum alatt bepároltuk, a maradékot 50 cm³ 80%-os EtOH-ban újra szuszpendáltuk és a pH-ját 2,5-re állítottuk be. A savas kivonatot tisztítottuk, kationcserélő gyantán kromatografáltuk (30 g Dowex 50W-8X), majd az oszlopot 100 cm³ EtOH-val átmostuk. Ezt követően 100 cm³ 5 N ammónium-hidroxidot vittünk át az oszlopon, ami leválasztotta az oszlopról a citokinineket. Ebből az ammónium-hidroxidos kivonatból választottuk el papírkromatográfiával (10:1: v:v: izo-propanol:NH₄OH:víz) a citokinin-frakciókat. A kromatogramokat 50 °C-on 24 órán át szárítottuk és mértük a biológiai aktivitást szója kallusz bioteszttel Miller (1965) szerint.

A biotesztekhez a kromatogramokat 10 R_f zónára osztottuk, minden zónát apró darabokra vágtunk és Erlenmeyer lombikba tettünk. Miller közeget (30 cm³) öntöttünk minden lombikba 10 g L⁻¹ agarral együtt (Oxoid Bakteriológiai Agar). Kontrollt és kinetin oldatos (0-50 μg L⁻¹) kezeléseket is készítettünk. A lombikokat lezártuk és autoklávoztuk. Három darab 21-28 napos szója kallusz darabot (kb. 1 mg friss tömeg/darab) tettünk a megszilárdult agar felszínére steril körülmények között. A lombikokat alacsony fényintenzitáson 28 napig inkubáltuk, majd mértük a kalluszok tömegét, ami a növekedés mértékét jellemezte. A 0 μg L⁻¹ kinetines kontroll kallusz tömegét levontuk a többi kezelés értékeiből és ezeket a tömegeket használtuk a minták jellemzésére. Együtt értékeltük az R_f 0,1-0,4 mintákat, amelyek a glükózid származékokat tartalmazták, az R_f 0,5-0,7 mintákat, amelyek a Z, DHZ és ezek ribozid

származékait tartalmazták és az R_f 0,8-1,0 mintákat, amelyek az iP-származékokat tartalmazták. Az értékelést az alábbi kategóriák szerint végeztük:

nagyon kicsi = a kallusz növekedés az $1 \mu\text{g L}^{-1}$ kinetin kezelésnél kisebb;

kicsi = a kallusz növekedés az $1-10 \mu\text{g L}^{-1}$ kinetin kezelésnek felel meg;

közepes = a kallusz növekedés a $10-50 \mu\text{g L}^{-1}$ kinetin kezelésnek felel meg;

nagy = a kallusz növekedés nagyobb, mint az $50 \mu\text{g L}^{-1}$ kinetin kezelésnél, de nem éri el annak a kétszeresét;

nagyon nagy = a kallusz növekedés nagyobb, mint az $50 \mu\text{g L}^{-1}$ kinetin kezelés kétszerese.

3.2.2. Analitikai vizsgálatok

Az MACC mikroalga minták hormontartalmának az analitikai vizsgálata a Palacky University Növekedésszabályozó Anyagok Laboratóriumában (Olomouc, Cseh Köztársaság) történt, közös kutatási együttműködés keretében.

Endogén auxinok mennyiségi meghatározása

A mikroalgák auxin tartalmának meghatározása Stirk et al. (2009) szerint történt. Fagyasztva tárolt és a vizsgálatok előtt kiolvasztott 15 cm^3 mikroalga szuszpenzióból két ismétlésben kivonatot készítettünk 50 mM hideg foszfát pufferrel ($\text{pH } 7.0$) és nátrium-dietil-ditiokarbamáttal. Az elegyhez a kivonás ellenőrzésére és a meghatározás megerősítésére ^{15}N és/vagy $^2\text{H}_5$ -vel jelzett 12-20 belső indol standardot adtunk. Centrifugálást követően a felülúszót 1 M HCl hozzáadásával savasítottuk ($\text{pH } 2.7$) és C8-as oszlopon tisztítottuk (Bond Elut, 500 mg ; 3 ml ; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA), az indol metabolitokat 70%-os savas metanollal eluálva. A kivonatot diazometánnal való metilezés után vákuum alatt szárítottuk, majd a Rolčík et al. (2002) által melatoninra leírt módon auxin-specifikus immunaффinitás kivonással tártuk fel. Az indol vegyületek mennyiségi meghatározása HPLC-s elválasztást követően tandem tömegspektrometriás módszerrel történt (Acquity, Waters, Milford, MA, USA; Penčík et al. 2009). Az eredeti kivonatok auxin koncentrációját az indol standard alapján nmol g^{-1} mikroalga szárazanyagra számítottuk ki.

Endogén citokininek mennyiségi meghatározása

A mikroalgák citokinin tartalmának meghatározása a korábbiakban már leírt módszerekkel történt (Stirk et al. 2011). Fagyasztva tárolt és a vizsgálatok előtt kiolvasztott 20 cm^3 mikroalga szuszpenzióból két ismétlésben 70%-os jéghideg metanollal kivonatot készítettünk, ehhez izoprenoid $^2\text{H}_5$ -tel jelzett 16 citokinin keveréket adtunk belső standardnak. A kivonatot 100 mg SCH oszlopon (Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) valamint citokinin monoklonális antitestekkel ellátott immunaффinitás kromatográfiás oszlopok segítségével tisztítottuk (Novák et al. 2003). A kapott három frakciót „elektrospray interface”-szel ellátott, „triple quadrupole” tömegspektrométerrel (Quattro microTM API, Waters; Milford, MA, USA) összekötött UPLC-vel tovább analizáltuk (Acquity UPLCTM; Waters, Milford, MA, USA). A citokinin szint

meghatározása standard izotóp hígítás módszerrel, Masslynx 4.1 szoftver (Waters, Milford, MA, USA) segítségével, az eredeti kivonatban lévő citokinin mennyiségi meghatározása a belső standard alapján történt (Novák et al. 2008). Az egyes citokinin koncentrációkat pmol g⁻¹ mikroalga szárazanyagban határoztuk meg.

Endogén gibberellinek mennyiségi meghatározása

A minták gibberellin tartalmának vizsgálatát az Urbanová et al. (2013) által leírt módszer alapján, annak kismértékű változtatásával végeztük. Fagyasztva tárolt és a vizsgálatok előtt kiolvasztott 500 µL algaszuszpenziót 5 percig szonikáltunk, majd hozzáadtunk 1 cm³ 5% hangyasav tartalmú 80%-os acetonitrilt valamint 19 belső standard gibberellint ([²H₂]GS₁, [²H₂]GS₃, [²H₂]GS₄, [²H₂]GS₅, [²H₂]GS₆, [²H₂]GS₇, [²H₂]GS₈, [²H₂]GS₉, [²H₂]GS₁₂, [²H₂]GS_{12ald}, [²H₂]GS₁₅, [²H₂]GS₁₉, [²H₂]GS₂₀, [²H₂]GS₂₄, [²H₂]GS₂₉, [²H₂]GS₃₄, [²H₂]GS₄₄, [²H₂]GS₅₁ és [²H₂]GS₅₃ (OlChemIm, Olomouc, Czech Republic), majd egy éjszakára állni hagytuk. A kivonatot 4 °C-on, 19000-es fordulaton 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót ioncserélő tölteten (Waters, Milford, MA, USA) tovább tisztítottuk, majd UPLC-MS/MS (Micromass, Manchester, U.K) segítségével analizáltuk. A gibberellinek detektálásához szelektív ion-monitoring (multiple-reaction monitoring - MRM) módot alkalmaztunk, figyelve a prekursor ion [M-H]⁻ megfelelő ionná való átalakulását. A jelek feldolgozása Masslynx 4.1 szoftverrel (Waters, Milford, MA, USA) történt. A mikroalgákban lévő GS mennyiségi meghatározására a standard izotóphígítás módszerét alkalmaztuk.

Endogén abszcizinsav mennyiségi meghatározása

A minták ABA tartalmának vizsgálatát a Turečková et al. (2009) által leírt módszerrel végeztük. Kivonáskor a mintához 1 cm³ hideg metanol/víz/ecetsav 80/19/1 v/v/v arányú elegyét adtuk, amit 1 órán át állni hagytunk, majd centrifugáltunk (4 °C-on, 20000-es fordulaton, 10 percig) és a felülúszót leválasztottuk. A leülepedett mintára újra extrakciós elegyet tettünk, ismét 1 órát állni hagytuk, centrifugáltuk, majd a kapott felülúszókat egyesítettük. A kivonás ellenőrzésére és a meghatározás megerősítésére 20 pmol deutériummal jelzett ABA-t {[(+)-3',5',5',7',7',7'-²H₆-ABA] Prinsen et al. (1995) módszere szerint előállítva} adtunk a mintákhoz. A mintákat szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk Oasis® HLB tölteten (60 mg, 3 cm³, Waters, Milford, MA, USA). A mintákat bepároltuk, majd diazometános metilezéssel derivatizáltuk. Ezután a Hradecká et al. (2007) által leírtak alapján ABA-specifikus immunaffinitás kromatográfiás módszert alkalmaztunk. Az eluenst lepároltuk és UPLC-MS/MS –el (Micromass, Manchester, UK) vizsgáltuk. Az adatokat Masslynx 4.1 szoftverrel (Waters, Milford, MA, USA) értékeltük, az ABA mennyiséget standard izotóphígítás módszerrel állapítottuk meg.

Endogén brasszinoszteroidok mennyiségi meghatározása

A mikroalga minták brasszinoszteroid tartalmának vizsgálatát a Swaczynová et al. (2007) által leírt módszer alapján, annak kismértékű változtatásával végeztük. Fagyasztva tárolt és a vizsgálatok előtt kiolvasztott mikroalga szuszpenzióból 1 cm³ mintát 5 percig szonikáltunk, majd 80%-os metanol és 50 pmol [²H₆]BL, [²H₆]CS, [²H₃]24-*epi*BL és [²H₃]24-*epi*CS (OlChemIm, Olomouc, Cseh Köztársaság) belső standard hozzáadását követően egy éjszakát rázattuk. Centrifugálást követően a mintákat poliamid SP oszlopon (Supelco, Bellefonte, PA, USA) és polimer bázisú fordított fázisú oszlopon (Phenomenex, Torrance, CA, USA) tovább tisztítottuk, majd UPLC-MS/MS-sel (Micromass, Manchester, UK) analizáltuk. Az adatokat Masslynx 4.1 szoftverrel (Waters, Milford, MA, USA) értékeltük, a BR mennyiséget standard izotóphígítás módszerrel állapítottuk meg.

3.2.3. *Chlorella* tenyészetek szinkronizálása

A vizsgálatokhoz szükséges *Chlorella* tenyészetek szinkronizálásának a leírása a **2.2.4. alfejezetben** található. A módszer lényege a naponta történő hígítás és a megvilágítás hosszának megfelelő megválasztása (14:10 = fény:sötét).

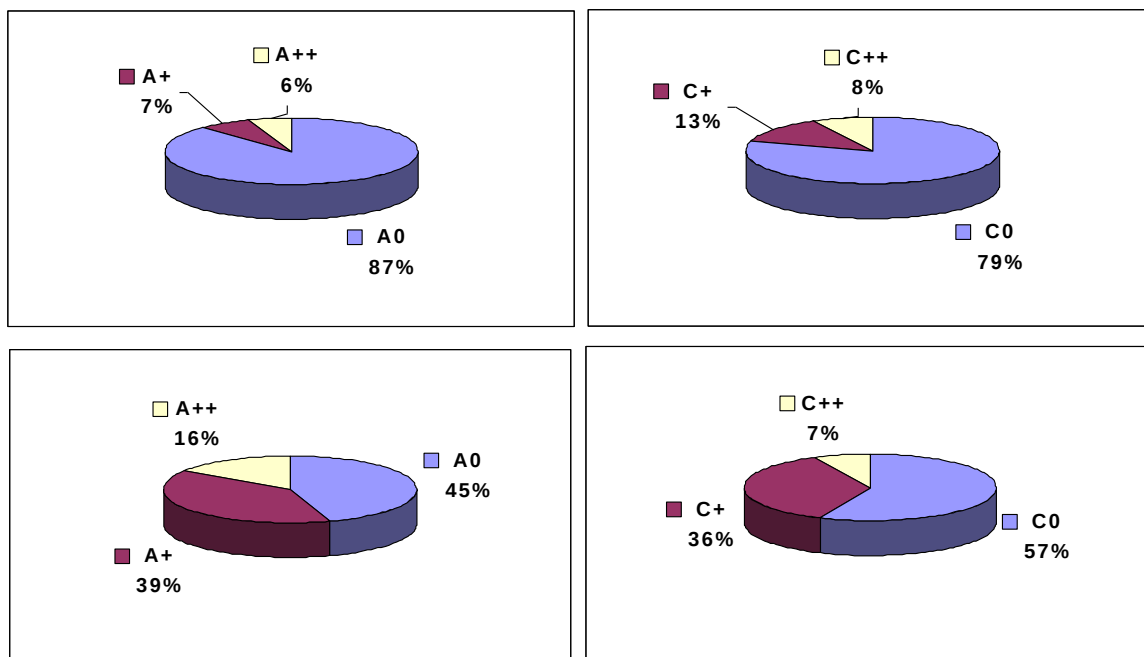
A kísérletnek megfelelő időpontokban a szinkron tenyészetekből gyűjtött minták egy részét Lugol oldattal fixáltuk. A fixált mintákban mértük a sejtszámot és a sejtek méretét, amit mikroszkópos vetületi képük nagyságában (µm²) adtuk meg. A mérésekhez Olympus BX60 mikroszkópot (Olympus Optical Co. Ltd., Tokio, Japán) és OLYMPUS Stream képelemző számítógépes programot (Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Németország) használtunk.

3.3. Eredmények**3.3.1. Mikroalgák hormonszerű hatásának a kimutatása biotesztekkel**

Az MACC összesen 553 mikroalga törzsének egyszeri algatenyészetéből a szaporodás stacioner szakaszában, délután 1 és 3 óra között gyűjtöttünk mintákat auxinszerű és citokininszerű hatás kimutatására. A mintákat centrifugáltuk, fagyasztva szárítottuk és mélyhűtőben tároltuk. A mintákat a biotesztek előtt desztillált vízben szuszpendáltuk, ultrahangos sejtroncsolóval feltártuk és uborka sziklevél tesztekkel vizsgáltuk. Közepesen auxinszerűnek tekintettük a biomassza minta hatását, ha az uborka sziklevél gyökérfejlődési tesztben mért hatása megegyezett 0,1-0,3 mg L⁻¹ IBA hatásával, és erősnek, ha 0,3 mg L⁻¹-nél nagyobb volt a minta hatása. A biomassza minták citokininszerű hatásának az értékelésénél az uborka megnyúlási teszt kinetinnel készített kalibrációs görbét vettük alapul az auxinszerű hatás értékelésénél említett koncentrációkkal. Az eredmények szerint (**3.1. ábra**) a cianobaktériumoknak 13%-a mutatott auxinszerű, 21%-a pedig citokininszerű hatást. Az eukarióta törzseknél ugyanez az arány 55% és 43% volt, vagyis a törzseknek közel a fele mutatott legalább gyenge hormonhatást. Erős auxinszerű hatást mutatott a cianobaktériumok

6%-a és az eukarióta algák 16%-a. Erősen citokininszerű hatása volt a vizsgált cianobaktériumok 8%-ának és az eukarióta algák 7%-ának.

Az előzetes vizsgálatok eredményei alapján 3 cianobaktérium és 7 Chlorophyta törzset választottunk ki a további bioteszt vizsgálatokhoz (**Melléklet M3.1. táblázat**). A kiválasztott törzsekkel megismételtük az uborka sziklevel bioteszteket. A 10 törzs vizes kivonatának mindegyike mutatott 0,1 és 0,3 mg L⁻¹ kinetinnel azonos citokinin-szerű hatást, viszont 3 törzsnél a korábbiakkal ellentétben nem találtunk auxinszerű hatást (Stirk et al. 2002). A 10 törzset mungóbab auxin bioteszttel és szója kallusz bioteszttel is vizsgáltuk. Ezekben a biotesztekben szerves oldószerrel készült kivonatokot használtunk. A mungóbab tesztben nagyon kicsi auxinszerű hatást mutatott mindegyik törzs (**3.1. táblázat**). A szója kallusz tesztel egyes frakciókban nagy citokinin-szerű hatást találtunk (**3.2. táblázat**). A legnagyobb hatást egy törzs kivételével (MACC-693) az R_f 0,5-0,7 frakcióban mértük, ami szabad bázisok (Z, DHZ) és ribozidok jelenlétére utal. Minden törzsnél a legkisebb hatást az R_f 0,1-0,4 frakció mutatta, ami a glükozid származékok hiányát jelzi. Két zöldalga törzsnél (MACC-519 és MACC-560) volt meggyőzően nagy az R_f 0,8-1,0 frakció, vagyis az izopentenil-származékok jelenléte. Ez a két törzs mutatott nagy vagy nagyon nagy hatást mindkét nagyobbik R_f frakcióban.



3.1. ábra: Uborka sziklevel gyökérfejlődési és megnyúlási tesztel kimutatott auxinszerű (A) és citokininszerű (C) hatás az MACC 232 cianobaktérium (felső ábrák) és az MACC 331 eukarióta alga (alsó ábrák) törzséből 2 g L⁻¹ koncentrációban.

A0, A+, ++: nincs, közepes és erős az auxinszerű hatás;

C0, C+, C++: nincs, közepes és erős a citokininszerű hatás.

3.1. táblázat: Három cianobaktérium és hét eukarióta algatörzs auxinszerű hatása mungóbab bioteszttel vizsgálva. Az auxinhatást a képződött gyökerek számával jellemeztük a törzsek biomasszájából készített két szerves oldószeres (etil-acetát) és egy vizes kivonat három hígításában. A kalibrációs görbéhez IBA-at használtunk különböző koncentrációkban. EA – pH 8: első etil-acetátos fázis, EA – pH 3: második etil-acetátos fázis. A táblázatban az átlagokat és szórás értékeket tüntettük fel (n = 10).

Törzsek	EA – pH 8			EA – pH 3			Vizes kivonat		
	100%	50%	17%	100%	50%	17%	100%	50%	17%
Cianobaktériumok									
MACC-403 <i>Calothrix</i> sp.	13,0±2,7	4,0±0,5	4,6±0,5	7,0±1,5	6,7±1,2	6,2±1,2	1,4±1,1	13,3±1,6	8,1±1,0
MACC-405 <i>Calothrix</i> sp.	6,5±0,9	7,8±1,5	4,9±0,4	4,6±0,5	4,5±0,3	4,4±0,3	2,3±1,3	10,0±1,8	7,6±2,2
MACC-302 <i>Phormidium animale</i>	12,5±4,6	8,5±1,1	4,3±1,0	9,3±2,7	7,0±1,9	5,3±0,7	0,0±0,0	5,7±1,1	4,3±0,8
Eukarióta algák									
MACC-519 <i>Chlorella</i> sp.	7,5±1,6	4,5±1,4	9,2±2,6	7,0±2,3	11,5±3,0	10,8±2,2	6,2±2,2	10,3±2,4	7,8±1,2
MACC-493 <i>Scenedesmus quadricauda</i>	11,0±2,4	7,8±0,6	6,7±1,0	9,0±1,1	7,2±1,1	7,5±1,3	4,2±2,3	10,7±2,7	9,3±2,1
MACC-534 <i>Coenochloris</i> sp.	6,8±1,1	5,2±1,0	4,5±1,0	5,5±0,7	6,8±1,4	6,7±1,4	0,0±0,0	6,0±1,3	10,8±2,9
MACC-560 <i>Chlorosarcina</i> sp.	6,8±1,8	10,0±1,3	9,2±1,0	6,7±1,9	7,3±1,5	6,5±1,5	0,8±0,8	10,0±3,5	9,8±0,8
MACC-479 <i>Tetracystis</i> sp.	7,7±1,5	4,8±0,9	7,0±1,2	7,0±0,8	8,7±1,4	4,5±0,7	7,2±3,1	7,3±0,9	7,7±2,2
MACC-460 <i>Chlamydomonas</i> sp.	9,8±2,5	6,5±1,1	6,7±1,2	11,0±3,8	6,5±1,2	10,0±2,2	0,0±0,0	16,8±4,5	9,7±3,7
MACC-693 <i>Chlamydomonas</i> sp.	9,3±1,1	8,8±2,0	7,5±1,2	10,3±2,7	7,8±1,1	7,7±1,1	3,0±2,1	9,7±1,2	11,3±2,1
IBA kalibrációs görbe	0 M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M			
	5,0±0,4	6,4±0,9	5,9±0,5	10,0±1,35	23,5±2,3	55,0±4,1			

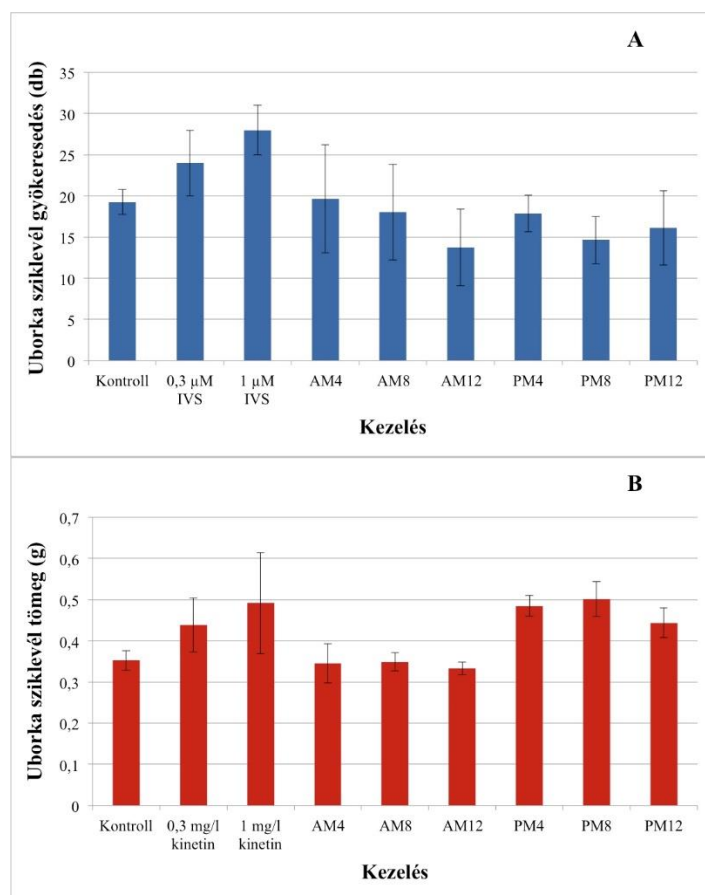
3.2. táblázat: Három cianobaktérium és hét eukarióta algatörzs citokininszerű hatása szójakallusz bioteszttel vizsgálva. A citokininhatást a képződő kalluszok tömegével jellemeztük (nagyon kicsi, kicsi, nagy, nagyon nagy) a törzsek biomasszájából készített szerves oldószeres kivonat három frakciójában (R_f). A kalibrációs görbe készítéséhez a kinetint használtuk.

Törzsek	R_f 0,1-0,4	R_f 0,5-0,7	R_f 0,8-1,0
Cianobaktériumok			
MACC-403 <i>Calothrix</i> sp.	nagyon kicsi	nagy	nagy
MACC-405 <i>Calothrix</i> sp.	kicsi	nagy	kicsi
MACC-302 <i>Phormidium animale</i>	nagyon kicsi	nagyon nagy	kicsi
Eukarióta algák			
MACC-519 <i>Chlorella</i> sp.	nagyon kicsi	nagyon nagy	nagy
MACC-493 <i>Scenedesmus quadricauda</i>	nagyon kicsi	nagyon nagy	nagyon kicsi
MACC-534 <i>Coenochloris</i> sp.	nagyon kicsi	nagyon nagy	nagyon kicsi
MACC-560 <i>Chlorosarcina</i> sp.	nagyon kicsi	nagyon nagy	nagy
MACC-479 <i>Tetracystis</i> sp.	nagyon kicsi	nagy	kicsi
MACC-460 <i>Chlamydomonas</i> sp.	nagyon kicsi	nagyon nagy	kicsi
MACC-693 <i>Chlamydomonas</i> sp.	nagyon kicsi	nagyon kicsi	nagyon kicsi

Az uborka sziklevel bioteszteket több alkalommal is elvégeztük néhány mikroalga törzssel, de a tenyészet korától függően eltérő auxin- vagy citokinin-szerű hatást mutattunk ki. Az MACC-43 *Arthronema africanum* cianobaktériummal ezért célirányos kísérleteket végeztünk. A kísérletben az MACC-43 törzs eltérő korú (4, 8 és 12 nap) és a nap két különböző időpontjában (reggel, délután) gyűjtött minták hormonszerű hatását vizsgáltuk az uborka sziklevel tesztekkel. Megállapítottuk, hogy auxinszerű hatást egy minta sem mutatott (**3.2. ábra**). A tenyészet korától függetlenül (4, 8 és 12 nap) a megvilágítás kezdetén (AM) egyik mintában sem tudtunk kimutatni citokininszerű hatást. Ezzel szemben a megvilágítás kezdetétől számított 8. órában (PM) gyűjtött minták mindegyikében jelentős volt a citokininszerű hatás, ami kihangsúlyozta a fény jelentőségét a citokininek termelésében.

3.3.2. Chlorophyta algatörzsek endogén hormontartalma

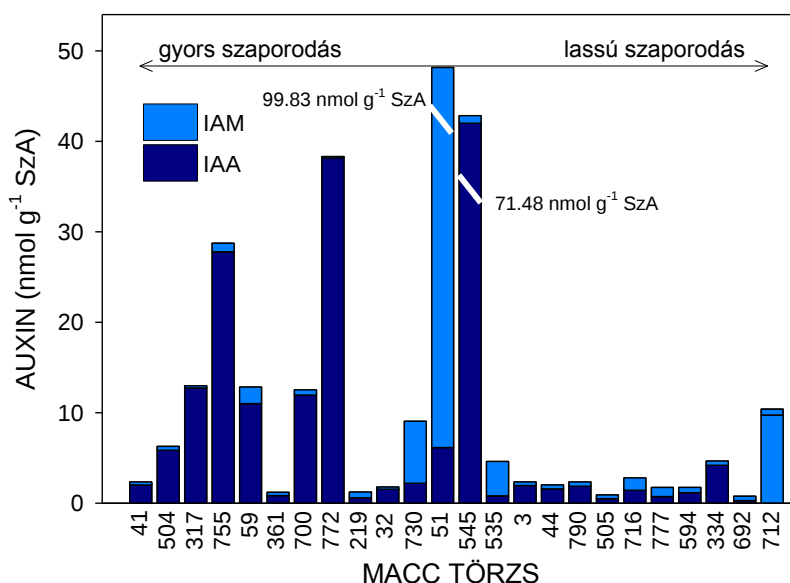
Endogén növényi hormonokat mértünk 24 axénikus mikroalga törzsben a Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae és Charophyceae osztályból (**Melléklet M3.2. táblázat**). Az algatörzseket 4 napig Bristol tápoldatban szaporítottuk. A tenyésztés kezdetén az algaszuszpenziók 10 mg L^{-1} sűrűségről indultak. A szaporodás gyorsaságára a szuszpenziók 4. napon mért szárazanyagtartalmából következtettünk (**Melléklet M3.2. táblázat**).



3.2. ábra: Az MACC-43 *Arthronema africanum* 4, 8 és 12 napos, délelőtt (AM) és délután (PM) gyűjtött szuszpenzióiban (2 g L⁻¹ szárazanyag) uborka sziklevel gyökeresedési és megnyúlási teszttel kimutatott auxin-szerű (A) és citokinin-szerű (B) hatás.

Auxinok

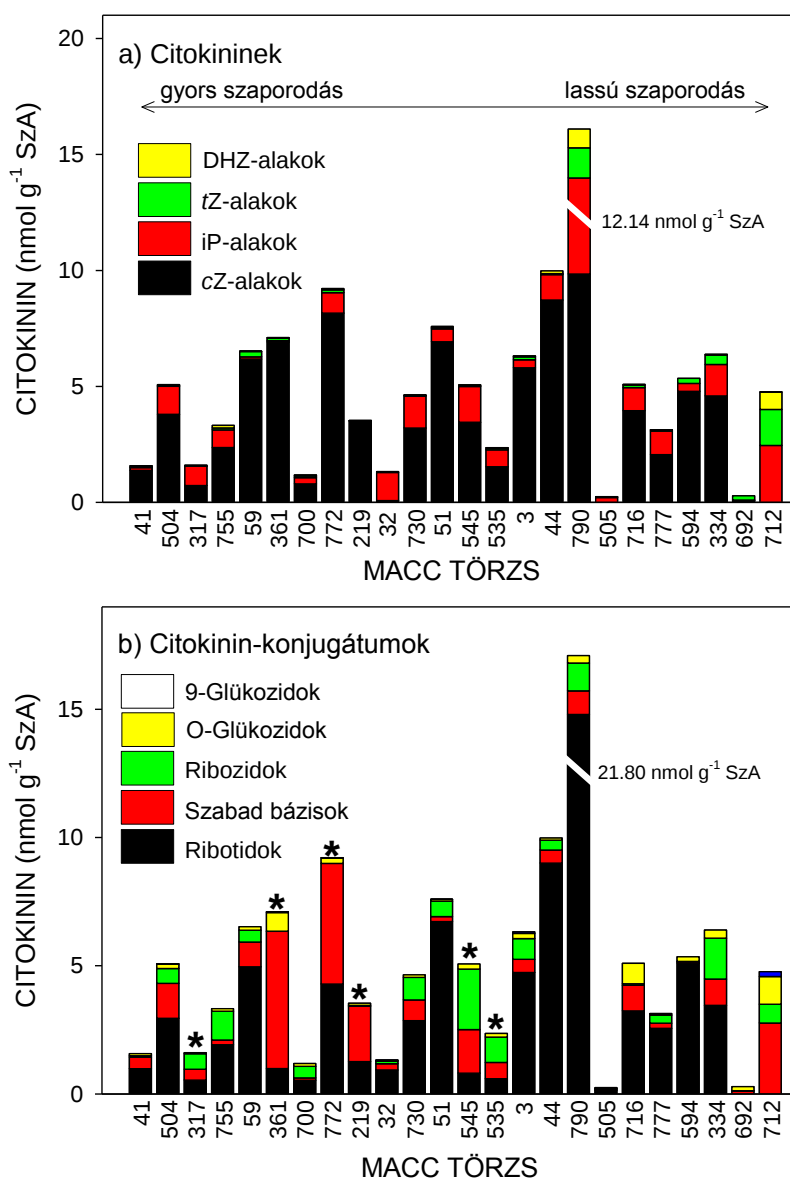
Két auxin alakot, IAA-t és az IAM-et mértünk mind a 24 mikroalgában (Stirk et al. 2013a). Egyéb auxin konjugátumot nem tudtunk kimutatni a mintákból. Az IAA és az IAM koncentrációja is jelentős eltéréseket mutatott a különböző törzsekben. Az IAA koncentrációja 0,50 és 71,49 nM IAA g⁻¹ szárazanyag, az IAM koncentrációja pedig 0,18 és 99,83 nM IAM g⁻¹ szárazanyag között változott (**3.3. ábra**). Tizenkilenc törzsben az IAA nagyobb, akár tízszer nagyobb koncentrációban volt jelen, mint az IAM. Néhány törzsben, pl. az MACC-772 *Chlamydomonas reinhardtii* törzsben az IAA nagyon nagy koncentrációban (közel 40 nM g⁻¹ szárazanyag) fordult elő, sőt az IAA:IAM aránya (214:1) is a legnagyobb volt. A törzsek egy része gyorsabban szaporodott, nagyobb biomasszát termelt a 4-napos tenyésztés ideje alatt és több volt benne az auxin (pl. MACC-772, 755, 317, 59 és MACC-700), míg a lassabban szaporodó törzsekben általában kisebb volt az auxinok koncentrációja (pl. MACC-535, 3, 44, 790, 505, 716, 777, 594, 334 és MACC-692). Kivételt jelentett az MACC-51 *Coelastrum microporum* és az MACC-545 *Poloidion didymos*, amelyek közepesen szaporodtak, de nagyon sok auxint tartalmaztak. Az MACC-41, 361, 219 és MACC-32 jól szaporodtak ugyan, de kicsi volt bennük az auxinok koncentrációja. Az MACC-712 törzs szaporodott a leggyengébben, mégis közepes mennyiségű auxint tartalmazott (**3.3. ábra**).



3.3. ábra: Huszonnégy eukarióta MACC algtörzs auxin tartalma 4 napos tenyésztés után. A leggyorsabban szaporodó törzs van az Y-tengelyhez legközelebb, a leglassabban szaporodó a legtávolabb.

Citokininek

A vizsgált MACC törzsekben összesen 19 citokinint mutattunk ki (Stirk et al. 2013a). Az összes citokinin tartalom két szélső értékét az MACC-692 *Klebsormidium flaccidum* ($0,29 \text{ nM g}^{-1} \text{ SzA}$) és az MACC-790 *Stigeoclonium nanum* ($21,40 \text{ nM g}^{-1} \text{ SzA}$) törzsekben mértük. A citokinin-alakoknál az általános tendencia az volt, hogy: (1) a cZ-alakok voltak jelen a legnagyobb koncentrációban (kivéve az MACC-790 *Stigeoclonium nanum* törzset); (2) az iP citokininek közepes koncentrációban voltak kimérhetők; (3) a tZ alakok kis koncentrációban voltak jelen; (4) a DHZ alakok egyáltalán nem vagy csupán nagyon kis koncentrációban voltak kimutathatók (**3.4. ábra**). A ribotidok, nevezetesen a tZRMP, cZRMP, iPRMP, valamint a citokinin szabad bázisok, úgymint a tZ, cZ, iP és DHZ alkották általában a citokinin konjugátumokat a vizsgált algtörzsekben. A ribozidok közül a tZR, cZR, iPR és a DHZR többnyire hasonló, közepes koncentrációban, az O-glükózid konjugátumok viszont kis koncentrációban fordultak elő a vizsgált törzsekben. Az egyetlen kimutatható N-glükózid a tZ9G volt, ami 9 törzsben és nagyon kis koncentrációban fordult elő (**3.4. ábra** és **Melléklet M3.3. táblázat**). A következő hat törzs eltérő citokinin összetételt mutatott, mert ezekben a szabad bázisok és a ribozidok nagyobb koncentrációban fordultak elő, mint a ribotidok: MACC-317 *Raphidocelis subcapitata*, MACC-361 *Chlorella minutissima*, MACC-772 *Chlamydomonas reinhardtii*, MACC-219 *Desmococcus olivaceus*, MACC-545 *Poloidion didymos* és MACC-535 *Coccomyxa* sp. (**3.4. ábra**). A felsorolt hat törzs az átlagosnál gyorsabban szaporodó törzsek közé tartozik.



3.4. ábra: Huszonnégy eukarióta MACC algatörzs citokinin tartalma 4-napos tenyésztés után: a) citokinin alakok és b) citokinin konjugátumok. A leggyorsabban szaporodó törzs van az Y-tengelyhez legközelebb, a leglassabban szaporodó a legtávolabb.

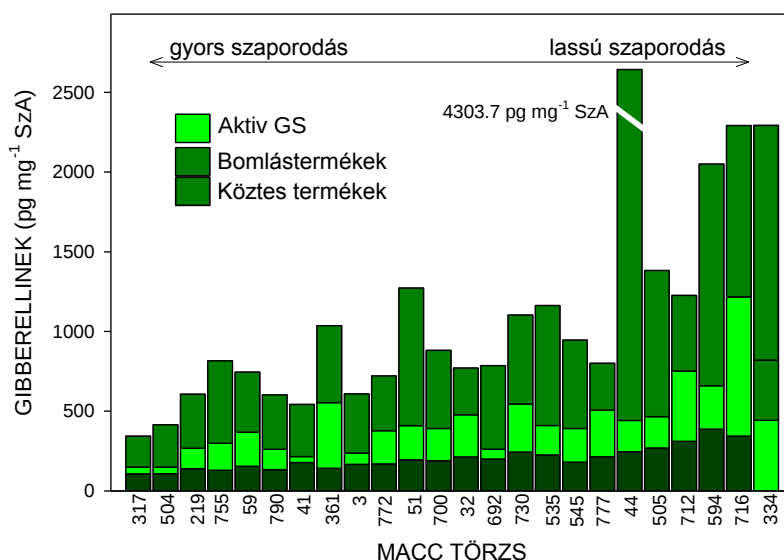
* = a jelölt törzsekben nem a ribotidok fordulnak elő a legnagyobb koncentrációban.

Gibberellinek

A 24 eukarióta MACC algatörzsben 18-20 különböző gibberellint mutattunk ki (Stirk et al. 2013b). Az összes gibberellin koncentrációja a legkisebb, 342,7 pg mg⁻¹ SZA volt az MACC-317 *Raphidocelis subcapitata* algatörzsben, a legnagyobb pedig, 4746,1 pg.mg⁻¹ SZA az MACC-44 *Scotiellopsis terrestris* algatörzsben. A szaporodás gyorsaságát jellemző végső biomassza és a törzsek gibberellin tartalma negatív összefüggést mutat (**3.5. ábra**). A lassan szaporodó algatörzsekben a legnagyobb a gibberellin tartalom, pl. MACC-44 *Scotiellopsis terrestris*, MACC-334 *Gyoerffyana humicola* és MACC-716 *Nautococcus mamillatus*. A

gyorsabban szaporodó algatörzsekben mutatkozott a legkisebb gibberellin koncentráció, pl. MACC-317 *Raphidocelis subcapitata* és MACC-504 *Coelastrum excentrica*.

A gibberellin összetétel minden törzsben hasonló volt kivéve a GS₁₂ és a GS_{12ald} jelenlétét/hiányát: (1) mindkettő nagy koncentrációban volt kimutatható 16 törzsben; (2) öt törzsben a GS₁₂ nagy koncentrációban volt jelen, míg a GS_{12ald} koncentrációja a kimutathatósági határ alatt maradt; (3) egy algatörzsben csupán a GS_{12ald} volt jelen nagy koncentrációban, míg a GS₁₂ a kimutathatósági határ alatt maradt; (4) két törzsben egyik sem volt a kimutathatósági határ felett (**Melléklet M3.4. táblázat**). A biológiailag aktív gibberellinek (GS₁, GS₃, GS₄, GS₅, GS₆ és GS₇) az összes GS 5-33%-át tették ki, az anyagcsere végtermékek (GS₁₃ és GS₅₁) a 7-40%-át, a köztes termékek adták a legnagyobb részét a gibberellineknek, a 36-91%-át (**3.5. ábra és Melléklet M3.4. táblázat**). A 24 algatörzs mindegyikében a biológiailag aktív gibberellinek közül a GS₆ koncentrációja volt a legnagyobb. Az intermedierek közül mindenütt a GS₁₅ és a GS₅₃ volt kiemelkedő. A magasabbrendű növények bioszintetikus végtermékei (GS₁₃ és GS₅₁) is viszonylag nagy mennyiségben fordultak elő a vizsgált algatörzsekben.

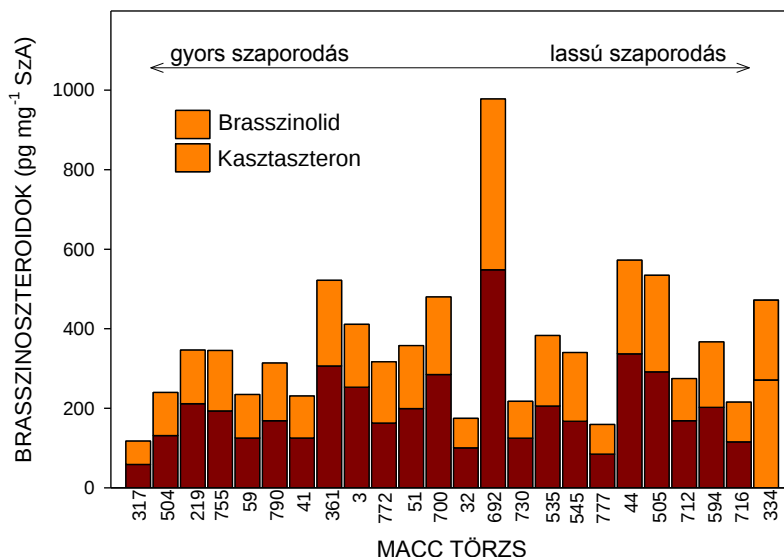


3.5. ábra: Huszonnégy eukarióta MACC algatörzs gibberellin tartalma 4-napos tenyésztés után. A leggyorsabban szaporodó törzs van az Y-tengelyhez legközelebb, a leglassabban szaporodó a legtávolabb.

Brasszinoszteroidok

Manapság tömegspektrometriára alapozott módszer áll rendelkezésre számos ismert brasszinoszteroid prekursor és bioszintetikus termék kis mennyiségű mintából történő kimutatására. A módszerrel a két leggyakoribb brasszinoszteroidot, a BL-t és a CS sikerült kimutatni a 24 vizsgált MACC algatörzsben (Stirk et al. 2013b). Általában a BL nagyobb koncentrációban fordult elő mint a CS, bár van néhány kivétel, ahol a kettő koncentrációja hasonló, pl. MACC-545 *Poloidon didymos* és MACC-317 *Raphidocelis subcapitata* (**3.6. ábra**). Az összes brasszinoszteroid koncentrációja törzsenként változó volt: (1) a legkisebb

koncentrációt az MACC-317 *Raphidocelis subcapitata* (117,3 pg mg⁻¹ SzA) mértük, míg ennek mintegy nyolcszorosa fordult elő az MACC-692 *Klebsormidium flaccidum* (977,8 pg mg⁻¹ SzA) törzsben (3.6. ábra).



3.6. ábra: Huszonnégy eukarióta MACC algatörzs brasszinoszteroid tartalma 4-napos tenyésztés után. A leggyorsabban szaporodó törzs van az Y-tengelyhez legközelebb, a leglassabban szaporodó a legtávolabb.

Abszcizinsav

Nem volt kimutatható abszcizinsav a vizsgált 24 MACC algatörzsben.

3.3.3. A *Chlorella minutissima* sejtciklustól függő hormontermelése

Az MACC-360 *Chlorella minutissima* Tamiya tápoldatban szaporított axénikus tenyészetét a 2.2.4. és 3.2.3. alfejezetekben leírt módon szinkronizáltuk. A kísérletben három kezelést alkalmaztunk: (1) a kontroll tenyészeteket fény:sötét (L:D) körülmények között tartottuk; (2) a tenyészeteket folyamatosan sötétben tartottuk (CD); (3) a folyamatosan sötétben tartott tenyészetekhez az első sötét szakasz végének megfelelő időpontban (10. óra) 5 g L⁻¹ glükóztadtunk (CD+G). A 48 órán át tartó kísérletben kezelésenként 3-3 lombikban lévő alga szuszpenziót öntöttünk össze egy mintává 10, 15, 24, 34 és 48 órával a kísérlet megkezdése után. A mintavételi időpontok a szinkronizáció első sötét szakaszának a végét (10. óra), az első fényszakasz 5. óráját (15. óra), az első fényszakasz végét (24. óra), a második sötétszakasz végét (34. óra), és a második fényszakasz végét (48. óra) jelentették. A mintákból kis mennyiséget félretettünk a szárazanyag tartalom mérésére, valamint a sejtszám és a sejtméret meghatározására. A maradék mintából történt a növényi hormonok vizsgálata.

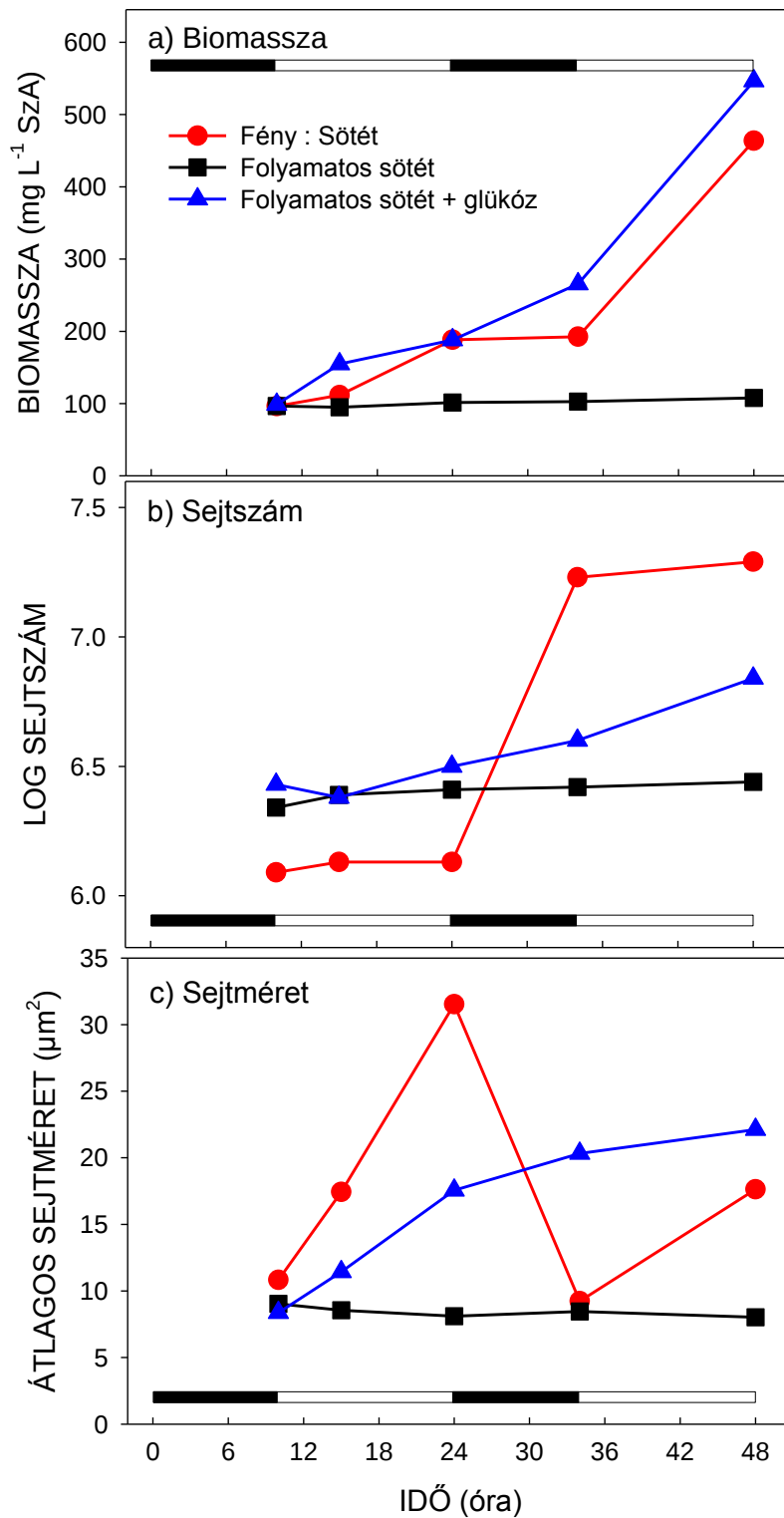
Szaporodás eltérő tenyésztési körülmények között

A fény:sötét (LD) körülmények között a tenyészetek biomasszája a két fényszakaszban növekedett, a másodikban (38-48 óra) jelentősebben (**3.7. ábra**). A tenyészet megfelelő szinkronizációját jelzi, hogy a sötét szakaszban jelentősen növekedett a sejtszám és csökkent a sejtméret a tenyészetben (24-34. óra). A két fényszakaszban (10-24 és 34-48. óra) viszont a fotoszintézis következtében jelentősen növekedett a sejtméret, de elhanyagolható volt a sejtszám növekedés (**3.7. ábra**).

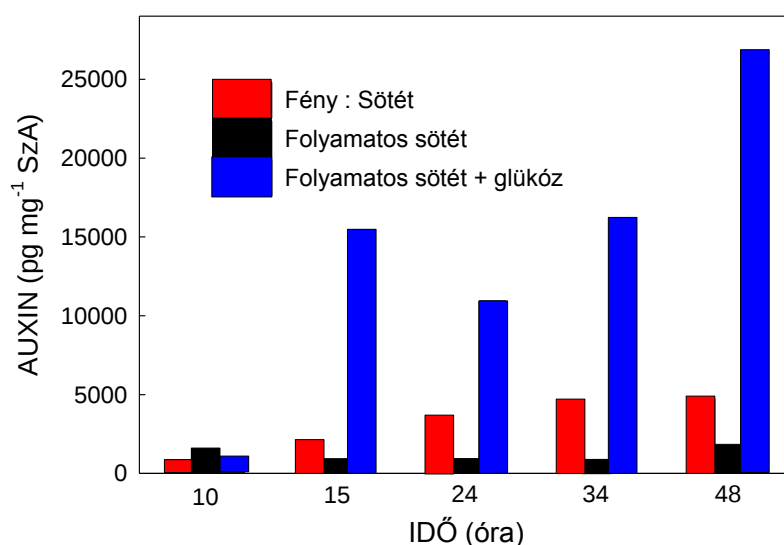
A folyamatosan sötétben (CD) tartott tenyészetek biomasszája a 10. órától kezdve egyáltalán nem nőtt (**3.7. ábra**). A tenyészetek egyáltalán nem osztódtak, amit az állandó sejtszám egyértelműen igazol (**3.7. ábra**). A sejtek aprók ($10\ \mu\text{m}^2$ alatt) voltak, sőt az átlagos sejtméretük kissé csökkent a kísérleti időszak végére (**3.7c ábra**). A heterotróf tenyészetekben (CD+G) a biomassza folyamatosan nőtt és a kezelések közül a legnagyobb lett a 48-órás kísérlet végére (**3.7. ábra**). A CD+G tenyészetek már nem voltak szinkronizáltak, a sejtszámok folyamatosan növekedtek (**3.7. ábra**). Jóllehet kevesebb sejt osztódott, mint az L:D kezelésnél, amit a kisebb sejtszámok mutatnak, de az átlagos sejtméret folyamatosan növekedett (**3.7. ábra**). A 48. órára az átlagos sejtméret meghaladta a $20\ \mu\text{m}^2$ értéket, ami összhangban van az L:D kezelést meghaladó biomassza tömeggel (**3.7. ábra**; Stirk et al. 2014b).

Auxinok

Az összes indol tartalom (beleértve az indol prekursorokat is) egyenletesen alacsony maradt a folyamatosan sötétben tartott tenyészeteknél, de a kísérleti idő során növekedett az L:D és a CD+G kezeléseknél. A legnagyobb növekedés a CD+G kezelésnél volt kimérhető, ami elérte az L:D kezelés hétszeresét (**3.8. ábra**). A biológiailag aktív auxin (szabad IAA) minden tenyészetben viszonylag kis koncentrációban volt jelen, az összes indol készlet kevesebb, mint 7%-át tette ki. Az IAA koncentráció kezdetben meglehetősen állandó maradt, majd a 34. órára kis csúcsot mutatott az L:D és CD kezeléseknél. Ezzel ellentétben a CD+G tenyészetek hatszoros IAA koncentrációt értek el a 48. órára (**Melléklet M3.5. táblázat**). A TRP prekuzora az ANT elég nagy koncentrációban volt kimutatható minden kezelésben, leginkább a CD+G kezelésben. Az ANT koncentrációja növekedett az első 34 órában, aztán hirtelen csökkent a 48. órára. A TRP és az IAA prekuzor IAM fordult elő a legnagyobb koncentrációban, ami idővel nőtt az L:D és CD+G tenyészetekben, de csökkent a CD tenyészetekben. A TRP és az IAM együttes koncentrációja hétszer volt nagyobb a CD+G tenyészetekben, mint az L:D-ben (**Melléklet M3.5 táblázat**). Az IAA másik prekuzora, a TRA kis koncentrációban volt jelen, de idővel nőtt az L:D és CD+G tenyészetekben, míg kicsi maradt a CD kezelésben. Az oxIAA és az IAAsp bomlástermékek kimutathatók voltak, amiből az oxIAA volt jelen nagyobb koncentrációban minden kezelésben és idővel még tovább nőtt. Az IAAsp csupán a CD+G néhány mintájából volt kimutatható (**Melléklet M3.5. táblázat**).



3.7. ábra: Az MACC-360 *Chlorella minutissima* fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények között inkubált tenyészeinek szaporodását a kísérlet 48 órája alatt jellemző paraméterek: a) biomassza mennyisége, b) a sejtszám logaritmusa, c) átlagos sejtméret.



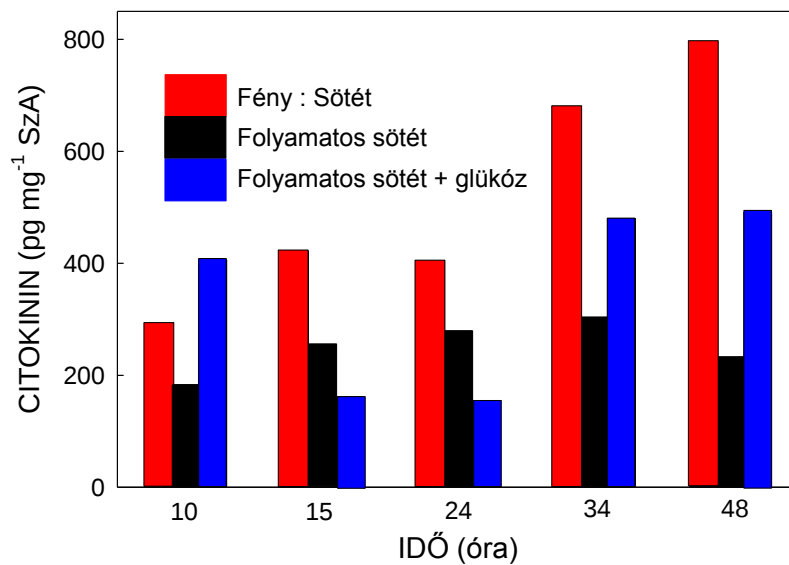
3.8. ábra: Az MACC-360 *Chlorella minutissima* fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények között inkubált tenyészeinek biomasszájából kimutatható összes indol és indol prekursor időbeni változása. (fényszakaszok: 10-24 és 34-48 óra)

Citokininek

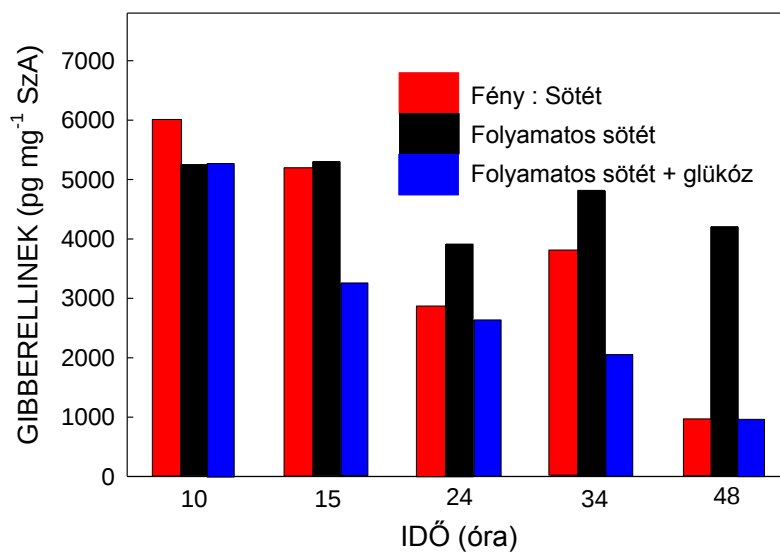
Az összes citokinin koncentráció a legnagyobb az L:D tenyészetekben volt, ami növekedett a kísérleti időszak alatt. A folyamatosan sötétben tartott tenyészetekben (CD) állandó és közepesen nagy maradt a citokininek koncentrációja. A CD+G tenyészetekben kezdetben, a 10. órától a 24. óráig csökkent a citokininek koncentrációja, majd 24-től 48-ig nőtt (**3.9. ábra**). A citokininek közül minden tenyészetben a *cZ* és *iP* alakok domináltak és kicsi volt a *tZ* és a *DHZ* alakok koncentrációja (**Melléklet M3.6. táblázat**). A citokinin tartalom növekedése leginkább a *cZ*, *cZOG* és a *cZRMP* növekedésének volt köszönhető, a 24. órát követően pedig az *iP* növekedésének. Az aktív szabad bázisok az összes citokinin 20%-át tették ki.

Gibberellinek

Az összes gibberellin koncentrációja minden kezelésnél csökkent a kísérleti időszak alatt, leszámítva a kis növekedést a 24. és 34. óra között (ez az L:D kezelés sötét szakasza) az L:D és CD+G kezeléseknél. A 48. órára az összes gibberellin tartalom sokkal kisebb volt az aktívan szaporodó tenyészetekben (L:D és CD+G), mint a nem szaporodó CD kezelés tenészeiben (**3.10. ábra**). A *C. minutissima* tenyészetekben 20 gibberellint mutattunk ki. A GS_{12ald} és a GS₁₂, a gibberellin bioszintézis első alakjait találtuk a legnagyobb koncentrációban a mintákban. Az inaktív végtermékek, a GS₅₁ és GS₁₃ szintén viszonylag nagy koncentrációban voltak jelen (**Melléklet M3.7. táblázat**). A biológiailag aktív gibberellinek (GS₁, GS₃, GS₄, GS₅, GS₆ és GS₇) koncentrációja az idővel csökkent és 14-27%-át tették ki az összes gibberellineknek. A biológiailag aktív gibberellinek közül a GS₆ volt kimérhető a legnagyobb koncentrációban (**Melléklet M3.7. táblázat**).



3.9. ábra: Az MACC-360 *Chlorella minutissima* fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények között inkubált tenyészeinek biomasszájából kimutatható összes citokinin időbeni változása. (fényszakaszok: 10-24 és 34-48 óra)

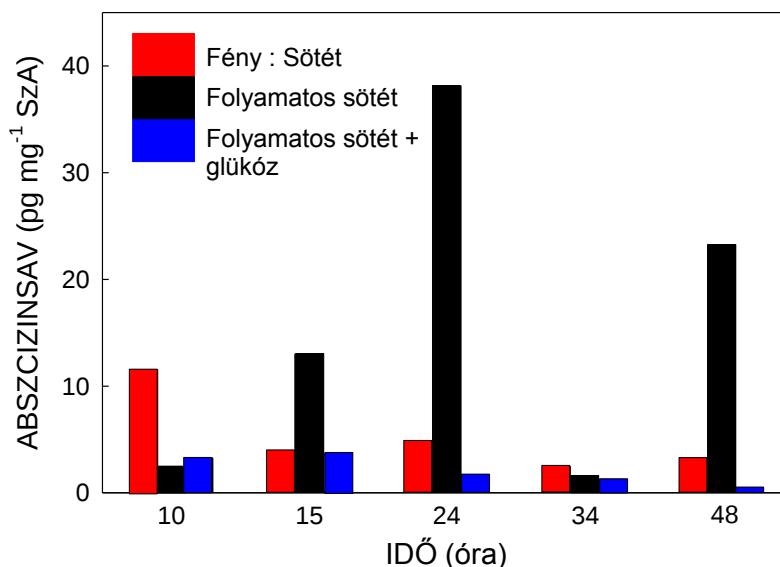


3.10. ábra: Az MACC-360 *Chlorella minutissima* fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények között inkubált tenyészeinek biomasszájából kimutatható összes gibberellin időbeni változása. (fényszakaszok: 10-24 és 34-48 óra)

Abszcizinsav

Nagyon kis ABA koncentrációkat tudtunk kimutatni, az ABA anyagcsere termékek pedig a kimutathatósági határérték alatt maradtak. Az aktívan szaporodó tenyészetekben (L:D és

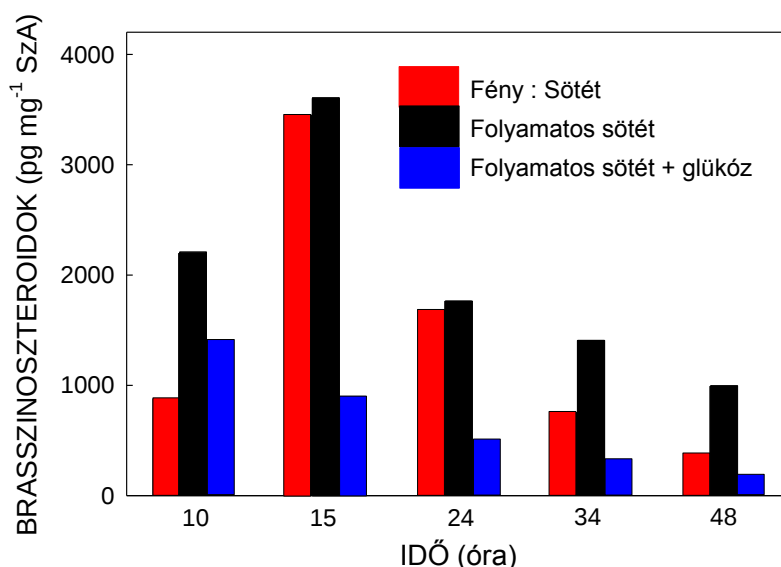
CD+G) a kis ABA koncentráció tovább csökkent a kísérlet ideje alatt, míg nagy (15-ször nagyobb) és ingadozó volt az ABA koncentráció a CD tenyészetekben (**3.11. ábra**).



3.11. ábra: Az MACC-360 *Chlorella minutissima* fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények között inkubált tenyészeinek biomasszájából kimutatható ABA tartalom időbeni változása. (fényszakaszok: 10-24 és 34-48 óra)

Brassinoszteroidok

A *C.minutissima* tenyészetekben három brassinoszteroidot tudtunk kimutatni, amelyek közül mindig a 6-deoxo-*epiCS* volt jelen a legnagyobb koncentrációban, amit a 6-oxoCN követett és a legkisebb koncentrációban fordult elő a CT (**Melléklet M3.8. táblázat**). Az L:D és CD kezelésekben az összes endogén brassinoszteroid tartalom a kezdeti 10-15-órán növekedett, majd ezt követően folyamatosan csökkent. A CD+G kezelésben a brassinoszteroid tartalom az egész kísérleti idő alatt csökkent (**3.12. ábra**). A minimális biomassza növekedést mutató CD tenyészetekben volt a leglassúbb az ABA koncentráció csökkenése, míg a leggyorsabban szaporodó CD+G kezelésben a leggyorsabban csökkent az endogén brassinoszteroid koncentrációja (**3.12. ábra**).



3.12. ábra: Az MACC-360 *Chlorella minutissima* fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények között inkubált tenyészeinek biomasszájából kimutatható brasszinoszteroid tartalom időbeni változása. (fényszakaszok: 10-24 és 34-48 óra)

3.4. Eredmények megvitatása

3.4.1. Növényi hormonok a mikroalgákban

Biotesztekkel mért biológiai hatás

Az uborka sziklevéllel végzett biotesztek eredményei a cianobaktériumokban kevésbé, de az eukarióta algákban egyértelműen mutatták az auxin- és a citokininszerű hatást. A bizonytalanságot az jelentette, hogy a bioteszt eredmények általában nem voltak megismételhetők. A hormonhatás a tenyészet korától, így minden bizonnyal a sejtek élettani állapotától függött. Ez felvetette azt a kérdést, hogy a hormontermelés sejtciklushoz kötött-e, vagy egyéb más tényezők befolyásolják az adott tenyészetben a hormonszerű hatást? A kérdésfelvetés vezetett a szinkrontenyészetekkel végzett hormonkísérletekhez. Az MACC-43 *Arthronema africanum* aszinkron tenyészetében a fény jelentősége bizonyult fontosnak a citokininszerű hatás kialakulásában (**3.2. ábra**). A fény és a sejtciklus szerepének a tanulmányozását ezért tartottuk indokoltnak.

A növényi hormonok kimutatása mikroalgákban is biotesztekkel kezdődött. A műszeres analitikai módszerek fejlődése csupán a legutóbbi évtizedekben tette lehetővé növényi hormonok mennyiségi kimutatását egyre kisebb tömegű mintákból. Mára változatos hormonösszetételt és különböző koncentrációkat magában foglaló hosszú listák állnak vagy állhatnak rendelkezésünkre egyes mikroalgák növényi hormontartalmának a jellemzésére. A listák azonban nem adnak választ a biológiai hatásra, a különböző hormonok együttes hatásának az értékelésére. Ha tisztán, vagy tisztábban akarunk látni e tekintetben, akkor ismét vissza kell

térnünk a biotesztekhez. Az értékes kémiai elemzések csupán a jól megválasztott biotesztekkel együtt igazán értékesek az alap kutatás és a gyakorlat számára egyaránt.

Auxinok

Az IAA a biológiailag legaktívabb auxin, aminek élettani hatása a sejtosztódással és sejtmegnyúlással áll kapcsolatban (Perrot-Rechenmann 2010). Gyakran válaszol a fényre, amit Charles Darwin fototropizmussal kapcsolatos korai kísérleteiben koleoptilokkal már bemutatott. IAA-t a 24 vizsgált eukarióta alga törzs mindegyikében ki tudunk mutatni, bár törzsenként változó koncentrációban. Kimérhető volt IAA a *C.minutissima* különböző megvilágítási körülmények között szaporodó szinkron tenyészeiben is. Az auxin koncentrációt befolyásolta a fény. Az aktívan szaporodó L:D tenyészetekben az auxin koncentráció a kísérleti idő alatt növekedett, míg csekély maradt a folyamatosan sötétben tartott (CD) tenyészetekben.

A biológiailag aktív szabad IAA koncentrációját a bioszintézis mértéke, a tárolt konjugátumokká történő átalakulása és a lebomlás szabályozza. A magasabbrendű növényekben számos IAA bioszintetikus anyagcsere út van, amely néhány triptofántól függő és egy triptofántól független utat foglal magában (Murphy 2002, Lee et al. 2004, Woodward & Bartel 2005). TRP-t és annak prekursorát, ANT-t tudtuk kimutatni a *C.minutissima* szinkrontenyészeiben. Mindez bizonyíték lehet arra, hogy a TRP-függő bioszintézis út a *C.minutissima*-ban is működhet. Ugyanakkor nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a TRP egy sor más bioszintetikus útnak is a prekursora, úgymint magasabbrendű növények védekezésére szolgáló vegyületeknek és fehérjéknek (Sairanen et al. 2012). Így a TRP jelenléte önmagában nem elég bizonyíték arra, hogy a TRP-függő IAA szintézis út a *C.minutissima*-ban is létezik.

Az IAM volt az egyetlen másik indol konjugátum, amit a 24 eukarióta alga törzsben kimutattunk. Mások hét *Chlorella* törzsben szintén IAA és IAM jelenlétét írták le (Jirásková et al. 2009). Ez arra utal, hogy az IAA az IAM bioszintetikus úton képződik a mikroalgákban. Ugyanakkor hét mikroalga törzs (benne két *Chlorella* faj) genomjának a vizsgálata során nem találták meg annak a két baktérium enzimnek az ortológját, amely részt vesz az IAM szintetikus útnak, bár más fehérjéket megtaláltak, amelyek a triptofán és az auxin bioszintéziséhez szükségesek (De Smet et al. 2011). A rendelkezésre álló Genbank és NCBI adatok összehasonlítása az ismert génekkel, amelyek részt vesznek a különböző auxin bioszintetikus utakban azt valószínűsítik, hogy az IAA bioszintetikus út az algákban a TRA úton át vezet (Kiseleva et al. 2012), ami szintén eléggé elterjedt IAA bioszintetikus út a magasabbrendű növényekben (Lehmann et al. 2010). Ezzel összhangban, kis koncentrációban ugyan, de mi is ki tudunk mutatni TRA-t a szinkronizált *C.minutissima* tenyészetekben, vagyis ez is egy lehetséges IAA bioszintetikus út a mikroalgákban. A fenti ellentmondást a belső auxin összetétel és az auxin bioszintetikus út molekuláris bizonyítékai között fel kell oldani ahhoz, hogy megértsük az auxinok szerepét a mikroalgák növekedésében.

A magasabbrendű növényekben a felesleges IAA konjugátumokká alakul át, nevezetesen cukrokhoz kötődve IAA észterekké, vagy aminosavakhoz és peptidokhoz kapcsolódva IAA-amidokká. Az inaktiválás két úton megy végbe: (1) irreverzibilis konjugátumok keletkeznek aszparaginsavval és glutaminsavval, IAAsp és IAAGlu; vagy (2)

nem dekarboxilező úton az indol gyűrű oxidációja következik be, 2-oxindol-3-ecetsav (oxIAA; Ludwig-Müller 2011). A magasabbrendű növényektől eltérően, ahol a legtöbb auxin konjugált alakban található (Sztein et al. 1999), az IAM volt az egyetlen konjugátum, amit a 24 eukarióta mikroalgában ki tudtunk mutatni, de hét *Chlorella* törzsben mások is ugyanezt találták (Jirásková et al. 2009). A szinkronizált *C.minutissima* tenyészetekben is csupán IAM-et találtunk, ill. még két bomlásterméket: (1) oxIAA volt minden mintában; (2) kis koncentrációban IAAsp-t találtunk a CD+G mintákban. Mindez azt jelzi, hogy a *C.minutissima* törzsben nem a konjugáció, hanem inkább a folyamatos lebomlás szabályozza az aktív IAA koncentrációját.

Citokininek

A természetben a citokininek nagy változatosságban fordulnak elő az izoprenoid alakoktól kezdve, pl. iP, tZ, cZ DHZ és származékaik, az aromás alakokig, pl. a benziladenin (BA), topolinok és ezek származékai. A magasabbrendű növényekben a citokininek összetétele fajtól, szövettípustól és a növény fejlődési állapotától függ (Sakakibara 2006). Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a citokinin összetétel különbözősége mellett a citokininek aránya meglehetősen állandó volt a vizsgált 24 eukarióta algatörzsben. A csökkenő koncentráció szerint a következő sorrendbe lehet állítani a citokinin-alakokat: cZ > iP > tZ > DHZ (Stirk et al. 2013a; Stirk et al. 2014b). Ugyanez érvényes hét *Chlorella* törzsre (Jirásková et al. 2009) és az általunk vizsgált *Protococcus*, *Chlorella* és *Scenedesmus* törzsekre is (Ördög et al. 2004). Aromás citokinin alakokat (BA és topolinok) szintén kimutattunk néhány eukarióta algában (Ördög et al. 2004).

A magasabbrendű növényekben a biológiailag aktív citokininek (szabad bázisok és ribozidok) koncentrációját a *de novo* bioszintézis mértéke szabályozza. A ribotidok az első köztes termékek, az O-glükozidok a tartalék alakok az N-glükozidok pedig a deaktivált alakok (Sakakibara 2006). A ribotidok, az első bioszintetikus köztes termékek fordultak elő a legnagyobb koncentrációban a vizsgált algatörzsekben. Az O-glükozidok koncentrációja a középestől a kis értékig változott a tenyészet korától függően. A szaporodás stacioner szakaszában lévő tenyészetekben nagyobb volt az O-glükozidok koncentrációja (Ördög et al. 2004), mint a 4-napos aktívan szaporodó 24 vizsgált algatörzsben (Stirk et al. 2013a; Stirk et al. 2014b). N-glükozidot mások nem találtak mikroalgákban, saját vizsgálatainkban is csupán nagyon kis koncentrációban és néhány törzsben tudtunk kimérni. A mikroalgák citokinin összetételét tekintve úgy tűnik, hogy az aktív citokininek koncentrációját főleg a *de novo* szintézis szabályozza, tekintve, hogy: (1) a legtöbb vizsgált mikroalgában a ribotidok szintje viszonylag nagy; (2) előfordulnak inaktív konjugátumok (O-glükozidok); nincs N-glükoziddá történő lebomlás.

A citokinineknek kulcsfontosságú szerepe van (az auxinokkal együtt) a sejtosztódás szabályozásában. A citokinin koncentráció csúcsa a G1 szakaszban és az S-szakasz végén, valamint a mitózis alatt van (Kieber 2002). A szinkronizált aktívan szaporodó *Chlorella* tenyészetekben (L:D és CD+G) a citokininek koncentrációja a kísérleti idő alatt növekedett, de csekély maradt a folyamatosan sötétben tartott (CD) tenyészetekben (Stirk et al. 2014b). Ez arra utal, hogy szükség van citokininekre a mikroalgák szaporodásához, de ez még további vizsgálatokat igényel.

Gibberellinek

Már több mint 100 endogén gibberellint írtak le a magasabbrendű növényekből, de csupán egy közlemény jelent meg mikroalgákban biotesztekkel kimutatott gibberellin-szerű hatásról (Tarakhovskaya et al. 2007). Az általunk vizsgált 24 axénikus eukarióta algatörzsben (Stirk et al. 2013b) és a *C.minutissima* szinkronizált tenyészetében (Stirk et al. 2014b) talált 18-20 gibberellin az első közlemények a mikroalgákról. A vizsgált algákban a gibberellin összetétel hasonló volt kivéve a GS_{12ald} és GS₁₂ jelenlétét vagy hiányát néhány törzsben. Nyilvánvaló összefüggést találtunk a 4 nap alatt termelt biomasszával jellemzett szaporodás és a gibberellin tartalom között. A lassabban szaporodó törzsekben több, a gyorsabban szaporodókban pedig kevesebb endogén gibberellin volt (Stirk et al. 2014b). A *C.minutissima* úgy tűnik felhasználja a gibberellineket, amelyek koncentrációja idővel csökken az aktívan szaporodó tenyészetekben (L:D és CD+G), de csak lassan csökken a CD tenyészetekben, amelyek gyakorlatilag nem szaporodnak.

A magasabbrendű növényekben a terpének prekursora, a geranilgeranil-difoszfát a kloroplasztiszban köztes terméké, *ent*-kaurenné alakul. Az *ent*-kauren a GS_{12ald}-on keresztül GS₁₂-vé és annak hidroxilált analógjává GS₅₃-má oxidálódik. Az oxidációt két citokróm P450 monooxygenáz katalizálja: (1) a kloroplasztisz külső membránján lévő *ent*-kauren oxidáz; és (2) az endoplazmatikus retikulumban található *ent*-kaurenoinsav hidroxiláz (Halliwell et al. 2001). Ez azután a citoplazmába szállítódik, ahol két fő és néhány mellékúton tovább oxidálódik bioaktív gibberellinekké (Yamaguchi 2008). A magasabbrendű növényekben a biológiailag aktív fő alakok rendszerint a GS₁ és a GS₄. Vizsgálatainkban a mikroalgák esetében a GS₆ volt a legnagyobb koncentrációban kimutatható biológiailag aktív alak (Stirk et al. 2013b, Stirk et al. 2014b). A magasabbrendű növényekben a GS₆ a GS_{30x} bioszintetikus úton képződik a GS₂₀-nál történő leágazással a GS₅-ön át (Urbanová 2013). A mikroalgákban kimutatott gibberellin köztes termékeket figyelembe véve elképzelhető, hogy a mikroalgákban is ez az út működik. Ezt a következtetést támasztják alá a fehérje szekvenciákra és homológ enzimekre vonatkozó elérhető Genbank és NCBI adatok, amelyek azt jelzik, hogy a gibberellin bioszintézis utolsó lépései az algákban hasonlóak lehetnek, mint a magasabbrendű növényekben (Kiseleva et al. 2012). A magasabbrendű növények dezaktiválási anyagcsere termékei közül az algákban a GS₅₁ és a GS₁₃ volt kimutatható (Stirk et al. 2013b, Stirk et al. 2014b).

Abszcizinsav

Abszcizinsavat a 24 vizsgált algatörzsben nem tudtunk kimutatni. Az ABA időben csökkenő koncentrációban volt viszont jelen a szinkronizált *C.minutissima* aktívan szaporodó tenyészeiben (Stirk et al. 2014b). Az endogén ABA hasonlóan csökkent a *Scenedesmus acutus* tenyészet korának az előrehaladtával (Pouneva 2006); kezdetben növekedett a sótoleráns *Dunaliella* a szaporodás logaritmikus szaporodási szakaszának az elején, majd ezután gyorsan nagyon kis koncentrációra csökkent (Tominaga et al. 1993). Ez azt sugallja, hogy a mikroalgákban az ABA viszonylag kis koncentrációban fordul elő más növényi hormonokhoz viszonyítva.

Az ABA a magasabbrendű növényekben elsősorban stresszhormonként hat. Számos reakcióban vesz részt, ami védi a növényt az abiotikus stressztől. Közlemények jelentek meg hasonló válaszokról algákban is (**3.1.2. alfejezet**). A szinkronizált *C.minutissima* tenyészetek közül a CD tenyészetben a 10-24. órában tizenötszörösére nőtt az ABA koncentrációja és változóan nagy maradt a kísérlet során (Stirk et al. 2014b). Az eredmények azt sugallják, hogy az ABA felhalmozódását stressz körülmények okozták és az ABA bioszintézishez nincs szükség fényre. Mások is megállapították, hogy a *Scenedesmus acutus* szinkron tenyészetében az ABA bioszintézis a sötét szakaszban következett be. Az endogén ABA koncentrációja a fényszakasz végére volt a legkisebb és növekedett a sötét szakasz folyamán (Pouneva 2006).

Az eredményekre alapozva megállapítható, hogy az ABA úgy tűnik hasonló szerepet lát el a mikroalgákban, mint a magasabbrendű növényekben, a koncentrációja stresszhelyzetben növekszik.

Brasszinoszteroidok

A 24 eukarióta alga 4-napos tenyészetében két brasszinoszteroidot (BL és CS) mutattunk ki (Stirk et al. 2013b), amelyek közül nagyobb koncentrációban általában a biológiailag aktívabb BL (Bajguz & Czerpak 1998) volt kimutatható. A vizsgált zöldalgák változatos taxonómiai helye jelzi milyen széleskörűen elterjedtek a brasszinoszteroidok a mikroalgákban. A törzsek szaporodása és brasszinoszteroid tartalma között összefüggést nem találtunk. A *C.minutissima* szinkron tenyészetében három brasszinoszteroidot mutattunk ki: CT, 6-oxoCN és 6-deoxo-*epi*CS. A különböző kezelésekben a hormon koncentráció hasonló képet mutatott, a szaporodás mértékétől függetlenül a kísérleti idő alatt folyamatosan csökkent (Stirk et al. 2014b). Ez azt valószínűsíti, hogy a brasszinoszteroidok az anyagcsere folyamatok során felhasználódnak és nem vesznek részt közvetlenül az osztódásban és a sejtmegnyúlásban. Ezt erősítik mások eredményei is, miszerint exogén brasszinoszteroid adagolás növelte a nukleinsav és fehérje tartalmat (Bajguz 2000), valamint a klorofill, monoszacharid és foszfor tartalmat a *Chlorella vulgaris*-ban (Bajguz & Czerpak 1998).

Két párhuzamos utat ismerünk a C28 brasszinoszteroid bioszintézisre, egy korai és egy késői C-6 oxidációs utat, amelyek különböző pontokon kapcsolódnak egymással. Mindkét C-6 út esetében a campeszterol (CR) több lépésben CS-sé alakul át, ami végül BL-t képez. A növényben a két út egyidejűleg is végbemehet (Fujioka & Yokota 2003). E bioszintetikus séma szerint a mikroalgákban talált brasszinoszteroidok a korai C-6 oxidációs útnak (6-oxoCN és CT) és a késői C-6 oxidációs útnak is (6-deoxo-*epi*CS) köztes termékei lehetnek.

Összefoglalva megállapítható, hogy az endogén növényi hormonok általánosan elterjedtek a mikroalgákban. Minden fajban hasonló a hormonösszetétel, amit azonban a tenyészet kora és a szaporítási körülmények befolyásolnak. Minden vizsgált zöldalgában kimutattunk auxint, citokinint, gibberellint és brasszinoszteroidot. ABA főleg a folyamatosan sötétben tartott (CD) tenyészetekben volt jelen (Stirk et al. 2013a, Stirk et al. 2013b, Stirk et al. 2014b). A különböző konjugátumok alapján megállapítható, hogy az aktív növényi hormonok szabályozása zöldalgákban egyszerűbb, mint a magasabbrendű növényekben: (1) kevesebb a tárolt indol konjugátum; és (2) nincsenek citokinin dezaktiválási termékek (N-glükozidok). A

hormon összetétel is némiképp eltér a magasabbrendű növényekétől, amennyiben az aktív gibberellin a GS₆, aminek a koncentrációja a legnagyobb a zöldségfélékben, szemben a magasabbrendű növényekben lévő GS₄-gyel.

A magasabbrendű növényekhez hasonlóan megállapítható a hormonok szerepe, ami lehet: (1) növekedéshez kapcsolódó (auxinok és gibberellinek, valamint a citokininek a szinkron tenyészetekben); (2) más anyagcsere folyamatokkal kapcsolatos (brasszinoszteroidok); és (3) stresszhez kapcsolódó (ABA). További kísérletekre van azonban szükség exogén növényi hormonok adagolásával annak megerősítésére, hogy a mikroalgák melyik hormonra adják a legerősebb válaszreakciót, pl. gyorsabban szaporodnak. Ezek az információk nagyon hasznosak lennének alga tömegtenyészetek szaporodásának a befolyásolására és értékes másodlagos anyagcsere termékek felhalmozódásának a javítására.

3.4.2. Mikroalgák biostimulánsként történő alkalmazhatósága a mezőgazdaságban

Az auxinok sokféleképpen szabályozzák a magasabbrendű növények növekedését és fejlődését. Részt vesznek a sejtosztódás, a sejtmegnyúlás és differenciálódás szabályozásában, a külső ingerekre adott válaszadásban, a gyökérnövekedés serkentésében, felelősek az apikális dominanciáért, részt vesznek a szállítórendszer kialakulásában, valamint a virágzás és az öregeedés szabályozásában (Mano & Nemoto 2012, Murphy 2002, Woodward & Bartel 2005). A citokininek létfontosságúak a sejtosztódásban, de befolyásolják a magasabbrendű növények számos növekedési/fejlődési folyamatát, például a gyökér:hajtás arányt, késleltetik az öregeedést, megtörik a magnyugalmi állapotot, befolyásolják a tápanyagok mozgását a növényben, az apikális dominanciát, a virágfejlődést és a magcsírázást (Kieber 2002, Sakakibara 2006). A gibberellinek ugyancsak részt vesznek a magasabbrendű növények legkülönbözőbb élettani folyamatainak a szabályozásában, például magcsírázás, hajtásmegnyúlás, levélnövekedés, virág- és magfejlődés (Urbanová et al. 2013, Yamaguchi 2008). Kulcsfontosságú közvetítői a fénnel kapcsolatos környezeti jelek felfogásának és az ezzel kapcsolatos interakcióknak, pl. a gibberellinek részt vesznek az etiolált növények fotomorfogenezisében, továbbá a hajtásmegnyúlás és a virágzás fotoperiodikus szabályozásában. A gibberellinek részt vesznek továbbá a hőmérsékleti hatásokra adott válaszokban és néhány abiotikus stressz válaszban (Yamaguchi 2008).

Az ABA-nak kettős szerepe van a magasabbrendű növényekben. Részt vesz a magfejlődésben azzal, hogy serkenti a korai embriónövekedést, de indukálja és megtartja a magnyugalmi állapotot késői embriófejlődéskor. Az ABA társult szabályozója az öregeedésnek, amennyiben növeli a fehérje és a klorofill lebomlását és gátolja a fotoszintézist. Az ABA stresszhormonként is hat azzal, hogy felerősíti az ABA szintézis-gének működését a környezeti stressz hatások, elsősorban a vízhiány stressz hatására (Nambara & Marion-Poll 2005). A brasszinoszteroidok pozitív szabályozást jelentenek a sejtosztódásra és sejtnövekedésre (Gudesblat & Russinova 2011). Részt vesznek még néhány fejlődési folyamatban, mint például a hajtás és gyökér növekedése, a virágképződés kezdeményezése, a virág és gyümölcs fejlődése

(Bajguz & Hayat 2009). Minden növényi szervben megtalálhatók, de rendszerint nagyobb koncentrációban inkább az aktívan növekedő szövetekben, a pollenben és az éretlen magban (Bajguz & Tretyn 2003). A brassinoszteroidok a biotikus és abiotikus stressz elleni védekezésben is szerepet játszanak azzal, hogy kis molekulatömegű anyagcseretermékek, pl. ROS és prolin képződését serkentik (Bajguz & Hayat 2009).

A növényi hormonok változatos módon befolyásolják a növekedést és a stressz válaszok kialakulását. Ez indokolja a növényi hormonok különböző kombinációjának az alkalmazását, amelyek így alkalmasak a növénytermesztésben és kertészetben a növény növekedésének és a termés mennyiségének a szabályozására. A tengeri algakivonatok, amelyek egy sor különböző növényi hormont tartalmaznak sikeres növényi biostimulánsok (lásd még **3.1.3. alfejezet**). Számos kereskedelmi forgalomban lévő tengeri algakivonat található a piacon (Sharma et al. 2014), amelyek kedvezően befolyásolják egyes termesztett növények terméseredményét.

A heterocitás cianobaktériumokat Ázsiában használják a rizsföldek oltására, mint nitrogén forrást. A talajban szabadon élő cianobaktériumok maguk is kedvezően befolyásolják a növény növekedését. A kedvező hatás nem magyarázható csupán a nitrogén kötéssel, növényi hormonok és vitaminok is hozzájárulnak ehhez (Whitton 2000). A biotesztek eredményei ugyancsak azt mutatták, hogy a mikroalga kivonatok befolyásolták a növény növekedését, a szója kalluszokban a sejtosztódást, a mungóbabnál és az uborka szikleveleknél serkentették a gyökérképződést. Igazoltuk, hogy a mikroalgákban megtalálható számos növényi hormon. Következésképp a mikroalgák a tengeri alga kivonatokhoz hasonlóan biostimulánsként használhatók lehetnek a mezőgazdaságban. A mikroalgákból kimutatott endogén növényi hormonok koncentrációja általában hasonló (auxinok és citokininek), nagyobb (gibberellinek és brassinoszteroidok) vagy kisebb (ABA), mint a tengeri alga kivonatokban.

A növényi hormonok jelátviteli útjai egy komplex hálózaton keresztül egymással kapcsolatban állnak. Egyes hormonok befolyásolják más hormonok bioszintézisét és a percepcióját. Ez teszi lehetővé a növény számára, hogy a biotikus és abiotikus stressz-hatásokra is válaszolni tudjon. Ez az úgynevezett „hormone crosstalk” koncepció (Robert-Seilanitz et al. 2011). Az auxinok és citokininek például fordított kapcsolatban állnak egymással, amennyiben az auxinok gátolják a citokininek bioszintézisét (Woodward & Bartel 2005), de indukálják a gibberellinek (GS) bioszintézisét (Yamaguchi 2008). A gibberellinek és az ABA antagonisták kapcsolatban vannak, amikor szabályozzák a magfejlődést és csírázást (Yamaguchi 2008). A citokininek gátolják a GS bioszintézist és serkentik a GS dezaktiválást (Weiss & Ori 2007). A környezeti tényezőktől függően az etilén és a gibberellinek pozitív vagy negatív kölcsönhatásban lehetnek egymással (Weiss & Ori 2007). A növényi hormonok „koktéljának” az exogén használata mint ahogyan azok a tengeri alga kivonatokban jelen vannak számos kedvező hatást jelentenek a növény számára. A mikroalgáknak több pótlólagos hatása is van a tengeri algakivonatokkal szemben:

1. iparszerűen termesztethetők, míg a tengeri algák gyűjtése földrajzi helyhez, hatásuk pedig évszakhoz kötött,
2. bizonyos mikroalga törzsek kiválasztásával specifikus hormon összetételt tudunk „előállítani”, ami specifikus növekedési hatást nyújt a növény számára. A vizsgált törzsek közül például:

- az MACC-545 *Poloidon didymos* nagy auxintartalmú törzs,
 - az MACC-790 *Stigeoclonium nanum* nagy citokinin tartalmú,
 - az MACC-44 *Scotiellopsis terrestris* nagy gibberellin tartalmú,
 - az MACC-692 *Klebsormidium flaccidum* pedig nagy brasszinoszteroid tartalmú,
3. a mikroalgák egy része antimikrobiális hatást mutat növénypatogénekkel szemben, tehát a hatása kettős, biostimuláns és növényvédő.

Mindebből az következik, hogy ha például klimakterikus mangó gyümölcsöt bemártunk egy brasszinoszteroid oldatba, akkor az serkenti az etilén korábbi termelődését következőképpen javítja a gyümölcs színesedését (Zaharah et al. 2012). Nagy brasszinoszteroid tartalmú mikroalga alkalmas lehet erre a célra.

Egyes mikroalgák hormonösszetétele és biológiai hatása értékessé teszi őket a növénytermesztés számára. Hatásuk kombinált lehet, nem csupán a növény növekedését befolyásolják, hanem a növényt meg is védhetik bizonyos növénypatogénekkel szemben (lásd 4. és 5. fejezet). Csökkenthetik a műtrágyák használatának szükségességét és azok kedvezőtlen hatását a talajok mikroszervezeteire (Kannaiyan et al. 1997).

3.5. Új tudományos eredmények

Elsőként közöltük endogén gibberellinek jelenlétét és összetételét mikroalgákban (Stirk et al. 2013b). Megállapítottuk, hogy a lassabban szaporodó alga törzsek több, a gyorsabban szaporodók kevesebb gibberellint tartalmaznak. A mikroalgákban kimutatott gibberellinek alapján feltételezzük, hogy a mikroalgákban a gibberellinek bioszintézise a következő úton megy végbe: $GS_{12} \rightarrow GS_{53} \rightarrow GS_{44} \rightarrow GS_{19} \rightarrow GS_{20} \rightarrow GS_5 \rightarrow GS_6$. A mikroalgákban a GS_6 a domináns biológiailag aktív gibberellin.

Másodikként közöltük a mikroalgákban a brasszinoszteroidokat, köztük a BL és a CS jelenlétét 24 vizsgált zöldalgában és három brasszinoszteroid jelenlétét (CT, 6-oxoCN és 6deoxo-*epi*CS) a *Chlorella minutissima* zöldalga szinkron tenyésztésében (Stirk et al. 2013b).

Az egyes hormonok termelése és a sejtciklus között nem sikerült meggyőző összefüggést találni, csupán néhány megállapítást tenni: (1) a sejtosztódásban szerepet játszó auxinok és citokininek koncentrációja növekedett a szinkrontenyészetekben a 48-órás kísérleti időszak alatt; (2) a gibberellineké, a mikroalgákban feltehetően szintén stresszhormonként működő abszeizinsavé és a sejtosztódásban közvetlenül részt nem vevő brasszinoszteroidoké viszont csökkent; (3) az *Arthronema africanum* cianobaktérium aszinkron tenyésztésével végzett biotesztek szerint nem a sejtciklustól, hanem a fénytől függően nőtt a tenyészet citokinin-szerű hatása.

Huszonöt zöldalga hormontartalmának és hormonösszetételének műszeres analitikai eredményei alapján valószínűsítjük, hogy minden zöldalga képes növényi hormonok termelésére, ezért a mikroalgák, a tengeri algakivonatokhoz hasonlóan alkalmasak lehetnek a termesztett növények növekedésének és fejlődésének a kedvező befolyásolására. Pótlólagos előnyük a tengeri algakivonatokkal szemben, hogy közülük célorientáltan specifikus hormon összetételű algák használhatók, amelyek iparszerűen termesztethetők és még növényvédő

hatásuk is lehet. Mindazonáltal a növénykezelési célokra termesztett mikroalga biomasszában, a növényi hormonok kimutatása műszeres analitikai módszerekkel nem elegendő. A felhasználás előtt a hormonok együttes biológiai hatásának a vizsgálata bioteszt módszerekkel feltétlenül szükséges.

Kutatási jövőkép

A mikroalgákban található növényi hormonok műszeres analitikai vizsgálata különböző rendszertani csoportokba tartozó mikroalgákban alapkutatási céllal lehet szükséges, pl. specifikus hormonok kimutatása és bioszintézis utak megismerésére. A meglévő nemzetközi együttműködésünk (Palacky University, Olomouc) keretében ezt korlátozott mértékben, de továbbra is szeretnénk vizsgálni.

Nagyobb hangsúlyt szánunk a hormonok mikroalgákban betöltött szerepének a kutatására. Exogén hormonok hatását vizsgáljuk laboratóriumi tenyészetekre és üvegházban elhelyezett főlüzemi tömegtermesztő berendezésekben szaporodó mikroalgákra. Gyakorlati célunk a tömegtermesztés során a mikroalgák szaporodásának a gyorsítása, továbbá annak a vizsgálata, hogy a környezeti feltételek (pl. alacsony fényintenzitás és hőmérséklet) kedvezőtlen hatása csökkenthető-e specifikus hormonok adagolásával.

Biotesztekkel értékeljük eltérő módon termesztett és/vagy különböző mikroalga törzsek hormonszerű hatását, különös tekintettel az auxinszerű és citokininszerű hatásra. PhD-hallgatók és növénytermesztők bevonásával vizsgáljuk ezeknek a „bevizsgált” biomassa mintáknak a hatását termesztett növények növekedésére és fejlődésére, valamint növények szövettenyészeire.

4. Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra

4.1. Irodalmi áttekintés

4.1.1. Fungicid hatású mikroalgák

A mikroalgákban előforduló elsődleges anyagcsere termékek, pl. fehérjék, zsírsavak, vitaminok vagy szénanyagok számos gazdasági jelentőségű termék közismert alapanyagai (**2.1.4. alfejezet**). A mikroalgák úgynevezett másodlagos anyagcsere termékei az emberiség számára jelentős biotechnológiai termékek (Schlegel 1985). Közéjük tartoznak egyebek között a szerves savak, szénhidrátok, aminosavak és peptidek, vitaminok, növekedést szabályozó anyagok, antibiotikumok, enzimek és toxikus vegyületek. Eddigi ismereteink szerint a cianobaktériumok több mint 800 másodlagos anyagcsere terméke számos csoportra osztható, pl. enzimgátlók, fotoszintézist gátlók, antimikrobiális anyagok (Yadav et al. 2011). A cianobaktériumok fontos forrásai új fungicid és kisebb mértékben baktericid anyagoknak (Borowitzka 1995, Burja et al. 2001, Kulik 1995, Patterson et al. 1994, Piccardi et al. 2000). A tengeri mikroalgák antimikrobiális hatásának vizsgálatáról több közlemény készült, mint az édesvíziekről, aminek oka a nagyobb találati arány, vagyis a gyakoribb antimikrobiális hatás (Burja et al. 2001, Gerwick et al. 1994, Jesus Raposo 2013, Kadam et al. 2013, Tan 2010, Welch 1962). Kellam et al. (1988) biotesztekkel 132 tengeri és 400 édesvízi mikroalga hatását vizsgálták 6 gombára. A tengeri mikroalgák közül 18, az édesvíziekből pedig csupán 6 mutatott gátló hatást. A kutatások leginkább gyógyszeripari céllal folynak, aminek főleg gazdasági oka van. Az utóbbi évtizedben azonban a szintetikus peszticidek elfogadottságának a csökkenése lendületet adott a természetes eredetű anyagok kutatásának, amit az Európai Unió is támogat.

Humán patogének

Irán különböző területein rizsföldekről izolált 76 cianobaktérium törzsből a *Candida kefyr* és a *Candida albicans* gombára egyaránt hatásos *Hapalosiphon hibernicus* FS 33 törzset találták ígéretesnek további vizsgálatokra (Soltani et al. 2005). A *Tolypothrix tjipanasensis* De Wild cianobaktérium törzs lipofil kivonata közepesen gátolta a *C.albicans*, a *Trichophyton mentagrophytes* és az *Aspergillus flavus* Link: Fr. (toxintermelő) gombákat (Bonjouklian et al. 1991). A *Nostoc muscorum* kivonatában lévő fenol vegyületek gátolták a *C.albicans* és a *Staphylococcus aureus* szaporodását (Cano et al. 1990). Hőforrásból izolált *Mastigocladus laminosus* Chon és *Phormidium* sp. törzs szintén gátolta a *C.albicans*-t és a *S.aureus*-t (Fish & Codd 1994). Az MACC vizsgált öt *Scenedesmus* törzse 1 mg SzA cm⁻³-nél kisebb koncentrációban (MIC) gátolta a *Candida albicans*-t (Aremu et al. 2014). Argentínában rizsföldekről izolált 36 cianobaktérium – Nostocaceae, Microchaetaceae és Scytonemataceae – szűrletét vizsgálták a *Staphylococcus aureus* és *Candida albicans* humán patogénekkal szemben. A törzsekből 20 volt hatásos a *S.aureus*, 12 a *C.albicans* és 5 mindkettővel szemben (Caire et al. 1993).

Stewart et al. (1988) több mint 700 cianobaktériumot vizsgáltak, amelyek talajból, vízből, vagy tengerekből származtak. A kivonatok 9%-a mutatott fungicid hatást legalább egy

gombára a következőkből: *Aspergillus oryzae* (Alhb.) Cohn (szaprofita); *Candida albicans* (Robin) Berkh. (humánpatogén); *Penicillium notatum* Westling (szaprofita). Ishibashi et al. (1986) több, nem specifikus fungicidet izoláltak a *Scytonema pseudohofmanni* Bharadwaja törzsből, amiket „scytophycin” C-, D- és E-nek nevezték el. Az *Anabaena laxa* kivonata, a „laxaphycin” hatásos volt 5, köztük az *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans* és *Penicillium notatum* gombára (Frankmölle et al. 1992). Ugyanezekre a gombákra volt hatásos a *Calothrix fusca* (Kützing) Bornet & Flahault cianobaktériumból izolált és meghatározott „calophycin” (Moon et al. 1992), valamint a *Fisherella ambigua* (Nägeli) Gomont, a *Hapalosyphon hibernicus* W. & G.S. West és a *Westiellopsis prolifica* Janet „hapalindol” típusú alkaloidja (Smitka et al. 1992).

Növénypatogén gombák

A *Nostoc muscorum* extracelluláris termékei a *Rhizoctonia solani* 77,5% gátlását okozták és gyorsították a szójamag csírázását (Caire et al. 1990). A *Spirulina platensis* és a *Nostoc muscorum* tenyészetének szűrlete biotesztben a *Fusarium oxysporum* és a *Rhizoctonia solani* szaporodását mintegy 60%-kal csökkentette (Tantawy 2011). A hatást a szűrletben lévő fenolokkal, szaponinnal és alkaloidokkal magyarázták. Silva-Stenico és munkatársai 50 cianobaktérium tenyészetének szűrletét és a biomassza metanolos kivonatát tesztelték a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* és a *Pythium* sp. növénypatogén gombákra, de meglepő módon egyáltalán nem találtak gátló hatást (Silva-Stenico et al. 2011). Az 50 törzs 30%-a viszont gátolta a vizsgált Gram-pozitív és 17%-a a Gram-negatív baktériumokat. Paradicsom, paprika és padlizsán növények *Pythium aphanidermatum*-mal szembeni védelmére a vetés előtt a magokat *Calothrix elenkenii* tenyészet szűrletével és a biomassza etilacetátos kivonatóval kezelték (Manjunath et al. 2010). A kezelt magok a vetéstől számított 40 nap múlva eltérően válaszoltak a kezelésre, a legjobban az etilacetátos kivonattal kezelt paprika.

Halotoleráns cianobaktériumok hatását vizsgálták az *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* és *Paecilomyces lilacinus* növénypatogén gombákra (Pawar & Puranik 2008). A 40 törzsből 18 *Oscillatoria*, 5 *Lyngby*, 4 *Nostoc* és 3-3 *Anabaena*, *Phormidium* és *Synechococcus* volt. A törzsek közül 20 legalább egy növénypatogén gombára hatásos volt, 12 pedig az *A.flavus*-ra. A *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* és a *Fusarium moniliforme* ellen a paradicsomot komposzthoz adott *Anabaena laxa* törzsszel sikerült megvédeni (Prasanna et al. 2013). A fungicid hatású *A.laxa* mellett a kezelés erősítette a növény védekező képességét a növénypatogén gombával szemben. Kimutatták, hogy az *Anabaena laxa* hatásos fungicid vegyülete hasonlít a *Lyngbya majuscula* által termelt „majusculamid”-hoz (Gupta et al. 2013). A „cryptophycin” termelő ATCC 53789 *Nostoc* törzs 9 különböző növényi gombabetegség ellen volt hatásos, egyebek között *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, *Phytophthora cambivora*, *Rhizoctonia solani* és a *Sclerotinia sclerotiorum* ellen (Biondi et al. 2004).

A cianobaktériumok biológiailag aktív, másodlagos anyagcsere termékekben leggazdagabb rendjei az Oscillatoriales (197) és a Nostocales (126), amelyek között fungicidek is megtalálhatók (Burja et al. 2001). Moore et al. (1988) cianobaktériumok nyers kivonatainak 9%-ában találtak gombák elleni hatást. Kulik áttekintést adott a növénypatogén baktériumok és

gombák ellen hatásos mikroalgákról (Kulik 1995). Számos új, biokémiaiilag aktív, természetes eredetű terméket izoláltak *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* és *Oscillatoria* fajokból. A bioaktív vegyületek 40%-a lipopeptid, 5,6%-a aminosav, 4,2%-a zsírsav, 4,2%-a makrolid és 9%-a amid volt. A lipopeptidek 41%-a citotoxikus és csupán 15%-a tartalmaz egyebek között gombákra ható vegyületeket (Burja et al. 2001). A tengeri cianobaktériumok természetes anyagainak a 75%-a nitrogént tartalmaz, vagyis valószínűleg az aminosavak anyagcseréjéből származik (Gerwick et al. 1994).

Összefoglalva az irodalom a tengeri cianobaktériumokból, azon belül is leginkább fonalas fajokból kimutatott fungicid hatású anyagokat tárgyalja, és csupán elvétve említi meg a talajalgákat. Borowitzka szerint eddig valóban a cianobaktériumok álltak a leginkább a kutatás középpontjában, de semmi okunk nincs feltételezni azt, hogy az eukarióta algákban nincsenek érdeklődésre számot tartó aktív vegyületek (Borowitzka 1995). Az MACC lehetőségeit kihasználva ezért nagyrészt eukarióta talajalgákat vontunk be a kutatásba.

4.1.2. Kivonat készítésétől függő hatás

Felülűszó

A mikroalgák bioaktív anyagai többnyire a sejtekben halmozódnak fel, de a tápközegbe, vagy a környezetbe is kikerülhetnek. Harder az elsők között mutatta ki, hogy a *Nostoc punctiforme* autotoxikus anyagot bocsát ki a környezetébe (Harder 1917). A *Nostoc commune* extracelluláris terméke egy antibakteriális hatású diterpén (Jaki et al. 2000). Volk 7 cianobaktérium tápközegéből mutatta ki az indol-alkaloid norharmant, ami egyebek között különböző enzimek működését gátolja (Volk 2008). Burkiewicz három zöldalga tenyészetének a szűrletében bioteszttel gibberellin és citokinin hatást talált (Burkiewicz 1987). Öt vizsgált édesvízi mikroalga közül négy esetben a tenyészet felülűszója mutatott antimikrobiális hatást különböző élelmiszer romlást okozó gomba ellen (Kellam et al. 1988). A *Gloeocapsa* sp. zöldalga és a *Synechocystis* sp. cianobaktérium vizes kivonata és a tenyészet felülűszója volt a leghatásosabb és a legszélesebb hatásspektrumú élelmiszer minőség romlást okozó nyolc mikroszervezettel szemben az általuk termelt és kibocsátott poliszacharidok miatt (Najdenski et al. 2013). A sejt célszerűen akkor bocsát ki a környezetébe anyagokat, ha azt szeretné megváltoztatni/befolyásolni, beleértve a környezet más élő szervezeteit is. A *Nostoc insulare* cianobaktérium akkor bocsátott ki nagyobb mennyiségű norharmant a környezetébe, amikor korlátozott volt a tápanyagellátás és megnövekedett a más szervezetekkel való versengés (Volk 2007).

Biomassza

A legtöbb másodlagos anyagcsere termék feltehetően az alga biomasszában halmozódik fel. Az extrahálás módja jelentősen befolyásolja a kivonat biológiai hatásosságát. Bhateja és munkatársai 9 cianobaktérium vizes és szerves oldószeres kivonatát vizsgálva megállapították, hogy a vizes kivonatok hatástalanok voltak a *Staphylococcus aureus* (VISA) törzssre, de az *Anabaena variabilis* szerves oldószeres kivonatai (hexán, kloroform és metanol) jelentősen

gátolták a vizsgált baktériumot (Bhateja et al. 2006). A *Dunaliella salina* halofil zöldalga és a *Phormidium autumnale* fonalas cianobaktérium metanol+aceton+dietyl éter oldószer keverékkel készített kivonata volt a leghatásosabb a vizsgált növénypatogén gombákra (pl. *Fusarium solani*, *F.oxysporum*; Alwathnani & Perveen 2013). A *Nostoc linckia* metanolos kivonata a *Cladosporium* sp. micélium növekedését 40%-kal, a *Fusarium oxysporum*-ét pedig 30%-kal csökkentette, de a cianobaktérium vizes kivonata hatástalan volt (Perveen & Alwathnani 2013). Pawar és Puranik 40 cianobaktérium törzs vizsgálatakor szintén a metanollal készített kivonatokat találták a leginkább gombaszaporodást gátló hatásúnak (34,9%), amit az n-propanol (30,2%), a petroléter (18,6%), végül a vizes kivonat (16,2%) követett (Pawar & Puranik 2008). Huszonhét cianobaktérium vizes kivonatának 9%-a, míg metanolos kivonatának 31%-a volt antibakteriális hatású (Skulberg & Skulberg 1990). A műszerezettség fejlődésével lehetővé vált kivonatok készítése szuperkritikus széndioxid extrakció alkalmazásával. Mendiola és munkatársai a *Chaetoceros muelleri* tengeri kovamoszatzból a nyomás és a hőmérséklet változtatásával különböző szuperkritikus extraktumokat készítettek és eltérő antimikrobiális hatást figyeltek meg (Mendiola et al. 2007). A *Candida albicans* volt a legérzékenyebb a kivonatokra, amelyekben az összes triglicerid és a dokoza-pentaénsav (DPA) volt a hatásért felelős. Cano és munkatársai a *Nostoc muscorum* metanolos kivonatában a fenol vegyületeket tették felelőssé a *Candida albicans* elleni hatás kialakulásában (Cano et al. 1990).

Irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy az algatenyészetek szűrletének antimikrobiális hatása kimérhető lehet, de a biomassza szerves oldószeres (pl. metanol) kivonatának a tesztelésével nagyobb találati arány, vagyis gyakoribb antimikrobiális hatás várható. A szerves oldószeres kivonat feltételezhetően nagyobb hatása ellenére vizes kivonat készítése indokolt lehet, ha a megtermelt algabiomasszát nagyobb anyag- és energiaráfordítás nélkül, például közvetlenül növények kezelésére akarjuk felhasználni. Az alkalmazás és a kivonatok készítése előtt azonban a sejtfeltárással feltétlenül szükség van, amit a fent említett közlemények szerzőinek a többsége nem említett.

4.1.3. Környezeti feltételektől függő hatás

Mikroalgák antimikrobiális hatású másodlagos anyagcseretermékeinek hasznosítása alapvetően kétféle módon történhet: (1) a hatásos molekulák kivonása és meghatározása, kémiai szintézise és annak alkalmazása; (2) a hatásos alga törzs tömegtermesztése és a hatóanyag(ka)t tartalmazó biomasszájának vagy kivonatának felhasználása. Gazdaságos megoldásnak az utóbbi látszik, különösen akkor, ha nem csupán egy molekula felelős a hatás kialakulásáért (Knutsen & Hansen 1997). A cianobaktériumokra ez csupán korlátozottan érvényes, mert szaporodásuk lassú, szuszpenziójuk nem homogén, vagyis tömegtermesztésük nehézségekkel jár. Felmerül továbbá a kérdés, hogy a laboratóriumi körülmények között szaporított hatásos mikroalga megőrzi-e ezt a tulajdonságát, ha tömegtermesztő berendezésben más körülmények között szaporodik? Adott molekula bioszintézise a mikroalga törzstől és a laboratóriumi tenyésztési, ill. a tömegtermesztési körülményektől, a prekursorok jelenlététől és a bioszintézisben részt vevő specifikus enzimek aktivitásától függ (Skulberg 2000).

Az algák többféle antimikrobiális hatást is mutathatnak, ami feltehetően különböző vegyületek termelésére vezethető vissza (Olesen et al. 1964). Ugyanannak az algának különböző mintái lehetnek hatástalanok vagy hatásosak egyes mikroszervezetekre, ugyanakkor hatásosak másokra. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a hatásos vegyületek száma, vagy a koncentrációja eltérő volt a mintákban (Ballantine et al. 1987). A biológiai védekezés során vagy a mikroalgák által termelt gátló anyag hat a növénypatogén gombára, úgy mint a peszticidok, vagy a mikroalga által termelt anyagok védekező reakciókat indukálnak a növényben. Miután az utóbbi anyagok nem pusztítják el a patogént, a módszer teljesen eltér a kémiai védekezéstől (Alabouvette et al. 2006), és ez jelenti az előremutató megoldást. A növények érzékelik a patogének által kibocsájtott elicitor molekulákat, amelyek hatására a növény védekező mechanizmusokat hoz működésbe a patogénnel szemben. A tengeri algák által termelt poliszacharidok és ebből képződött oligoszacharidok szintén kiválthatnak ilyen védekező mechanizmust a növényben vírus, gomba és baktérium fertőzés ellen (Vera et al. 2011). A mikroalgák is termelnek poliszacharidokat, vagyis elméletileg szintén kiválthatnak hasonló hatást.

Tenyészet kora

Csaknem minden, érdeklődésre számot tartó, biológiailag hatásos vegyület másodlagos anyagcsere termék és mint ilyen rendszerint a szaporodás stacioner szakaszában vagy a lassan szaporodó tenyészetekben fordul elő leginkább (Borowitzka 1995). Számos tanulmányt közöltek arról, hogy a hatásos vegyületek termelése a szaporodási fázistól és a környezeti feltételektől függ, vagyis a hatásos vegyületek termelését optimalizálni kell (Debroy & Ward 1979, Morton & Bomber 1994, Westerhuizen & Eloff 1983, stb.). Az *Anabaena laxa* a legnagyobb fungicid hatást a *Pythium debaryanum*-ra folyamatosan megvilágított tenyészetben és a szaporodás stacioner szakaszában mutatta (Gupta et al. 2013). A *Synechococcus leopoliensis* cianobaktérium maximális antimikrobiális hatását ugyancsak a szaporodás stacioner szakaszában mérték (Noaman et al. 2004). Az *Oscillatoria angustissima* és a *Calothrix parietina* antimikrobiális hatása szintén a stacioner szakaszban volt kimutatható (Issa 1999). Volk szerint az antimikrobiális vegyületek a *Nostoc insulare* tenyészetében a stacioner szakaszban halmozódtak fel (Volk 2007). A 4 naposhoz viszonyítva a 17-napos *Gloeocapsa* sp. tenyészetben négyszer nagyobb volt a poliszacharidok antimikrobiális hatása (Gacheva et al. 2013). *Scenedesmus* zöldalga törzsek jelentős antimikrobiális hatását ($< 1 \text{ mg cm}^3$) tudtuk kimutatni két Gram-pozitív és két Gram-negatív baktériummal, valamint a *Candida albicans* gombával szemben. A hatást befolyásolta a tenyészet kora, de általános összefüggést nem tudtunk megállapítani a törzsek hatása és a tenyészetek kora között. A biológiai hatásosság szempontjából ideális szüretelési idő a keresett molekulától és az elvárt biológiai hatástól, valamint a vizsgált *Scenedesmus* törzstől függött (Aremu et al. 2014).

Tápoldat, fény hőmérséklet

A tápoldat az egyik legmeghatározóbb környezeti tényező a mikroalgák számára. Ennek egyik bizonyítéka például az, hogy G-tápoldatban szaporított *Synechococcus leopoliensis* antimikrobiális hatása csekély volt, közepes a Chu-10 és maximális a BG-11 tápoldatban

szaporítva (Noaman et al. 2004). Schwartz és munkatársai azt találták, hogy a tápoldat változtatásával, változik a *Fischerella* antimikrobiális hatása is (Schwartz et al. 1989). A tápoldat megfelelő megválasztása háromszorosára növelheti az antimikrobiális anyagot termelő törzs biomaszájának az antimikrobiális hatását (Egorov 1985). A mikroalgák szárazanyagában mintegy 50% a fehérje, a keményítő pedig az elsődleges szén- és energia-forrás. Ha a sejtek hosszabb időn át nitrogén-hiányos környezetbe kerülnek, akkor tovább nőnek és osztódnak, de a fotoszintézis révén megkötött szén a keményítő helyett a lipidek felé áramlik, a fehérjetermelés pedig szünetel (Li et al. 2011). Nitrogén-hiányos tápközegekben a *Chlorella minutissima* zöldalgában csökkent a fehérjeszintézis (20-25%), és növekedett a lipid- és zsírsav-tartalom (40-45%; Ördög et al. 2012). A biológiai hatás kialakulása sokszor a zsírsavakra vezethető vissza (Gacheva et al. 2013, Mendiola et al. 2007, stb.), amelyek koncentrációját nitrogénhiányos tápoldattal növelhetjük. Nitrogén- és foszfor-limitációra volt szükség az *Oscillatoria acutissima* nagy acutiphycin termeléséhez (Moore et al. 1988).

A „cianobacterin LU1” antibiotikumot termelő CALU-892 *Nostoc linckia* törzs a szaporodás minden szakaszában termelt antibiotikumot, de inkább az alacsony hőmérsékletet kedvelte (Gromov et al. 1991). A *Gloeocapsa* sp. cianobaktérium szaporodása csökkent ha az ideálisnál alacsonyabb hőmérsékleten tenyésztették, de növekedett a biológiai hatása baktériumokkal és gombákkal szemben (Gacheva et al. 2013). A különböző körülmények között tenyésztett *Anabaena laxa* biomasza mintákból a folyamatos fényen tenyésztett fungicid hatása volt a legnagyobb, amit tovább növelt a foszfor koncentráció megkétszerezése a tápoldatban (Gupta et al. 2013). A nagy fényintenzitás egyesek szerint növeli (Tonk et al. 2005, Wiedner et al. 2003), mások szerint csökkenti a cianobaktériumok toxintermelését (Hobson & Fallowfield 2003, Lehtimäki et al. 1994, Sivonen 1990).

A környezeti feltételek hatása a biológiailag hatásos vegyületek termelésére sokkal fontosabb lehet, mint maga a mikroalga törzs (Procházková et al. 2013). A tápoldat, annak összetétele, a fény, a hőmérséklet, a tenyészet kora és sok más tényező (pH, CO₂-ellátás, stb.) mind befolyásolják a hatásos vegyület(ek) termelését és koncentrációját a mikroalgákban. A hatásos törzs kiválasztása után ezért fontos feladat a tenyésztési körülmények optimalizálása, ami nem feltétlenül egyezik meg a szaporodási feltételek optimalizálásával. Nem egyszerűen biomasza termelés a cél, hanem biológiailag aktív anyagokban gazdag mikroalga biomasza termelése. A tenyészet szaporodásának az optimalizálását nem a szárazanyag termelésre, hanem a biológiailag aktív anyag termelésre célszerű elvégezni.

4.1.4. Célkitűzések

Fő célunk az MACC jól szaporodó mikroalga törzseinek gazdaságilag jelentős növénypatogén gombákkal szembeni hatásosságának a megismerése volt, ezen belül pedig az alábbiak:

1. kilenc növénypatogén gomba közül legalább egy ellen hatásos mikroalga törzs kiválasztása, aminek ismeretében majd pályázati anyagok készíthetők a biológiailag hatásos anyagok ideális termelési feltételeinek a meghatározásához, végül pedig mikroalga termék előállításához,

2. mikroalga törzsek eredeti élőhelye (talaj, víz), rendszertani helye (cianobaktérium, eukarióta alga) és biológiai hatásossága közötti összefüggés feltárása, a jövőbeni biotesztesztelésnél nagyobb találati arány eléréséhez, valamint az MACC bővítésére legmegfelelőbb élőhelyek kiválasztása új törzsek izolálásához,
3. növénypatogén gombákkal szemben hatásos mikroalgák gyakoriságának a becslése annak előrejelzésére, hogy milyen esélyünk van új növénypatogén gombával szemben hatásos mikroalga kiválasztására.

4.2. Anyag és módszer

4.2.1. Vizsgált cianobaktériumok és eukarióta algák

Az agar géldiffúziós biotesztekhez nagy biomasszát adó, gyorsan szaporodó és lehetőleg homogénen szaporodó talajalgákat választottunk. A cianobaktériumok szaporodása általában lassú, gyakran tapadnak a lombik belső falára, lepedéket, csomókat képeznek. Ezzel szemben az eukarióta algák, különösen a zöldalgák gyorsan szaporodnak, tenyészetük homogén szuszpenziót ad és ritkán tapadnak az üveg falára. A tengeri cianobaktériumok biológiai hatásáról számos, az édesvíziekről viszont kevesebb közlemény áll rendelkezésre. Keveset tudunk az eukarióta algák antimikrobiális hatásáról és még kevesebbet a talajalgákról. Mindezt figyelembe véve a biotesztekhez kiválasztott törzsek többsége eukarióta alga, kétharmada talajalga, egyharmada pedig vízből izolált mikroalga törzs (**4.1. táblázat**). A cianobaktériumok a Nostocales és Oscillatoriales rendbe tartozó fonalas cianobaktériumok. Az eukarióta algák csaknem kizárólag a Chlorophyceae és Trebouxiophyceae osztályba tartoznak. A vizsgált 280 törzs taxonómiai besorolását, eredetét, tenyésztéséhez használt tápoldatot, maximális biomassza termelését és a tenyésztési időt a **melléklet M4.1. táblázatában** mutatjuk be részletesen.

A kiválasztott törzsek produktivitásának fő jellemzőit, vagyis legnagyobb biomassza termelését és átlagos napi biomassza termelését az MACC összes törzséhez és talajalgáihoz hasonlítottuk (**4.2. táblázat**). A sok és különböző tulajdonságú mikroalga egymástól nagyon eltérő adataiból számított átlag természetesen nagy szórással társul, de a jelentős különbség az átlagokban mégis egyértelmű. Az MACC összes törzse és talajalga törzsei között alig van különbség, míg a kiválasztott törzsek gyorsabban szaporodnak és nagyobb biomasszát termelnek, mint az MACC más törzsei. A törzsek fenntartását, szaporítását, szüretelését, tárolását és előkészítését a biotesztekhez a **2.2. alfejezetben** részletesen leírtuk.

4.1. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen vizsgált 280 mikroalga törzs taxonómiai helye és eredete.

Rend/Osztály	Eredet		Összesen
	Talaj	Víz	
Nostocales	12	8	20
Oscillatoriales	6	3	9
Synechococcales	1	1	2
Chroococcales	1	1	2
Pseudanabaneales		1	1
Összes cianobaktérium	20	14	34
Chlorophyceae	107	49	156
Trebouxiophyceae	54	28	82
Ulvophyceae	4		4
Klebsormidiophyceae	2	1	3
Conjugatophyceae		1	1
Összes eukarióta alga	167	79	246
Mindösszesen	187	93	280

4.2. táblázat: Az MACC összes törzsének, talajalgáinak és agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen vizsgált 280 mikroalga törzsének legnagyobb biomassza termelési átlaga és átlagos napi biomassza termelése.

MACC alगतörzsek	Alगतörzsek legnagyobb biomassza termelése (g L ⁻¹)		Alगतörzsek átlagos napi biomassza-termelése (mg L ⁻¹ nap ⁻¹)	
	Cianobaktérium	Eukarióta alga	Cianobaktérium	Eukarióta alga
Összes alगतörzs	1,30±0,60	2,00±0,87	107,78±48,12	157,09±59,30
Talajalgák	1,25±0,52	2,12±0,86	106,80±46,14	160,56±54,87
Növénypatogén gombák ellen vizsgált törzsek	2,07±0,69	2,61±0,73	149,08±55,27	191,57±46,79

4.2.2. Vizsgált növénypatogén gombák

Alternaria alternata (Fr:Fr.) Keissl. barna, haránt- és hosszanti válaszfalakkal több sejtre osztott konídiumai láncokban fűződnek le (Rotem, 1994).

Polifág parazita gazdanövényei többek között az *Allium*, *Beta*, *Brassica*, *Capsicum*, *Lycopersicon*, *Solanum*, *Triticum* nemzetségek fajai. Leggyakrabban levélbetegséget okoz, ami nagyméretű, beszáradó, koncentrikusan gyűrűzött foltok formájában jelenik meg. A foltok között a szövetek gyakran sárgulnak. Fertőzi a burgonya gumóját is, amelyen a szövetekbe mélyedő, korhadó szövetrészek képződnek. A paradicsom alakú paprika termésén a belső szövetek rothadását idézi elő. A paradicsom bogyóján besüppedő, gyűrűzött foltokat okoz. A fertőzött részeken nedves körülmények között megjelenik a gomba fekete konídiumtartó tömege. Fertőzési forrás a beteg növénymaradvány. Egyes gazdanövényeinek (paradicsom, hagyma stb.) magjával is terjed. Konídiumai a szél segítségével jutnak a gazdanövényre. Megbetegedések meleg, párás időben alakulnak ki (4.1. ábra).



4.1. ábra: *Alternaria alternata* tünetei paradicsomon (forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

Fusarium graminearum Schwabe ivartalan spórái makro- és mikrokonídiumok, valamint klamidospórák, teleomorf alakja: ***Gibberella zeae*** (Schwein.) Petch, peritéciumos tömlősgomba (Booth 1971).

A *Fusarium* fajok a gombák növénypatológiai szempontból legjelentősebb nemzetségét alkotják. Kozmopolita, talajlakó szervezetek, az élettani, kórtani, vagy egyéb okokból legyengült növényeken súlyos veszteségeket okoznak. A *F. graminearum* 4-8 sejttű makrokonídiumai kissé görbültek. Klamidospórákat ritkán képez. Teleomorf alakja a *Gibberella zeae* peritéciumos, aszkuszos gomba. A kórokozó 15 növénycsalád számos egy- és kétszikű fajtát fertőzi. Legjelentősebb gazdanövényei a gabonafélék. Ezeken csírapusztulást és tőkorrhadást okoz. Hazai éghajlati és termesztési feltételeink mellett ennek a két fertőzési módnak nincs nagy jelentősége. A kalászfuzariózis a búzán és az árpán, valamint a csőpenész

a kukoricán csapadékos években a termesztés sikerének meghatározó eleme lehet. A termésmennyiség csökkenése mellett romlanak a malomipari értékek és takarmány minősége. A *Fusarium* fajok másodlagos anyagcseretermékei rendkívül nagy biológiai aktivitású mikotoxinok, amelyek takarmánnyal az állatok, vagy étellemszerrel az ember szervezetébe jutva minden életfunkciót befolyásolnak (4.2. ábra).



4.2. ábra: Búza kalászfuzariózis (jobbra, forrás: Major B., NYME MÉK, 2013) és kukorica csőpenész (balra, forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

Rhizoctonia solani Kühn – steril micéliumú, konídiumot nem fejlesztő szervezet, melynek ivaros alakja a ***Thanatephorus cucumeris*** (A.B. Frank) Donk. bazídiumos gomba (Sneh et al. 1991).

Széles gazdanövénykörű, mintegy 250 növényfajt fertőző parazita. Világszerte elterjedt gomba a burgonyahimlő és a „fehérharisnyásság” kórokozója. A burgonyacsíra csúcsi része megfeketedik, a talajfelszín alatt elpusztul, a növény nem kel ki. Később, az idősebb növények szárán, a talaj közelében az ivaros alak fehér micélium bevonata jelenik meg. Hatására a hajtások sárgulnak, lankadnak, leveleik sodródznak. Zöldségfélék palántanevelésekor gyakran fellép, mint a palántadőlés kórokozója. Szikleveles, vagy 1-2 lombleveles növények betegednek meg. A szikleveles növények szártövén vizenyős barnuló foltok keletkeznek. A szár befűződik, elvékonyodik, eldől, s a palánták foltokban elpusztulnak. Helyre vetett növényeknél a csírapusztulás tőhiányt okoz. A későbbi fertőzés a gyökérnyaki rész parásodását okozza. Az erősen fertőzött tövek eldőlnék. Cukorrépában – több kórokozó mellett – a *R. solani* is részt vesz a gyökérfekély szindróma kialakításában. Ebben az esetben is a fiatal növények fertőződnek, vagy pusztulnak el. Az életben maradt egyedek visszamaradnak a fejlődésben. Erős fertőzésnél újratetés válhat szükségessé. Elsődleges fertőzési forrás a talaj, vagy a burgonyagumó héján képződő fekete apró, álszkleróciumok. A fertőzéshez 20 °C alatti talajhőmérséklet és nedves talaj szükséges (4.3. ábra).



4.3. ábra: *Rhizoctonia solani* által okozott befűződés paprikapalánta szártövén (balra, forrás: Rasbak), burgonyahimlő (jobbra, forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

Pythium ultimum TROW. petespórás gomba (Plaats-Niterink 1981).

Nem tartozik a legjelentősebb kórokozók közé, de a palántadőlés komplex kóroktanának szereplőjeként figyelemre tarthat számot. Talajlakó, sokgazdás parazita. A csíranövényeket és a szikleveles palántákat fertőzi. A csíranövény már a talajban fertőződhet és elhalhat. Később a palánták hipokotil szárrésze vizenyősödik, megbarnul, majd befűződik. Az elvékonyodott szövetek nem bírják el a növény súlyát, így a palánta elfekszik a talajon és elhal. A 4-6 levelesnél idősebb palánták gyökérnyaki része már nem fertőződik. Ilyenkor az újonnan képződő gyökök fiatal szöveteit betegíti a gomba.

Phaeoramularia capsicicola (Vassiljevsky) Deighton többnyire kétsejtű, barna konídiumai rövid tartókon képződnek (Glits 1992).

Először 1992-ben észlelték hazánkban a betegséget. Zárt, rosszul szellőztetett, kis légtérű termesztő berendezésekben okoz jelentős veszteséget. A kórokozó csak a paprikát fertőzi. Eleinte világos, néhány milliméteres foltok jelennek meg a leveleken, amelyek fonákán bársonyos, szürke penészbevonat képződik. A levelek kanalasodnak, sárgulnak, végül lehullanak. A gomba a lehullott, fertőzött levelekben telel át. A fertőzéshez 30 °C körüli hőmérséklet és magas páratartalom szükséges. A betegség a sűrű, buja, túlzott tápanyagellátásban részesített állományokban különösen nagy kárt okozhat (**4.4. ábra**).



4.4. ábra: Bársonyfoltosság tünetei a paprika levelén (forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

Botryotinia fuckeliana (de BARY) WHETZEL, apotéciumos tömlősgomba, anamorf alakja a ***Botrytis cinerea*** PERS.:FR., amely konídiumait szabadon álló tartókon a fertőzött növényi rész felületén képezi (Elad et al. 2007).

Sokgazdás, kétszikű növényeket fertőző parazita. A gazdanövény pollene stimulálja a konídiumok csírázását. Gazdanövényei földfeletti részén szürkepenészes rothadást okoz. A fertőzött részeken nedves időben nagy, vizenyős, rothadó foltok jönnek létre, amelyeken a gomba konídiumtartóin óriási tömegben fejlődnek az egysejtű, porzó konídiumok. Nagy károkat napraforgóban, kertészeti kultúrákban, szőlőben és bogyós gyümölcsösökben okoz. Csapadékos őszön napraforgóban a tányérok tömeges leszakadását okozhatja. Szőlőben a peronoszpóra és a lisztharmat mellett a legveszélyesebb kórokozók egyike. A bogyósgyümölcsűek és a szőlő bogyói nedves időben rothadnak, a fűrkocsány fertőzése miatt a szőlőfürt leszakad. A tárolt csemege-szőlő fűrtjei elrothadnak. Száraz meleg őszön a fertőzött szőlőszem nem rothad el, a gomba nemesrothadást, a szemek töppedését, aszusodását okozza (4.5. ábra).



4.5. ábra: A *Botrytis cinerea* porzó konídiumtömege a paprikaszár és a szőlőfürt rothadó szövetein (forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, tömlősgomba, amely ivaros spóráit tölcsér alakú apotéciumokon fejlődő aszkuszkokban képezi. Ivartalan spórákat – konídiumokat – nem képez (Saharan & Naresh Mehta 2008).

Az egyik leginkább polifág gombafaj. Fertőzi egyebek között a napraforgót, repcét, mustárt, babot, sárgarépat, paradicsomot. Mintegy négyszáz termesztett és vadonélő gazdanövényén fehérpenészes rothadást okoz. Egyszikűeket nem betegít meg. A fertőzött részeken nagyméretű, barnán rothadó foltok jelennek meg, amelyeken nedves, csapadékos időben hófehér, vattaszerű micélium fejlődik. A szövetek helyén, illetve a növény felületén a micéliumszövedékben a gomba több éves fennmaradását biztosító kemény, fekete micéliumtömörülések, szkleróciumok tömege képződik. Az ezekből hajtó micélium a gazdanövény szártövét és gyökereit fertőzi. A talajfelszín közelében elhelyezkedő szkleróciumok karpogén, azaz ivaros termőtesteket – apotéciumokat – produkáló csírázása során aszkospórák képződnek, amelyek kilövellésüket követően a légáramlatok segítségével magasabban elhelyezkedő szárrészekre, vagy a napraforgó tányérjára is eljuthatnak. Kedvező, a kórokozó ökológiai igényeinek megfelelő csapadékos időjárásban, fogékony fajtákon a termésveszteség elérheti a 100%-ot (4.6. ábra).



4.6. ábra: A fehérpenészes rothadás tünetei fejessalátán (balra, forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013), szklerotiniás tányérfertőzés következménye napraforgón (jobbra, forrás: Kovács B., NYME MÉK, 2013).

Plasmopara viticola (Berk. & Curt ex de Bary) Berl. & de Toni, oospóras gombaszerű szervezet (Pearson & Goheen 1998).

A szőlőperonoszpóra kórokozója. Csak a *Vitaceae* család fajait fertőzi. Feltételezhetően a filoxéra leküzdése végett Észak-Amerikából származó szőlővessző szállítmányokkal jutott Európába. Magyarországon 1880-ban írták le megjelenését. Gyorsan terjedt a magyar borvidéken, néhány év alatt egyharmadára csökkentve a bortermést. Járványkeltő képessége mind a mai napig nem csökkent.

A kórokozó a fiatal levelek sztómáin behatolva az intercelluláris járatokban terjed. A mezofillum sejtjeiből táplálkozva a levél színén sárgászöld, kerekded „olajfoltok” megjelenését okozza. Ezek fonákán fehér sporangiumtartó gyp, rajtuk a kórokozó ivartalan szaporítóképleteinek tömege jelenik meg. Nedves időjárásban a sporangiumokból kiszabaduló rajzóspórák újabb fertőzéseket indítanak el. Később a foltok szövetei elhálnak. Az idősebb leveleken a foltok szögletesek, a fertőzött levelek lehullanak. A fiatal bogyók fertőződését a levelekéhez hasonló penészkiverődés kíséri. A bogyók elszáradnak. Később a fürt fertőződését követően a bogyók lilás színt mutatnak, majd sporuláció nélkül elszáradnak. A fiatal hajtásrészek is fertőződnek. Járványos években a termésveszteség elérheti a 80-100%-ot (4.7. ábra).



4.7. ábra: „Olajfoltok” a szőlő levelén (balra, forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013), sporuláló *P.viticola* a szőlőfürtön (jobbra, forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary, petespórás gomba (Erwin & Ribeiro 1996).

A kórokozó által okozott burgonya- és a paradicsomvész e növények világszerte legveszedelmesebb, legnagyobb gazdasági kárral fenyegető betegsége (4.8. ábra). Európába 1845-ben hurcolták be feltételezett őshazájából, Mexikóból. Írorszában, ahol ebben az időben a szegényebb rétegek fő tápláléka a burgonya volt olyan mértékű termésveszteséget okozott, hogy a fellépő élelmiszerhiány miatt mintegy egy millió ember halt éhen és közel ennyien vándoroltak ki Amerikába az éhínség és a betegségek előtt. Magyarországon a kórokozó jelenléte 1846 óta ismert. Minden évben fertőz és az ökológiai feltételektől, a fajták ellenállóságától valamint a védekezés sikerétől függő mértékben veszteségeket okoz. A kórfolyamatnak kedvező – mérsékelt meleg, csapadékos – időjárási feltételek mellett, fogékony fajtákon a termésveszteség ma is elérheti a 80-100%-ot, a teljes lombvesztés és súlyos gumófertőzés következtében.



4.8. ábra: A *Phytophthora infestans* tünetei a burgonya zöld részein (balra, forrás: Érsek T.) és a paradicsom bogyóján (jobbra, forrás: Németh L., NYME MÉK, 2013).

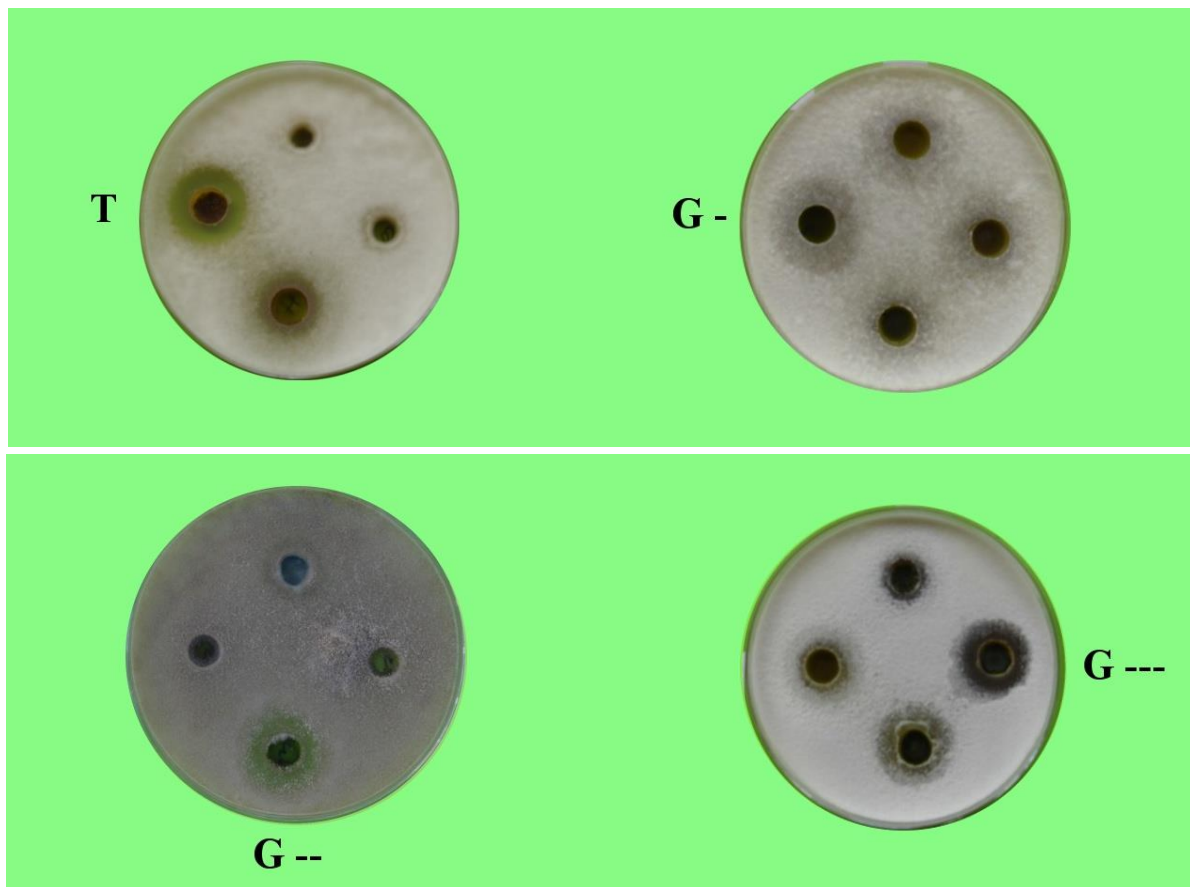
4.2.3. Bioteszt eljárások fungicid és fungisztatikus hatás kimutatására

Agar géldiffúziós módszer

A módszerrel algakivonatok hatását vizsgáltuk nekrotróf kórokozók micéliumnövekedésére. A tesztelt kórokozókat burgonya-dextróz agaron (PDA, Atlas 2004) tartottuk fenn, kivéve a *Phytophthora infestans*-t, amelynek fenntartásához borsóagar táptalajt (Shattock et al. 1990) választottunk (**melléklet M4.2. táblázat**). A tenyészeteket szobahőmérsékleten tartottuk. A vizsgálatokhoz 10-12 napos kultúrákról lemosott, micélium- és/vagy konídium-szuszpenziót használtunk. A mikroalgák micéliumnövekedésre gyakorolt hatását *in vitro*, fertőzött agarban végzett géldiffúziós tesztben vizsgáltuk (Aponyiné és Garamvölgyi 1997). A módszer egyszerűen kivitelezhető, ugyanakkor megbízható és reprodukálható eredményeket ad.

A frissen készített, autoklávban sterilizált táptalajt 45 °C-ra hűtve vízfürdőben tartottuk. A ferde agarról steril desztillált vízzel lemosott konídium- és/vagy micélium-szuszpenziót – 10^5 propagulum cm^{-3} – a táptalajba kevertük, majd a fertőzött agarból 25-25 cm^3 -t mértünk 90 mm átmérőjű Petri csészékbe. A megszilárdult gélbe 9 mm-es dugófúróval lyukakat vájtunk. A lyukakba 150 μL – 10 mg SZA cm^{-3} koncentrációjú – alga szuszpenziót pipettáztunk. A Petri csészéket szórt fényen, laborhőmérsékleten tartottuk. A kísérleteket négy ismétlésben végeztük. Az első értékelés 72 órával a kísérlet beállítása után történt. A méréseket újabb 24 és 48 óra elteltével megismételtük. A teljes gátlási zóna átmérőjét mértük. Feljegyeztük a gombák növekedését gátló (fungisztatikus, fungicid), illetve serkentő hatást. A fungisztatikus hatás erősségét 1-3 – (mínusz) jellel, a stimulálóét 1-3 + (plusz) jellel értékeltük. Az egy mínusz jel (G-) gyenge, a kontrolltól alig különböző micéliumfejlődést, minimális növekedésgátlást jelez. A három mínuszra értékelt (G---) fungisztatikus hatás a micélium növekedésének szinte teljes, a fungicid hatáshoz hasonló gátlását jelenti (**4.9. ábra**). Ebben az esetben azonban a gátlási zónán belül a gombaképletek még nyomokban megjelennek, míg a fungicid (T) hatásnál a

gátlási zóna tiszta, micélium mentes. A stimuláló hatás a kontrollnál erőteljesebb micélium növekedést jelent, amit S+, S++ és S+++ jelöléssel jegyeztünk fel.



4.9. ábra: Az agar géldiffúziós módszer értékelésénél használt jelölésekhez tartozó hatások.
T: fungicid; G-: gyenge, G--: közepes és G---: erős micélium növekedés gátlás.

Szőlőperonoszpóra bioteszt

A módszerrel algakivonatok hatását vizsgáltuk a szőlőperonoszpóra, *Plasmopara viticola* sporulációjára. A szőlőperonoszpóra kórokozója biotróf parazita. Kizárólag élő növényen, vagy növényi szöveten tartható fenn és vizsgálható. Az algakivonatok sporulációra gyakorolt hatását ezért levélkorongokon és egész leveleken vizsgáltuk (**4.10. ábra**).

Nedves szűrőpapírra helyezett, Kékfrankos szőlőfajta fás dugványairól származó fogékony levelek és levélkorongok fonák oldalát mikroalga kivonatokkal permeteztük le. A **2.2. alfejezetben** leírtak szerint jártunk el a mikroalga kivonatok készítésénél, vagyis a fagyasztva szárított mintából $10 \text{ mg SzA cm}^{-3}$ koncentrációjú desztillált vizes szuszpenziót készítettünk, amit ultrahangos sejtroncsolás után permeteztünk a 10 mm átmérőjű szőlő levélkorongokra, vagy levelekre. Száradás után a kezelt levélfelületet a *P.viticola* 10^4 zoosporangium cm^{-3} koncentrációjú szuszpenziójával inokuláltuk. A kontroll desztillált vízzel “kezelt” és sporangium szuszpenzióval fertőzött levél volt. A Petri csészéket laborkörülmények között inkubáltuk. A hetedik napon a fertőzött levélkorong/levélfelület méretét a kontroll százalékában értékeltük.



4.10. ábra: Szőlőperonoszpóra bioteszt levélkorongon és egész levélen.

4.3. Eredmények

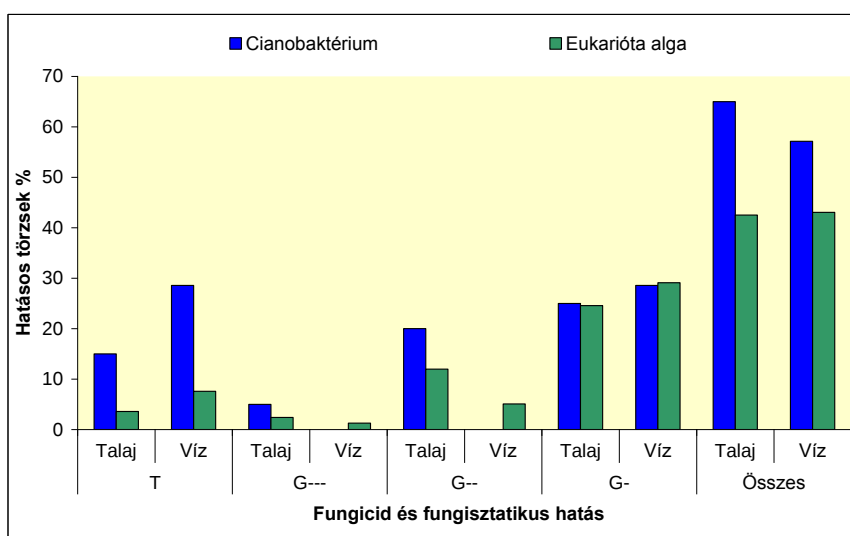
4.3.1. A rendszertani helytől függő hatás

Az MACC 280 vizsgált törzsének 45%-a, vagyis 126 törzs mutatott legalább egy növénypatogén gomba ellen legalább gyenge fungisztatikus hatást (**4.3. táblázat**). A 126 törzsből 19 fungicid hatású (T), 6 erősen (G---), 28 közepesen (G--) és 73 gyengén fungisztatikus (G-) törzs volt. A cianobaktériumok közül a Nostocales és Oscillatoriales rendbe, az eukarióta algák közül a Chlorophyceae és Trebouxiophyceae osztályba tartozik a hatásos törzsek 94%-a. A fungicid hatású (T) és az erősen gátló hatású cianobaktérium törzsek (G---) kizárólag a Nostocales rendbe tartoznak. A T és G--- hatású eukarióta algák pedig egy törzs kivételével a Chlorophyceae és Trebouxiophyceae osztály képviselői. A gátló hatás mellett találtunk 15 törzset, amelyek serkentették a micélium növekedést. Serkentést kizárólag az eukarióta algák okoztak. Tizenegy törzs gyengén (S+), 4 pedig közepesen serkentette a micélium növekedést.

A kilenc növénypatogén közül legalább egy patogénre ható algatörzsek számát összehasonlítva a vizsgált törzsek számával megállapítható, hogy több cianobaktérium törzs gátolta a micélium növekedést, mint eukarióta alga (**4.11. ábra**). Különösen kiemelkedő volt a fungicid hatású (T) törzsek között a cianobaktériumok aránya, a vizsgált 34 törzsből 7 mutatott fungicid hatást, míg a 246 vizsgált eukarióta törzsből 12. Az erősen gátló hatású (G---) 6 törzsnél viszont 5 eukarióta alga és egy cianobaktérium. A gyengén fungicid hatású törzseknél (G-) a vizsgált és a hatásos cianobaktérium és eukarióta törzsek közötti arány gyakorlatilag azonos, függetlenül attól, hogy cianobaktériumról vagy eukarióta algáról és függetlenül attól, hogy talajból vagy vízből izolált törzsről van szó. Összességében véve a cianobaktériumok nagyobb arányban hatásosak, mint az eukarióta algák, ezen belül pedig a talajból izolált cianobaktériumok a legnagyobb arányban hatásosak.

4.3. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen gátló hatású 126 mikroalga törzs taxonómiai helye és eredete.

Rend/Osztály	Eredet		Összesen
	Talaj	Víz	
Nostocales	9	6	15
Oscillatoriales	3		3
Synechococcales	1	1	2
Pseudanabaneales		1	1
Összes cianobaktérium	13	8	21
Chlorophyceae	48	26	74
Trebouxiophyceae	19	7	26
Ulvophyceae	3		3
Conjugatophyceae		1	1
Klebsormidiophyceae	1		1
Összes eukarióta alga	71	34	105
Mindösszesen	84	42	126



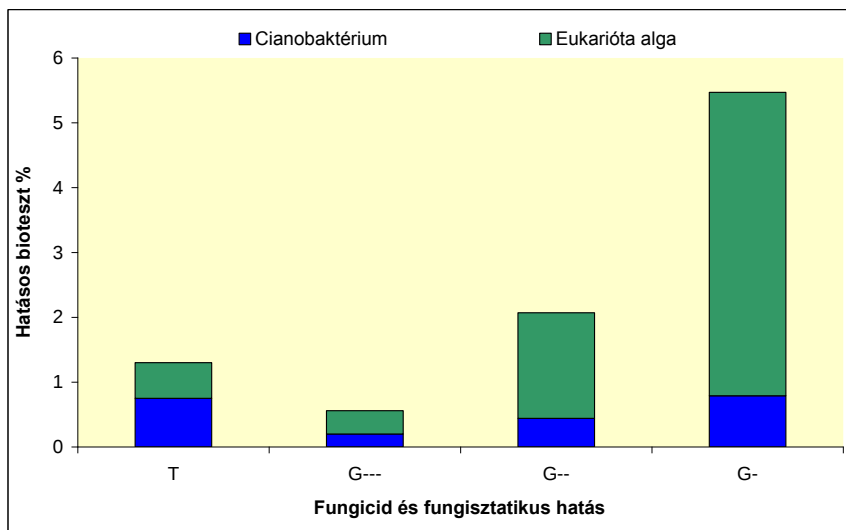
4.11. ábra: A kilenc növénypatogén közül legalább egy patogénre ható alगतörzs (126) a vizsgált cianobaktérium (20Talaj + 14Víz) és eukarióta alga (167Talaj + 79Víz) százalékában.

T: fungicid; G-, G--, G---: gyenge, közepes, erősen gátló hatás.

Kék oszlop: cianobaktérium; zöld oszlop: eukarióta alga.

A **melléklet M4.2. táblázata** szerint egy mikroalga nem csupán egy növénypatogén gomba ellen lehet hatásos. Növénypatogénként a mikroalga törzs hatásának a mértéke eltérő, pl. egyik patogénre csupán gyengén gátló, míg a másikra fungicid hatású. A 280 mikroalga törzsszel és a 9 növénypatogénnal összesen 2520 (280 x 9) biotesztet végeztünk, az ismétléseket

nem számítva. Ha a hatást mutató biotesztek számát viszonyítjuk az összes elvégzett bioteszt számához, akkor a cianobaktériumok jelentőségét másként értékelhetjük (**4.12. ábra**). A fungicid hatást mutató bioteszteknel a cianobaktériumok aránya nagyobb, mint az eukarióta algáké, de a gyengülő hatás irányába haladva (G---, G--, G-) folyamatosan nő az eukarióta algák aránya.



4.12. ábra: Mikroalgák (280 törzs) fungicid (T) és fungisztatikus (G---, G--, G-) hatást mutató biotesztjeinek az aránya az összes bioteszt (2520) százalékában. Kék oszlop: cianobaktérium; zöld oszlop: eukarióta alga.

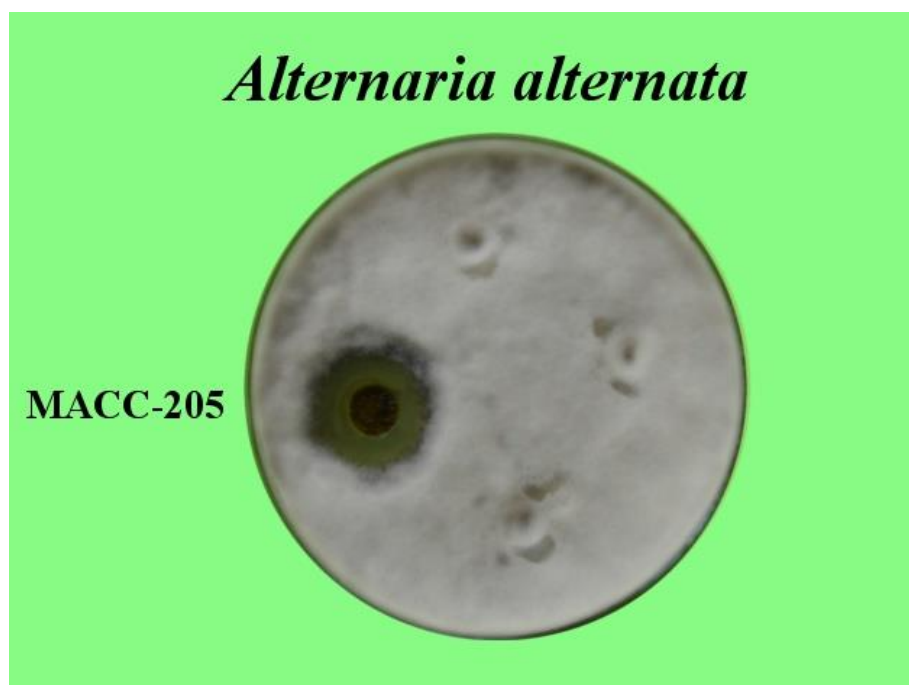
4.3.2. A patogének szerinti hatás

A növénypatogénekre különböző erősségű hatást mutató biotesztek számát a **4.4. táblázat** mutatja a fungicid hatású biotesztek számának csökkenő sorrendjében. A legtöbb (11) fungicid mikroalgát a *Phaeoramularia capsicicola* ellen találtuk, a legkevesebbet (1-1) a *Fusarium graminearum* és *Sclerotinia sclerotiorum* ellen. A táblázatban a két szélső értéket jelentő törzsek közötti sorrend a fungisztatikus hatásokra is általában jellemző: ha több a fungicid mikroalga, több a fungisztatikus mikroalga is. Kivételt jelent a *F.graminearum*, amelynél egy G---, 8 G-- és 40 G- hatású törzset is találtunk. A hatásos tesztek teljes száma 239, ami az összes biotesztnak közel 10%-a. A leghatásosabb 7 cianobaktérium és 12 eukarióta algatörzs növénypatogén gombák elleni hatását a **4.5. táblázatban** foglaltuk össze, ugyanezeknek a törzseknek a taxonómiai besorolását, eredetét és produktivitásának jellemzőit pedig a **4.6. táblázat** tartalmazza. A táblázatok szerint az MACC-304 *Anabaena sphaerica* 21 napos tenyésztése volt a leghatásosabb a növénypatogén gombák ellen, 6 fungicid hatást mutatott (**4.13. ábra**). A sorban a második az MACC-205 *Tolypothrix tenuis* 5 fungicid és egy erősen gátló (G---) hatással (**4.14. ábra**). A harmadik az MACC-612 *Nostoc entophyllum* 4 fungicid és egy közepesen gátló (G--) hatással (**4.15. ábra**). A fungicid törzsek szaporodása jelentősen eltér egymástól. A cianobaktériumok végső biomasszája az MACC-304 *A.sphaerica* 3,54 g L⁻¹ értékétől az MACC-150 *N.commune* 0,86 g L⁻¹ értékéig csökken (**4.6. táblázat**). Szinte

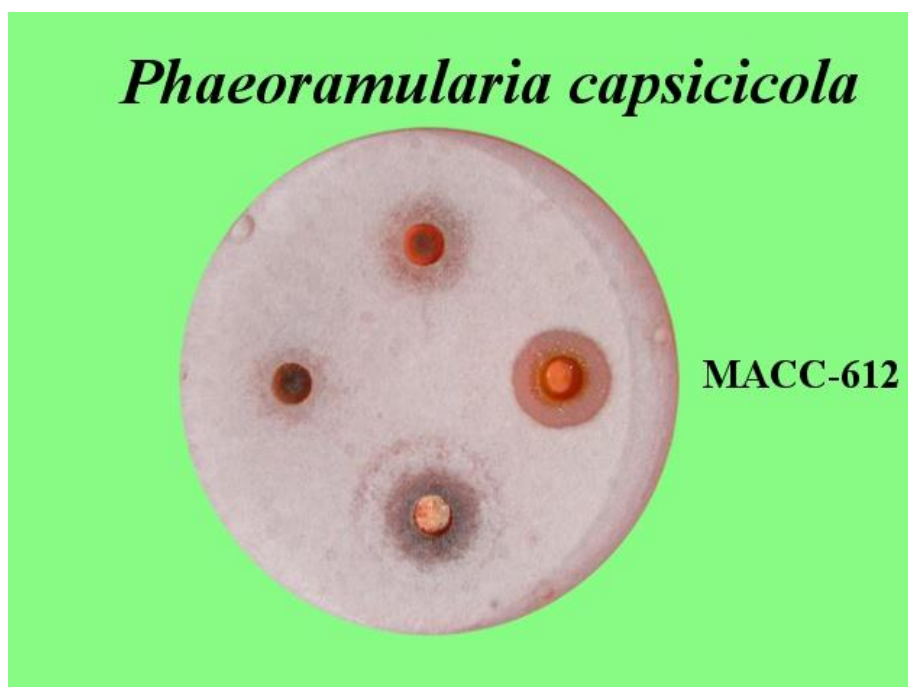
ugyanebben a tartományban változik a fungicid eukarióta törzsek elérhető legnagyobb biomasszája is.



4.13. ábra: Az MACC-304 *Anabaena sphaerica* fungicid hatása a *Rhizoctonia solani* növénypatogén gombára.



4.14. ábra: Az MACC-205 *Tolypothrix tenuis* fungicid hatása az *Alternaria alternata* növénypatogén gombára.



4.15. ábra: Az MACC-612 *Nostoc entophytum* hatása a *Phaeoramularia capsicicola* növénypatogén gombára.

A szőlőperonoszpóra elleni hatás tesztelésére külön módszert használtunk, ami élő levél igénye miatt egész évben nem végezhető. Más patogénekre hatásos algákkal kezdtük a tesztelést abban a reményben, hogy nagyobb eséllyel találunk hatásos mikroalgát. Feltevésünk helyesnek bizonyult, a vizsgált 15 mikroalga törzsből 3 zöldalga volt fungicid hatású:

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1. Kontroll | fertőzés mértéke: 86,5±5,1 |
| 2. MACC-14 <i>Coelastrella</i> sp., Trebouxiophyceae | fertőzés mértéke: 11,5±3,4% |
| 3. MACC-302 <i>Scenedesmus</i> sp., Chlorophyceae | fertőzés mértéke: 5,5±1,3% |
| 4. MACC-76 <i>Pseudococcomyxa</i> sp., Trebouxiophyceae | fertőzés mértéke: 3,4±0,8% |

4.4. táblázat: Növénypatogén gombákra biotesztekkel kimutatott fungicid (T), valamint erősen (G---), közepesen (G--) és gyengén (G-) gátló hatású MACC törzsek.

Patogének	T	G---	G--	G-	Összesen
<i>Phaeoramularia</i>	11	2	18	39	70
<i>Pythium</i>	5	4	8	25	42
<i>Botrytis</i>	4	2	9	22	37
<i>Alternaria</i>	4	2	3	7	16
<i>Rhizoctonia</i>	3		2	4	9
<i>Plasmopara</i>	3				3
<i>Phytophthora</i>	2	3	1	1	7
<i>Fusarium</i>	1	1	8	40	50
<i>Sclerotinia</i>	1		1	3	5
Összesen	34	14	50	141	239

4.5. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen fungicid hatású 19 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--; G---: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; a jelek utáni számok a fungicid/gátlási zóna mm-ben kifejezve

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
Ciano-baktériumok									
MACC-304	T-13	G-20(--)	T-13	T-13	T-13	T-13	T-12		
MACC-612	T-9	T-9		T-9	T-9	G-10(-)			G-12(--)
MACC-465		G-12(-)	G-18(-)	T-15	T-13	G-13(-)			
MACC-205	T-19	G-23(-)	T-17	T-17	T-24	T-5			G-25(---)
MACC-661				G-18(-)	T-13	G-20(-)			
MACC-251	T-19			G-16(--)		G-20(---)	G-14(-)		
MACC-150				G-15(---)	T-23				G-25(---)
Eukarióta algák									
MACC-339		G-12(-)		T-20	T-20	G-21(---)			
MACC-343				G-22(---)	T-25				
MACC-540	G-10(---)	G-20(-)			T-14				
MACC-682	G-21(---)	G-21(--)	T-13	G-21(--)	G-21(--)				
MACC-9		G-12(-)	G-13(-)	G-34(-)	G-17(-)	T-10			
MACC-10		G-35(-)		G-22(--)	G-24(-)	T-14			T-24
MACC-14					G-21(-)			T	
MACC-302		G-16(-)						T	
MACC-76		G-12(-)	G-17(-)		G-18(-)			T	
MACC-147		G-25(-)			T-21				G-20(-)
MACC-151				G-13(-)	T-22	G-15(-)			
MACC-90		G-28(--)		G-25(--)	G-23(--)				T-25

4.6. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen vizsgált 19 fungicid hatású mikroalga törzs taxonómiai helye, eredete és produktivitásának jellemzői. T: talaj; V: víz.

Osztály/rend	Nemzetség/faj	MACC	Eredet	Tápoldat	Biomassza (g L ⁻¹)
Cianobaktériumok					
Nostocales	<i>Anabaena sphaerica</i>	MACC-304	orosz, V	Tamiya	3,54 (21 nap)
Nostocales	<i>Nostoc entophytum</i>	MACC-612	cseh, V	Tamiya	3,14 (12 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix sp.</i>	MACC-465	brazil, T	Zehnder 8	2,16 (8 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix tenuis</i>	MACC-205	német, V	Zehnder 8	1,98 (15 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-661	cseh, T	Tamiya	1,86 (10 nap)
Nostocales	<i>Trichormus variabilis</i>	MACC-251	szerb, T	BG-11 (N-free)	1,04 (14 nap)
Nostocales	<i>Nostoc commune</i>	MACC-150	magyar, V	Zehnder 8	0,86 (8 nap)
Eukarióta algák					
Trebouxiophyceae	<i>Chlorella minutissima</i>	MACC-339	brazil, T	Tamiya	3,36 (13 nap)
Chlorophyceae	<i>Desmococcus olivaceus</i>	MACC-343	brazil, T	Tamiya	2,8 (14 nap)
Chlorophyceae	<i>Acutodesmus sp.</i>	MACC-540	magyar, T	Tamiya	2,54 (13 nap)
Chlorophyceae	<i>Fernandinella alpina</i>	MACC-682	brazil, T	Tamiya	2,44 (15 nap)
Chlorophyceae	<i>Acutodesmus sp.</i>	MACC-9	orosz, V	Tamiya	2,07 (8 nap)
Chlorophyceae	<i>Lobochlamys segnis</i>	MACC-10	cseh, V	Bristol	1,99 (8 nap)
Trebouxiophyceae	<i>Coelastrella sp.</i>	MACC-14	orosz, V	Tamiya	1,87 (8nap)
Chlorophyceae	<i>Scenedesmus sp.</i>	MACC-302	cseh, V	Zehnder 8, Tamiya	1,68 (9 nap)
Trebouxiophyceae	<i>Pseudococcomyxa sp.</i>	MACC-76	cseh, T	Bristol	0,97 (8 nap)
Trebouxiophyceae	<i>Stichococcus bacillaris</i>	MACC-147	orosz, V	Tamiya	0,91 (8 nap)
Trebouxiophyceae	<i>Chlorella minutissima</i>	MACC-151	brazil, T	BG-11 (N-free)	0,86 (8 nap)
Chlorophyceae	<i>Haematococcus pluvialis</i>	MACC-90	cseh, V	Bristol	0,8 (8 nap)

4.4. Eredmények megvitatása

4.4.1. Mikroalgák antimikrobiális hatása

A mikroalgák növénypatogén gombákra gyakorolt fungisztatikus hatása nem elhanyagolható, de fungicid hatásának van igazán gyakorlati jelentősége. A 280 MACC mikroalga törzs vizes kivonatának tesztelésekor 19 fungicid hatású mikroalgát találtunk, 7 cianobaktériumot és 12 eukarióta algát. A vizsgált cianobaktérium törzsek összesen 20%-a mutatott fungicid hatást, míg az eukarióta algáknak csupán 5%-a. A különbség négyszeres, ami indokolhatja cianobaktériumok biológiailag aktív anyagainak a kutatását (Burja et al. 2001, Kellam et al. 1988, Kulik 1995, stb.). Az eukarióta algákkal szemben a cianobaktériumok jelentős előnye részben toxintermelésükre vezethető vissza, amit Skulberg (2000) eredményei is igazolnak. Skulberg tizenhét toxintermelő és 9 nem toxikus cianobaktériumot tesztelt 6 baktériummal szemben. A toxintermelők 72%-ában, a toxint nem termelőknek pedig csupán a 44%-ában talált antibakteriális hatást. Az eukarióta algák bevonása a tesztelésbe különös eredményekre vezethet. A *Plasmopara viticola* ellen hatásos három eukarióta zöldalga törzset nem találtuk volna meg, ha csupán a cianobaktériumokra koncentrálnánk. Ezért is megfontolandó Borowitzka (1995) kiállása az eukarióta algák tesztelése mellett.

Az élőhely szerepéről feltételeztük, hogy a talajalgák, a szélsőséges környezeti feltételek miatt több, számunkra hasznos másodlagos anyagcsere terméket állítanak elő, amit az eredmények csupán részben igazoltak. Az összes vizsgált talajalgának és vízből izolált algának pontosan a 45-45%-a mutatott legalább gyenge gátló hatást (G-) legalább egy növénypatogén gombára. Ha csupán a fungicid hatású törzseket vesszük figyelembe, akkor a vízből izolált mikroalgák között kétszer annyi volt hatásos, mint a talajból izoláltak között. A talajból izolált cianobaktériumok 15%-a, a vízből izoláltaknak pedig csaknem a kétszerese, 28%-a volt fungicid. A talajból izolált eukarióta alga törzsek 3,6%-a, a vízből izoláltaknak pedig valamivel több, mint a kétszerese, 7,6%-a volt fungicid hatású legalább egy növénypatogén gombára. Fellelhető ugyan talajalgák tesztelésére vonatkozó irodalom (Pawar & Puranik 2008), de megállapításunk összevetésére alkalmas számadatokat nem, csupán általános megállapításokat találunk a talajból izolált cianobaktériumok és a tengeriek kiemelt jelentőségéről, mint bioaktív anyagok forrásáról (Hirata et al. 2000).

A növénypatogén gombákra fungicid cianobaktériumok a Nostocales rendbe tartoznak, három a *Nostoc*, kettő a *Tolypothrix*, egy az *Anabaena* és egy a *Trichormus* nemzetségbe. A leghatásosabb az MACC-304 *Anabaena sphaerica* volt, összesen 6 növénypatogén gomba ellen mutatott fungicid hatást. Gombák ellen hatásos *Anabaena* törzsekről többen is beszámolnak. Az *Anabaena* nemzetségben az *A.laxa* antifungális (Frankmölle et al. 1992), valamint baktériumok és gombák elleni antimikrobiális hatását is leírták (Gupta et al. 2013). Az *A.laxa*-val sikerült két *Fusarium* faj ellen megvédeni a paradicsomot (Prasanna et al. 2013), de esetünkben az MACC-304 *A.sphaerica* csupán fungisztatikus hatású (G--) volt a *F.oxysporum*-ra. Prasanna és munkatársai (2013) paradicsom növényt kezeltek és a hatás kialakulásakor a növény védekező képességének a fokozását is kiemelték. Ez a pótlólagos hatás az agar

gél diffúziós bioteszten nem érvényesülhet. Az *Anabaena variabilis* szerves oldószeres kivonata antibakteriális hatást mutatott (Bhateja et al. 2006).

A bioteszten eredmények szerint a másik leghatásosabb törzs az MACC-205 *Tolypothrix tenuis*, összesen 5 gomba ellen volt fungicid hatású. Humánpatogénekre hatásos *T.tjipanasensis* törzsről számolnak be Bonjouklian és munkatársai (1991). Neuhoof és munkatársai (2005) elsőként írtak le egy *Tolypothrix* törzsből olyan ciklusos peptidet, ami zsírsav és szénhidrát gyököt is tartalmaz: a „hassallidin A”-t, aminek gombaellenes hatása volt az *Aspergillus fumigatus* és a *Candida albicans*-ra is. A hassallidin nagy kémiai változatosságban fordul elő és nem csupán a *Tolypothrix* fajokban, hanem a fonalas cianobaktériumokban általában, beleértve az *Anabaena*- és *Nostoc*-fajokat is. Szerepük a vízvirágzást okozó cianobaktériumok védelme a parazita gombák ellen (Vestola et al. 2014).

Nem csupán a biotesztekben, hanem – az értekezésben nem tárgyalt – szabadföldi kísérletekben is hatásosnak bizonyult az MACC-612 *Nostoc entophyllum*, amely 4 növénypatogén gomba ellen mutatott fungicid hatást. A *Nostoc* számos fajáról/törzséről írtak le gombaellenes hatást. A *Nostoc linckia* metanolos kivonata 30%-kal csökkentette a *Fusarium oxysporum* micélium növekedését (Perveen & Alwathnani 2013). A *Nostoc muscorum* fenol vegyületei voltak felelősek a fungisztatikus hatásért humánpatogén gombákkal szemben (Cano et al. 1990). A *N.muscorum* extracelluláris termékei a *Rhizoctonia solani* 77,5%-os gátlását okozták. A *Nostoc commune* extracelluláris terméke antimikrobiális hatású diterpén (Jaki et al. 2000). A *N.insulare* gombaellenes hatású norharmant bocsát ki a környezetébe (Volk 2007).

A bioteszten célja nem terjedt ki a hatásért felelős vegyületek meghatározására, de a gátlási zónák lehetőséget adnak általános megjegyzésekre (4.5. táblázat). Feltűnő, hogy a

4.5. táblázat: Növénypatogén gombákra biotesztekkel kimutatott fungicid (T), valamint erősen (G---), közepesen (G--) és gyengén (G-) gátló hatású MACC törzsek gátlási zónáinak mérete (mm).

Vizsgált növénypatogén	T	G---	G--	G-
<i>Phaeoramularia</i>	9-25	16-21	15-25	10-30
<i>Fusarium</i>	9	15	14-29	10-45
<i>Pythium</i>	9-20	15-22	16-25	10-34
<i>Botrytis</i>	14-15	20-21	10-18	9-20
<i>Alternaria</i>	9-19	10-21	16-17	10-25
<i>Rhizoctonia</i>	13-17		15-22	13-18
<i>Sclerotinia</i>	12		18	12-15
<i>Phytophthora</i>	24-25	20-25	12	20

fungicid (T) mikroalga törzsek gátlási zónái a *Phaeoramularia* és a *Phytophthora* kivételével kisebbek mint a gyengén fungisztatikus hatású mikroalgák gátlási zónái. A gátlási zóna méretét több tényező befolyásolja, egyebek között az agar kémiai és fizikai tulajdonságai, továbbá az antimikrobiális hatásért felelős molekula mérete és ionos töltése (Crosby 1991). A gátlási zóna

méretét az agar tápközeg pH-ja is befolyásolja. Ostensvik és munkatársai (1998) ugyanannál a kivonatonál nagyobb gátlási zónát mértek, ha kisebb volt a pH-érték. Esetünkben a fungicid hatású mikroalga kivonatoknál a gátlási zónák kis mérete kevésbé mozgékony (nagyobb méretű, vagy töltéssel rendelkező) molekula jelenlétére utalhat. A fungisztatikus, főleg a gyengén fungisztatikus (G-) mikroalgák gátlási zónáinak tág határai miatt feltételezhető, hogy agarban könnyen elmozduló és/vagy több hatásos molekulával van dolgunk.

4.4.2. Biológiai növényvédelem mikroalgákkal

A növényeket számos természetes ellenség veszi körül, beleértve a vírusokat, baktériumokat és gombákat is. A növénypatogének a növekedésükhöz és szaporodásukhoz szükséges tápanyagokat a növényi gazdasejtből vonják ki. A nekrotróf patogének elpusztítják a sejtet és ezután vagy eközben veszik fel belőle a tápanyagokat. A biotróf patogének együtt élnek a növényi sejtrel és az élő sejtől veszik fel a számukra szükséges tápanyagokat. A növények nem tudják elkerülni a támadást csak úgy ha védekeznek ellene, például speciális másodlagos anyagcsere termékek termelésével.

A növények képesek a patogének felismerésére és védekező mechanizmus beindítására, amely korlátozza a patogének szaporodását. Ehhez három növényi hormonra van szükség a szalicilsavra (SA; Loake & Grant 2007), ami a biotróf patogének elleni védekezést indítja be, valamint a jázmonsavra és az etilénre (JA/ET; Glazebrook 2005), ami a nekrotróf patogének elleni védekezést aktiválja. A két védekezési út (SA és JA/ET) egymással antagonisztikus kapcsolatban áll. Az auxinok, citokininek és gibberellinek a növény növekedését szabályozzák, de stresszhelyzetben befolyásolják az SA és JA/ET jelátviteli utat is. Az auxinok képesek elnyomni az SA utat (Robert-Seilanianantz et al. 2011), míg a gibberellinek serkentik azt (Navarro et al. 2008). A citokinin hatása koncentrációtól függ, nagy koncentrációjuk ($>10\mu\text{M}$) pozitívan befolyásolja az SA utat, míg ennél kisebb koncentrációjuk negatívan (Choi et al. 2010, Argueso et al. 2012). Jóllehet a hormonok egymást kiegészítő vagy gátló hatása miatt a folyamat bonyolultabb, mégis megállapították, hogy a gyökérszónában élő növényi növekedést serkentő baktériumok (PGPR) hormonjaik révén kedvezően befolyásolják a növények növekedését és segítik a patogénekkal szembeni védekezésüket (Lugtenberg & Kamilova, 2009). A mikroalgák, a növénypatogénekre gyakorolt közvetlen hatásuk mellett növényi hormontermelésükkel is hozzájárulhatnak a növények védekezéséhez. A mikroalgák komplex hatása abban nyilvánul meg, hogy hormontermelésükkel befolyásolják a növények növekedését és fejlődését, valamint beindíthatják a növények patogénekkal szembeni védekező mechanizmusát, kontakt hatásukkal pedig gátolják, vagy elpusztítják a növénypatogéneket.

A vizsgálataink során kiválasztott mikroalgák növénypatogén gombákkal szembeni kontakt fungicid vagy fungisztatikus hatását mutattuk ki. A mikroalgák 10 mg SzA cm^{-3} vizes kivonatában lévő hatóanyag, vagy hatóanyagok közvetlenül hatottak a növénypatogénekre. A 19 fungicid hatású mikroalga kijuttatása a növényekre helyettesítheti, kiválthatja a szintetikus növényvédőszeret. A védekezési mód azonban, környezetbarát jellege ellenére alig különbözik a hagyományos növényvédelmi eljárásoktól. A mikroalgával kezelt, majd

növénypatogén gombával fertőzött növény lényegesen összetettebb rendszer, amelyben a mikroalgák által termelt poliszacharidok, zsírsavak, peptidek, stb. elicitor molekulaként növényi védekező reakciókat indukálhatnak (Prasanna et al. 2013, Prashar et al. 2014). A növény/talaj rendszer mikroalgákkal történő kezelésénél további kérdés, hogy élő vagy élettelen, feltárt algasejtek szuszpenziójával történjen a kezelés? A növényvédő hatású alga-termék eltarthatósága szempontjából az elhalt, feltárt algasejtek száraz, por alakú változata látszik gyakorlatiasabb megoldásnak. Nem kizárható azonban a megtermelt algaszuszpenzió koncentrációja, feltárása, tartósítása és szuszpenzió formájában készült alga termék forgalmazása és felhasználása sem. Újszerű megoldást kínál a sztómákon keresztül a levél mezofill részébe bejutó, apró élő algasejtekből álló szuszpenzió kijuttatása, amelyek a levéllel együtt élve fejtik ki hatásukat. Élő sejtek felhasználása, valamint a mikroalgákban lévő potenciális elicitor molekuláknak az alkalmazása előtt azonban még a növény-patogén-alga rendszer működésének további alapos kutatására és megismerésére van szükség.

4.5. Új tudományos eredmények

Agar géldiffúziós biotesztekkel a Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény 280 mikroalga törzsét vizsgáltuk 9 növénypatogén gombával szemben. Minden patogénre legalább egy, összesen 19 fungicid hatású mikroalgát találtunk. A legtöbb fungicid mikroalgát a *Phaeoramularia capsicicola* (11), a *Pythium ultimum* (5), a *Botrytis cynerea* (4) és az *Alternaria alternaria* (4) ellen találtunk. A *Plasmopara viticola* ellen 3 erősen gátló hatású zöldalgát találtunk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek 45%-a legalább gyengén fungisztikus hatást mutatott legalább egy patogénnel szemben, ezért feltételezhető, hogy a mikroalgák többsége, ha nem minden mikroalga képes antimikrobiális anyagok termelésére valamilyen mikroszervezettel szemben. Fungicid hatású volt:

- a vizsgált cianobaktériumok 20%-a és az eukarióta algák 5%-a,
- a cianobaktériumok közül a talajalgák 15%-a és a vízből izolált algák 28%-a,
- az eukarióta algák közül a talajalgák 3,6%-a és a vízből izolált algáknak a 7,6%-a.

Az eredmények alapján vízből izolált cianobaktériumoktól várható a nagyobb antifungális hatás, ezért az MACC bővítése ebben az irányban célszerű. A fungicid biotesztek aránya az összes elvégzett bioteszten belül 1,2%, vagyis átlagosan mintegy 85 biotesztet kell elvégezni ahhoz, hogy egy fungicid eredményt kapjunk. A cianobaktériumok hátránya az eukarióta algákkal szemben a lassúbb szaporodás és a többnyire nem homogén szuszpenzió (lásd *Nostoc* és *Tolypothrix* törzsek), ami a fungicid cianobaktériumok gyakorlati felhasználását megnehezíti. Az eukarióta algák felhasználása mellett szól gyors szaporodásuk és esetenként specifikus hatásuk, például a *Plasmopara viticola* ellen.

Tervek, jövőkép

A biotesztekkel kiválasztott fungicid mikroalga törzsek növénypatogén gombák elleni hatásának a stabilitását a környezeti tényezők függvényében már most is vizsgáljuk egy konzorciumi projekt keretében. A hatásért felelős poliszacharidok, zsírsavak, fenol vegyületek, stb. termelése a mikroalgákban a környezeti feltételekkel változtatható. Tervezzük ugyanazon mikroalga különböző összetételű biomasszáinak az előállítását és tesztelését, ami igazolhatná ezeknek a vegyületeknek a jelentőségét a hatás kialakulásában. A biotesztek eredményei alapján célszerű lenne elsősorban vízből származó további cianobaktériumok izolálása. A vizes extraktumok mellett metanolos, vagy szerves oldószerek keverékével történő extrahálás és a kivonatok tesztelése több hatásos mikroalga kiválasztásához vezethetne.

5. Illékony szerves vegyületeket termelő MACC-törzsek a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben

5.1. Irodalmi áttekintés

5.1.1. Mikroalgák illékony szerves vegyületei

A cianobaktériumok és az eukarióta algák biológiailag aktív vegyületekben gazdagok, amelyek egy része emberre és más szervezetekre mérgező, toxikus anyag (Cannell, 1933). A toxinok vízben oldhatók, nem illékonyak és szagtalanok, ezért a fogyasztó számára érzékszervileg nem felismerhetők (Codd 1995, Carmichael 1997, stb.). A mikroalgák íz- és szaganyagai (T/O), illékony szerves vegyületei (AVOC) ugyanakkor az emberre nem veszélyesek. Az AVOC többsége másodlagos anyagcsere termék vagy a sejtek bomlása során keletkező melléktermék, ami arra utal, hogy ezek a vegyületek, vagy prekursoraik és származékaik aktívan részt vesznek a fajon belüli, vagy fajok közötti kémiai jelátvitelben. Az AVOC kezdeményezője, vagy visszatükröződése lehet a közösséget formáló szervezetek szerkezeti, vagy dinamikai változásainak.

Az algákban előforduló illékony szerves vegyületek száma 200 körül van (Watson 1999). Az algák és mikroalgák legtöbb rendszertani csoportja termel AVOC anyagokat, de egyikükre sem lehet jellemző „organoleptikus ujjlenyomatot” megadni. Az AVOC anyagok prekursorai és szintézis útjai ugyanis nem specifikusak, bár ennek a megállapításnak az érvényességét csökkenti az, hogy az eredmények többsége nem axénikus tenyészetből származik (Persson 1988). Nagy eltérések vannak az egyes rendszertani csoportokban előforduló vegyületekben. Kén vegyületek elsősorban a cianobaktériumokban, kisebb részben a zöldalgákban, terpenoidok mindkettőben egyformán előfordulnak. A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) származékai a cianobaktériumokban, a zöldalgákban és a kovamoszatokban találhatók leginkább (Watson 2003). A PUFA-származékok miatt a kovamoszatok halszagot árasztanak, a zöldalgákra pedig a fűszag jellemző, amit az alifás szénhidrogének és a terpenoidok okoznak. Az AVOC anyagok között három nagy csoport, a terpének, zsírsavak és a kén vegyületek okozzák a legsúlyosabb vízminőségi problémát a vizet használó ember számára.

Terpenoidok – geozmin, metilizo borneol és nor-karotinoidok

A terpenoidok (a terpén származékok izoprének vagy 2-metil-1,3-butadién többszörösei) a másodlagos anyagcsere termékek legnagyobb csoportja, amelyek élőlények széles körének a kémiai kommunikációjában játszanak szerepet (Harborne & Tomas-Barberan 1989, Harrawijn et al. 2001, stb.). Az édesvízi mikroalgák többsége szintetizál terpenoidokat. Termelésük az aktív szaporodás teljes ideje alatt folyamatos, de az intracelluláris raktárakból a felszabadulás a szaporodás stacioner szakaszában következik be. Az extracelluláris és intracelluláris szaganyagok egymáshoz viszonyított mennyisége idővel jelentősen változik, amit befolyásol a faj és a környezete közötti kapcsolat (Möhren & Jüttner 1983, Rashash et al. 1995).

Két aliciklusos szeszkviterpenoid, a geozmin és a 2-metilizoborneol (MIB) a vizek két leggyakoribb illékony szerves vegyületei (Jüttner & Wattson 2007). Nagyon erős, föld-penész-iszap szagot árasztanak, aminek érzékelhető határértéke 10 ng L^{-1} -nél kisebb. A mikroalgák között a geozmint és a MIB-et kizárólag bizonyos cianobaktériumok képesek termelni (Tabachek & Yurkowski 1976). Kétezerből ötvennél kevesebb fajról bizonyosodott be, hogy termeli a két illékony szerves vegyületet. A felszíni vízvirágzásokat tekintik általában az AVOC forrásainak, de a cianobaktériumok jelentős része nem planktonikus, hanem az üledéken és növényeken, vagy a talaj felszínén él. A geozmint és a MIB-et úgy tűnik, hogy csak fonalas cianobaktériumok termelik, a Chroococcales rendbe tartozó fajok nem. A Nostocales rendbe tartozó fajok közül kilencről írták le a geozmin és csupán egy fajról a MIB termelést. Ezzel szemben több Oscillatoriales fajról (~30) ismert a geozmin és MIB termelés; a fajok rendszerint csupán az egyik AVOC anyagot termelik, mindössze 4 termeli mindkettőt (Smith et al. 2008, Watson 2003).

A cianobaktériumok egy részéről megállapították, hogy tenyészetben hirtelen elkezd, vagy abbahagyja a geozmin vagy a MIB termelését, ami arra utal, hogy mindkét AVOC anyag termelése indukálható vagy megállítható. A környezeti tényezők (fényintenzitás, hőmérséklet, ionkoncentráció, stb.) változtathatják az AVOC anyagok termelésének mértékét (Jüttner & Watson 2007). Nyilvánvaló, hogy a geozmin és a MIB termelésének képessége komplex jelenség, ami lényegesen változik fajok között és fajon belül is. Mikroszkópi vizsgálattal nem lehet elkülöníteni az AVOC anyagokat termelő sejteket a nem termelőktől.

Wu és Jüttner (1988) munkájukban egyértelműen igazolták, hogy a geozmin a cianobaktérium sejtben két elkülönült intracelluláris frakcióban található, az egyik a vizes citoszólban oldva, a másik fehérjéhez kötve. A tilakoidok felszínéhez kötődő fikobiliproteinek lehetnek azok a makromolekulák, amelyekhez a geozmin és a MIB hidrogén kötésekkel, vagy van der Waals erővel kapcsolódik. A fehérjéhez kötött geozmin adja elsősorban az egészséges cianobaktérium sejt geozmin tartalmát. A cianobaktériumokban lévő MIB-frakciókkal kapcsolatban még jelentős kutatásokra van szükség. Egyelőre nem tudjuk, hogy a geozminhoz hasonlóan a MIB-nek is két sejten belüli raktára van-e. A sejtben kötött és oldott alakban lévő geozmin aránya fajok között és fajon belül is változó. A sejtben kötött AVOC anyagok gyorsan oldott alakká változhatnak. Ennek egyik módja a sejt pusztulása és bomlása. A sejt bomlása a fehérjéhez kötött geozmin felszabadulásával jár. A bomlás során a sejthez kötött geozmin nagy része oldott alakká válhat, mivel sokkal lassabban bomlik le, mint a cianobaktérium sejt többi anyaga. A MIB-bel hasonló dolog történhet, de ez még további vizsgálatokat igényel (Jüttner & Watson 2007).

A nor-karotinoidok a mikroalga terpenoidok fontos csoportját képezik, amelyek specifikus, vagy nem specifikus karotin oxidációs származékok és mint ilyenek, közülük soknak hasonló a szerkezete (Jüttner 1995). Nor-karotinoidokat termelnek a cianobaktériumok (nevezetesen Chroococcales fajok) és sok eukarióta alga. Számos nor-karotinoid erős szag-, ill. illatanyag (dohány, virág vagy gyümölcs), ezért hozzájárul a felszíni vizek szagának kialakulásához, bár nem olyan gyakran fordulnak elő, mint a geozmin vagy a MIB. A β -ciklocitrál kivételével a felszíni vizek legtöbb nor-karotinoidjának koncentrációja jellemzően 50 ng L^{-1} -nél kisebb. A hepatotoxikus *Microcystis* nemzetség legjelentősebb AVOC anyaga a

β -ciklocitrál, ami sokkal gyakrabban fordul elő a felszíni vizekben mint a többi nor-karotinoid. A vegyület eutróf vízi ökoszisztémákra jellemző, ahol literenként nanogramm vagy akár mikrogramm mennyiségben is kimérhető (Watson 2003).

Zsírsavak és származékaik

Jó ideje ismert, hogy a zsírsavaknak lényeges szerepe van a sejten belüli és a sejtek közötti folyamatokban és a tápláléklánc dinamikájának az alakulásában. Korlátozottan állnak ugyan rendelkezésre bizonyítékok, de azok szerint a PUFA-kkal rokon vegyületek biológiailag hatékonyabbak a vízi ökoszisztémákban, mint a geozmin vagy a MIB (Watson 2003). Minthogy a zsírsavak többségének alig van szaga, ezért rendszerint nem is sorolják őket a fő AVOC anyagok közé.

A sejtek zsírsav összetétele és tartalma alapján az édesvízi mikroalgák két nagy csoportra oszthatók és ez befolyásolja a csoporton belüli fő AVOC anyagok termelését is. A cianobaktériumokban és a zöldalgákban viszonylag kevés zsírsav van, ezek pedig telített vagy egyszeresen telítetlen, C_{18} vagy még rövidebb szénláncúak. A Chrysophyceae, Haptophyta, Chryptophyta és Dinophyta eukarióta algák jelentős mennyiségű PUFA-t tartalmaznak, C_{22} vagy még hosszabb szénláncú zsírsavakkal. A planktonikus cianobaktériumok által termelt PUFA-k toxikusak néhány szűrő szervezetre, rovar lárvákra és halakra. Valójában a PUFA-k hidroperoxidjai a nagyon mérgezőek. Nincs bizonyíték arra, hogy a peroxidok jelentősebb mennyiségben kiszabadulnának a sejtekből az exponenciális szaporodási szakaszban, de a telítetlen zsírsavak fotooxidatív, vagy mikrobiális úton gyorsan lebomlanak a vízi ökoszisztémákban (Chröst & Gajewski 1995, Miyashita et al. 1993, Rontani 2001).

A lipoxigenázok elsődleges termékei a diének, dienálok, triének, amelyek közül sok erős hal, tőkehal máj-olaj, vagy uborka szagú ugyanúgy, mint a rokon alkoholok, alkánok, alkének, aldehidek, ketonok és elágazó szénhidrogének (Jüttner 1995). A planktonikus kovaalgák halszagú, aciklusos PUFA-származékokat termelnek, úgymint C_7 , C_9 , C_{10} aldehideket (Watson 2003). Az egyszeresen telítetlen és a telítetlen aliciklusos lipid származékok és metil észterek gyakoriak a zöldalgák körében és fűszagukról ismertek. Ezeknek a vegyületeknek a hatását vízi szervezetekre alig vizsgálták, de a szárazföldi ökoszisztémákban erős biológiai hatásuk van, például segítik a gombák működését és vonzzák a rovarokat (Bradow & Connick 1990).

Fermentációs termékek – kén vegyületek

A cianobaktériumok és eukarióta algák szaporodása során szintetizált fermentációs termékek jelentős hatással lehetnek a víz szagára (Jüttner 1995). Ezek közé alkoholok, észterek és alkil szulfidok tartoznak, amelyek többsége aminosavakból származik. Nagyon keveset tudunk a vízi ökoszisztémák biogén szulfidjainak kémiai ökológiájáról, de a kén vegyületeket többnyire a bakteriális lebontás rothadó szagot árasztó termékeinek tekintik (Bechard & Rayburn 1979, Wnorowski 1992). Ugyanakkor ezek az AVOC anyagok néhány cianobaktériumra is jellemzőek (*Planktothrix*, *Microcystis* és *Anabaena*).

5.1.2. Az AVOC anyagok ökológiai szerepe

Az illékony szerves vegyületek kis molekulatömegű, kicsit vagy közepesen hidrofil vegyületek. Az AVOC anyagok emiatt nem csupán vízben oldódnak és hatnak, hanem a levegő-víz határán kikerülhetnek a levegőbe is, miáltal a vízi és a szárazföldi szervezetekre is hatással vannak. Jóllehet az anyagcsere vagy a sejtlebomlási folyamat melléktermékei lehetnek, mégis az alga szaporodás vagy anyagcsere fontos kémiai jelei az életközösség és az ökoszisztéma működése szempontjából.

Az AVOC anyagok szerepe a vízminőségben

A vízi ökoszisztémákban a cianobaktériumok és eukarióta algák által termelt különböző, nem kén tartalmú illékony vegyületeknek tulajdonítanak nagyobb figyelmet, mivel ezek okozzák az ivóvíz minőségében és a haltermelésben a legtöbb gondot. A Chrysophyceae algákat és még inkább a cianobaktériumokat tartják az úgynevezett „íz- és szaganyagokat” (T/O) termelő, problémát okozó szervezeteknek az ivóvíz ellátásban (Watson 2004).

A felszíni vizekben a geozmin okozta íz- és szaganyagokkal kapcsolatos problémák a leggyakrabban az üledék felett és a nyíltvízben élő cianobaktériumok virágzásával kapcsolatosak, míg a MIB nagy koncentrációját a perifitikus cianobaktériumok okozzák (Izaguirre & Taylor 1995, Watson & Ridal 2004). Sajnos a geozmin és a MIB biológiai jelentőségét még nem ismerjük. Ehhez azonban először meg kell értenünk az AVOC anyagok kedvezőtlen hatásának biológiai szerepét a természetben, vagyis szerepüket a növényevők vonzásában vagy a fogyasztók elleni védekezésben (Watson 2003, Fink et al. 2006a, 2006b). Elképzelhető például, hogy a biofilmekben a geozmin- és MIB-termelő cianobaktériumok általános jelenlétének az a biológiai szerepe, hogy távol tartják, elriasztják a növényevő szervezeteket.

Az illékony vegyületek ökológiai szerepe

Meglepően kevés ismeretünk van ezeknek a vegyületeknek az ökológiai szerepéről. Feltételezések szerint a cianobaktériumok által termelt AVOC anyagoknak allelopatikus szerepe van, gátolják a versengő elsődleges termelő szervezetek szaporodását. A kutatások azonban arra az eredményre vezettek, hogy az eddig vizsgált AVOC anyagok csupán a természetben előfordulónál néhány nagyságrenddel nagyobb koncentrációban fejtenek ki allelopatikus hatást. Ma egyáltalán nincs meggyőző bizonyíték, ami igazolná ezeknek a vegyületeknek az allelopatikus hatását. Sűrű perifiton közösségben azonban a vegyületek ökológiai hatása koncentrációra dúsulhatnak fel (Watson 2003). Az AVOC anyagok allelopatikus hatása biofilmen belül még vizsgálatra szorul. Az AVOC anyagok másik lehetséges szerepe az antimikrobiális hatás lehet a mikrobiális patogénekkel szemben (Croft et al. 1993).

Az AVOC anyagok vízi szervezetekre vonatkozó ökológiai szerepének és kibocsátásának a megértéséhez közelebb vezet, ha azokra a tényezőkre koncentrálunk, amelyek a természetben az AVOC leadásához vezetnek. Az AVOC leadásához a cianobaktérium és eukarióta algasejtek sérülésére van szükség, például a növényevők okozta sérülésre. A

Cladocera zooplankton szervezetek kifalásukkal hozzájárulnak a sejtek sérüléséhez és az AVOC vegyületek kibocsátásához (Fink 2007).

Fajon belüli kommunikáció - feromonok

Az AVOC anyagok első felismert ökológiai szerepe a vízi ökoszisztémákban a tengeri barna algák szex feromona volt. A nőivarú egyedek által kibocsátott gyűrűs illékony vegyület a hímivarsejtek vonzására szolgál (Müller et al. 1971, Pohnert & Boland 2002). Ugyanakkor érdekes, hogy a barna algáknak ugyanez a feromontként működő vegyülete az édesvízi kovaalgákban is megtalálható (Boland 1995, Wendel & Jüttner 1996). Az *Asterionella formosa* fukoszeratént (a *Fucus vesiculosus* feromonját) termeli a többszörösen telítetlen eikozapentaénsavból (EPA; Hombeck & Boland 1998). A *Gomphonema parvulum* hormoszirént, barna alga feromont és két diktiopterént szintetizál az EPA-ból és az arachidonsavból (ARA; Pohnert & Boland 1996). A két illékony szénhidrogén szerepét a kovaalgákban nem ismerjük.

Általában véve megállapítható, hogy az AVOC anyagok feromon szerepe feltehetően sokkal általánosabb, mint gondoljuk és a kutatások minden bizonnyal további feromon hatású anyagokat találnak az algákban.

Fajok közötti kommunikáció - kairomonok

A biológiai eredetű illékony vegyületek nem csupán a fajon belüli, hanem a fajok közötti kommunikációra is ugyanígy alkalmasak. A vízi ökoszisztémában az AVOC által közvetített fajok közötti kölcsönhatásoknál az AVOC szerepe szinte kizárólag kairomon jellegű (Dicke & Sabelis 1988, Ruther et al. 2002), ahol elsősorban a jelet felfogó és nem a jeladó szervezet előnyére válik a kémiai információ. A cianobaktériumokról ismeretes, hogy gazdag forrásai az illékony vegyületeknek (Jüttner 1987), ezért valószínű, hogy legalább életük egy részében a cianobaktériumoktól függő más vízi szervezetek felhasználják az AVOC anyagokat, mint indikátorokat a nagy cianobaktérium sűrűségű helyek, például a perifiton közösségek felismerésére.

Ma úgy tűnik, hogy minden kairomon funkció, amit a vízi AVOC anyagokra leírtak kizárólag táplálkozási kairomon szerep. További vizsgálatokat igényel az, hogy más kairomon funkciók, mint például az ellenség elkerülése szintén közvetíthető-e illékony vegyületekkel (Ruther et al. 2002).

Fajok közötti nem-kommunikatív kölcsönhatások – védekező illékony anyagok

A biológiai eredetű illékony vegyületekről feltételezték, hogy részt vesznek egy aktivált védekezésben azáltal, hogy a kovaalgák többszörösen telítetlen aldehideket (PUAs) termelnek. Úgy tudtuk, hogy a kovaalgák kiváló minőségű táplálékai az evezőlábú rákoknak. Ugyanakkor gyakran megfigyelték, hogy a kovaalgákkal táplált evezőlábú rákok tojástermelése lecsökkent a nem kovaalgákkal táplált társaikhoz viszonyítva (Ban et al. 1997). Alternatív feltételezés a kovaalgák által termelt PUAs ökológiai szerepére az, hogy a sejtek károsodása miatt a biofilmben domináns kovaalgák kis mennyiségű PUAs-t választanak ki, ami hatásos repellens a növényevő zooplanktonnal szemben (Jüttner 2005).

Lehetőségek és kihívások

A vízi ökoszisztémákban az elsődleges termelő szervezetek valamint az állatok is képesek AVOC anyagok kibocsátására vagy érzékelésére kommunikációs vagy védekezési céllal. Egyik rendszert sem ismerjük tökéletesen. Mindenekelőtt azt kellene megértenünk, hogy milyen tényezők vezetnek az AVOC anyagok kibocsátásához természetes körülmények között. Az elsődleges termelő szervezetek sejtjeinek a sérülése elengedhetetlennek tűnik az illékony lipoxigenáz termékek kibocsátásához (Pohnert 2000). Több tényező vezethet a cianobaktérium és eukarióta algasejtek feltáródásához a természetben, például a hidrodinamikai erők okozta mechanikai károsodás, öregedés, valamint a parazita gombákkal vagy vírusokkal történő fertőződés (Fink et al. 2006a). Ez eredményezheti az algák bomlástermékeinek konstans „háttér” kibocsátását a természetes közösségekben. Az AVOC kibocsátás egy másik fontos tényezője lehet a növényevők táplálkozása. További kutatásra van szükség ezen vegyületek kibocsátásáért felelős tényezők és folyamatok tisztázására természetes körülmények között, mert csupán ez segíthet annak megértésében, hogy milyen ökológiai szerepe van az AVOC kibocsátásának.

Az egyik funkció a patogén mikroszervezetek elleni védekezés (Croft et al. 1993), allelopatikus hatás a versenytársakkal szemben (Watson 2003) vagy a fajon belüli feromon szerep.

5.1.3. Káposzta gyökérlégy Magyarországon

A káposzta gyökérlégy (*Delia radicum* L. - syn.: *Delia brassicae* Bouché, *Anhomyia brassicae* Bouché, *Phorbia brassicae* Bouché) egész Európában és Ázsia egyes mérsékelt égövi részein elterjedt rovarkártevő. Magyarországon 3 nemzedéke van. Az első nemzedék elsősorban a káposztaféléket támadja, míg az utolsó a repcét (Deliné Draskovits 1994). A lárvák a gyökérzónában okoznak súlyos károkat a fiatal növény gyökérzetének fogyasztásával. Az imágók gyakran már márciusban, 10 °C feletti hőmérsékleten megjelennek. Az első generáció imágói májusban vagy június elején jelennek meg, a második július-augusztusban, a harmadik szeptemberben vagy október elején. A legnépesebb az első generáció, gyengébb a második és az elsőnél gyengébb a harmadik. A tojások 2-14 napig maradnak meg, a lárvafejlődés 20-30 napig tart, a báb állapot pedig 14-20 napig. A káposzta gyökérlégy „hosszúnappalos faj”, vagyis a generációk addig követik egymást, ameddig a nappalok hossza legalább 13 óra. Ha ennél rövidebb, akkor a bábokból nem kelnek ki a legyek csak a következő tavasszal. A 22 °C feletti hőmérséklet azonban még hosszú nappalok esetében is a lárvák bábozódásához és diapauzához vezet. A felnőtt legyek különböző virágok nektárjával táplálkoznak, a nőivarúak vizet is vesznek magukhoz.

A legyek tojásrakását két tényező befolyásolja: megtalálják-e a lárva tápláléknövényét és a közelében le tudják-e rakni a tojásokat. A légy testét érzékelő kitinszőrök borítják, amelyek többsége kemoreceptorként segíti a tápláléknövény megtalálását. A növények illékony vegyületeit a legyek először a csápjaikkal érzékelik, majd a lábukon lévő kemoreceptor kitinszőrökkel. A kairomon hatású illékony allil-izotiocianátot érzékelik a káposztafélékkel

táplálkozó legyek (Bauer et al. 2004, Du et al. 2008). A káposzta gyökérlégyre jellemző, hogy tojásrakáskor nem tud különbséget tenni a káposztafélék között, mert mind termel glükozinátot, amelyből allil-izotiocianát és más izotiocianátok keletkeznek. A legyek a tojásokat a gyökér közelében a talaj felszínére, vagy a gyökérre rakják. A tojásrakás végső helyének a kiválasztását a legyek a lábukon lévő érzékelő kitinszőrökkel végzik (Alborn et al. 1985, Marazzi et al. 2003). A legyek kedvelik a száraz talajfelszínt és a legfeljebb 5cm mélyen, a gyökér közelében lévő, szerves anyagokban gazdag, nedves talajrészeket (Kostál et al. 2000). Ha gátolni akarjuk a tojásrakást, akkor a repellens hatású anyagnak a növény gyökeréhez közel kell lennie a tojásrakás megakadályozásához.

Az elmúlt két évtizedben kutatások folytak a káposzta gyökérlégy tojásrakásának a csökkentésére a káposztafélékben (Skinner & Finch 1987). A karboxilsavak csoportját és a csekély illékonyosságú, hosszú szénláncú zsírsavakat tekintették ígéretes deterrens anyagoknak a káposzta gyökérlégy tojásrakására (Cole et al. 1989). Az 1990-es években a Trondheim-i Egyetem kutatói a norvég BIOSKIVA magán cég megbízásából kisparcellás kísérleteket végeztek egy *Pseudanabaena* és egy *Phormidium* cianobaktérium törzssel. A két törzs élő szuszpenziója gátolta a káposzta gyökérlégy tojásrakását. Az eredmények alapján, a norvég cég kezdeményezésére EU-FP7 pályázatban kerestünk további mikroalgákat hasonló célra.

5.1.4. Célkitűzések

A célkitűzések megfogalmazásakor a norvég kísérleti eredmények alapján feltételeztük, hogy újabb hatásos törzseket a cianobaktériumok között kell keresnünk. Ismerve a szaganyagok fontos szerepét a rovarok életében és a cianobaktériumok illékony szerves vegyületeinek termeléséről és ökológiai szerepéről rendelkezésre álló ismereteket feltételeztük, hogy a káposzta gyökérlégy ellen hatásos cianobaktériumok szaganyagokat termelnek. A munkahipotézis alapján célkitűzéseink a következők voltak:

- a Nostocales, Oscillatoriales és Pseudanabaenales rendbe tartozó, potenciálisan szaganyagokat (geosmin, vagy MIB) termelő cianobaktériumok kiválasztása az MACC-ből,
- annak igazolása, hogy a cianobaktériumok szaganyagai okozzák a káposzta gyökérlégy tojásrakásának a gátlását,
- a káposzta gyökérlégy tojásrakását hatásosan gátló cianobaktérium törzsek kiválasztása üvegházban beállított biotesztekkel.

5.2. Anyag és módszer

5.2.1. Vizsgált cianobaktériumok és tenyésztésük

A két, hatásos norvég törzs (*Pseudanabaena* sp. és *Phormidium* sp.) mellett potenciális szaganyag termelésük alapján további 60 MACC cianobaktérium törzset választottunk ki a

vizsgálatokhoz. A **melléklet M5.1. táblázatában** bemutatjuk a törzsek taxonómiai helyét és eredetét, valamint produktivitásának jellemzőit. A törzseket a **2.2.4. alfejezetben** leírt egyszeri algatenyésztéssel szaporítottuk, kivéve a norvég *Phormidium* sp. törzset, amelyet agar felszínén tudtunk csupán szaporítani. Az agar felszínéről lemosott és centrifugált biomasszát, a többi törzs centrifugált biomasszájához hasonlóan liofilizáltuk és mélyhűtőben tároltuk a biotesztek megkezdéséig. Közvetlenül a biotesztek előtt a fagyasztva szárított mintákat desztillált vízben szuszpendáltuk, a sejteket ultrahangos sejtroncsolóval feltártuk és 10 g L⁻¹ koncentrációra hígítva használtuk a biotesztekhez.

5.2.2. Káposzta gyökérlégy bioteszt

A biotesztekhez szükséges legyeket allil-izotiocianátot tartalmazó, magyar szabadalom alapján készült „VARL+típusú Csalomon®” rovarcsapdával gyűjtöttük. A csapdákkal március közepétől május végéig olyan táblákon gyűjtöttünk a legsikeresebben káposzta gyökérlégeket, amelyeken az előző évben olajrepcét termesztettek. A nyári és az őszi nemzedékekből lényegesen kevesebb egyed sikerült befogni. Az élő legyeket a csapdák kihelyezését követő nap kora reggelén vittük az üvegházba a biotesztek beállításához. A nőivarú legyek aránya a gyűjtések során 27 és 39% között változott.

A bioteszteket fából készült, 50 x 50 x 50 cm méretű ketrecekben végeztük (**5.1.A ábra**). A ketrecek két oldalán áttetsző műanyag ablakok voltak, a tetején és az elején pedig tüllháló. A ketrecek a nagy légnedvesség biztosítására műanyag tálcákba helyeztük, amelyekbe nedves szivacs lapokat helyeztünk. A ketrecekbe szűrőpapírt tartalmazó 4 műanyag tálcát helyeztünk (**5.1.B ábra**). Három tálcában a szűrőpapírt az **5.2.1. alfejezetben** előkészített 3 különböző cianobaktérium szuszpenzióval kezeltük, a negyedik tálcát pedig desztillált vízzel kezelt kontrollként használtuk. A tálcák közepére egy-egy darab tarlórépát helyeztünk, amit nem kezeltünk algával vagy vízzel. Tettük ezt annak eldöntésére, hogy a nem kezelt növényt is megvédi-e a kezelt környezete a káposzta gyökérlégy tojásrakásától? A bioteszt kezdetén 50-100 legyet engedtünk be egy-egy ketreckebe, vegyesen hím- és nő-ivarút. A tojásrakást két alkalommal, 4 és 8 nap múlva ellenőriztük. Feljegyeztük a szűrőpapíron és a tarlórépán lévő tojások számát. A kísérleteket egymást követően háromszor megismételtük. Tavasszal és ősszel sikerült kellő számú káposzta gyökérlégyet gyűjteni a biotesztekhez.

5.2.3. Szaganyagok vizsgálata

A cianobaktériumok által kibocsájtott szaganyagok kémiai vizsgálata az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetében történt. A kibocsájtott szaganyagokat, a feromon vizsgálatokban rutinszerűen használt készülékkel gyűjtötték (Vuts et al. 2014). A szaganyagok visszafogását egy teljesen üvegből és teflonból készült, zárt rendszerű eszközzel végezték (Boland et al. 1984). A cianobaktériumok liofilizált mintáit



A

B

5.1. ábra: A káposzta gyökérlégy biotesztekhez használt fa ketrecek (A) és a tojásrakáshoz a ketrecekbe helyezett műanyag tálcák (B).

(200 mg) 200 cm³ térfogatú üvegedénybe helyezték. A szaganyagokat szén szűrőn (CLSA carbon filter, 5 mg; Brechbühler AG, Schlieren, Svájc) gyűjtötték 24 órán keresztül. A szűrőkről a szaganyagokat 20 µL diklórmétánnal oldották le. Gázkromatográfiás vizsgálatokhoz 1-2 µL-t injektáltak ebből a mintából. A gázkromatográfiás vizsgálatokat Agilent 6890N típusú gázkromatográfval végezték (DB-Wax kapillárkolonna, 30 m x 0,32 mm id; 0,25 µm; split/splitless injektor; 220°C, vivőgáz He 4 cm³ min⁻¹. A futás hőmérsékleti programja a következő volt: 60°C 1 min; 10°C min⁻¹ – 220°C, 10 min. Belső standardként tetradecil acetátot alkalmaztak.

5.3. Eredmények

5.3.1. Tojásrakást befolyásoló cianobaktérium törzsek

A bioteszteket a 62 cianobaktérium törzsszel két év alatt, 2009-ben és 2010 végeztük el. A 2009-ben repellens hatásúnak talált törzseket 2010-ben ismét megvizsgáltuk. A törzsek eltérő hatással voltak a káposzta gyökérlégy tojásrakására, ami szerint a következő kategóriákba voltak sorolhatók:

1. A kifejezetten repellens hatású törzsek legalább 40, de leginkább 60-90%-kal csökkentették a lerakott tojások számát a szűrőpapíron, és ugyanilyen, vagy valamivel kisebb mértékben a tarlórépán.
2. A közepesen repellens törzsek 40%-nál jóval kisebb, rendszerint csupán 10-20%-kal csökkentették a tojásrakást a szűrőpapíron és ugyanilyen vagy kisebb mértékben a tarlórépán.

3. A repellens hatást nem mutató törzsek nagyon csekély, 5%-nál is kisebb repellens hatást mutattak a tojásrakásra.
4. A tojásrakást serkentő törzseknél a káposzta gyökérlégy a cianobaktériummal kezelt szűrőpapírra és a tarlórépára 2-3-szor több tojást rakott le, mint a vízzel kezelt kontroll tálcában lévő szűrőpapírra és tarlórépára.

A kifejezetten repellens cianobaktériumok száma 13, a közepesen repellenséké pedig 7, ami az összes vizsgált törzs 21%-a és 11%-a. A repellens hatást egyáltalán nem mutató törzsek száma 23 (=37%), míg a tojásrakást serkentő törzsek száma 19 (=31%). A kifejezetten repellens hatású törzsek, amelyek között 6 *Nostoc* és 3 *Anabaena* van, legalább egy évben jelentősen gátolták a tojásrakást (**5.1. táblázat**). Mindkét kísérleti évben legalább 40%-kal csökkentette a káposzta gyökérlégy tojásrakását a szűrőpapíron a norvég *Pseudanabaena* sp., az MACC-71 *Nostoc* sp. és az MACC-238 *Anabaena azollae*. Mindkét kísérleti évben legalább 40%-kal csökkentette a tojásrakást a tarlórépán a norvég *Pseudanabaena* sp., az MACC-57 *Anabaena variabilis* és az MACC-797 *Anabaena variabilis*. Jóllehet csupán 2010-ben vizsgáltuk, de a norvég *Pseudanabaena* sp. mellett csupán az MACC-420 *Nostoc muscorum* csökkentette jelentősen a lerakott tojások számát a szűrőpapíron (83%) és a tarlórépán (65%) is. A többi törzsnél a gátló hatás nem mindig érte el a 40%-ot.

A kifejezetten és közepesen repellens hatású törzsek szag intenzitását és szaporodásának jellemzőit az **5.2 táblázatban** foglaltuk össze. Eszerint a 20 repellens törzsből 14 esetben volt érzékelhető szaganyag termelés, ebből 10 gyenge, 3 közepes és 1 erős intenzitású volt. A szaganyagok kimutatására végzett előzetes kémiai vizsgálatok szerint a mérési körülmények között a 6,7 perc retenciós időnél megfigyelhető csúcsnál (belső standard retenciós ideje 13,22 perc) volt a szaghatásért felelős anyag a vizsgált cianobaktériumoknál. Jellemzésül az MACC-661 törzs biomasszájából készült görbét mutatja az **5.2. ábra**. A többi vizsgált törzsnél is megtalálható ez a csúcs, de mérete változó. Ennek alapján feltételezhető, hogy ugyanaz a szaganyag komponens van jelen az összesen 14, tojásrakást gátló cianobaktérium törzsben, amit a levegőbe kibocsájtanak, így az összegyűjthető és kimérhető.

A repellens hatású törzsek szaporodási jellemzői általában nem teszik egyszerűvé tömegtermesztésüket, ami persze a cianobaktériumokra általában érvényes. A törzsek 7 törzs kivételével gyengén (6), közepesen (3) vagy erősen (4) rátapadtak a tenyészedények belső falára, vagyis nem adtak homogén szuszpenziót. Az üvegre tapadó törzseknél zárt rendszerű tömegtermesztő berendezés nem alkalmazható. Habképződést csupán 5 esetben láttunk, ami kedvezőtlen, de lényegesen nem befolyásolja a tömegtermesztést. Két kivétellel a törzsek tenyészetekben csomókká, lemezekké álltak össze a cianobaktérium fonalak, ami tömegtermesztéskor az önárnyékolás miatt csökkenti a szaporodás mértékét, viszont egyszerűsíti és olcsóbbá teszi a szüretelést.

A tojásrakást gátló cianobaktérium törzsek mellett a tojásrakást serkentő törzsek érdemelnek figyelmet. Összesen 19 törzs, vagyis az összes vizsgált törzs csaknem harmada jelentősen növelte a lerakott tojások számát (**5.3. táblázat**). Négy törzs kivételével ezeknél a törzseknél nem érzékeltek szaganyagok jelenlétét. A 4 törzsből 2 *Phormidium* mutatott gyenge szaghatást. A törzsek közül 6 nem tapadt a tenyészedény falára, 2 mutatott habképződést és 3 kivételével mind csomósodott, aggregálódott fonalakból állt.

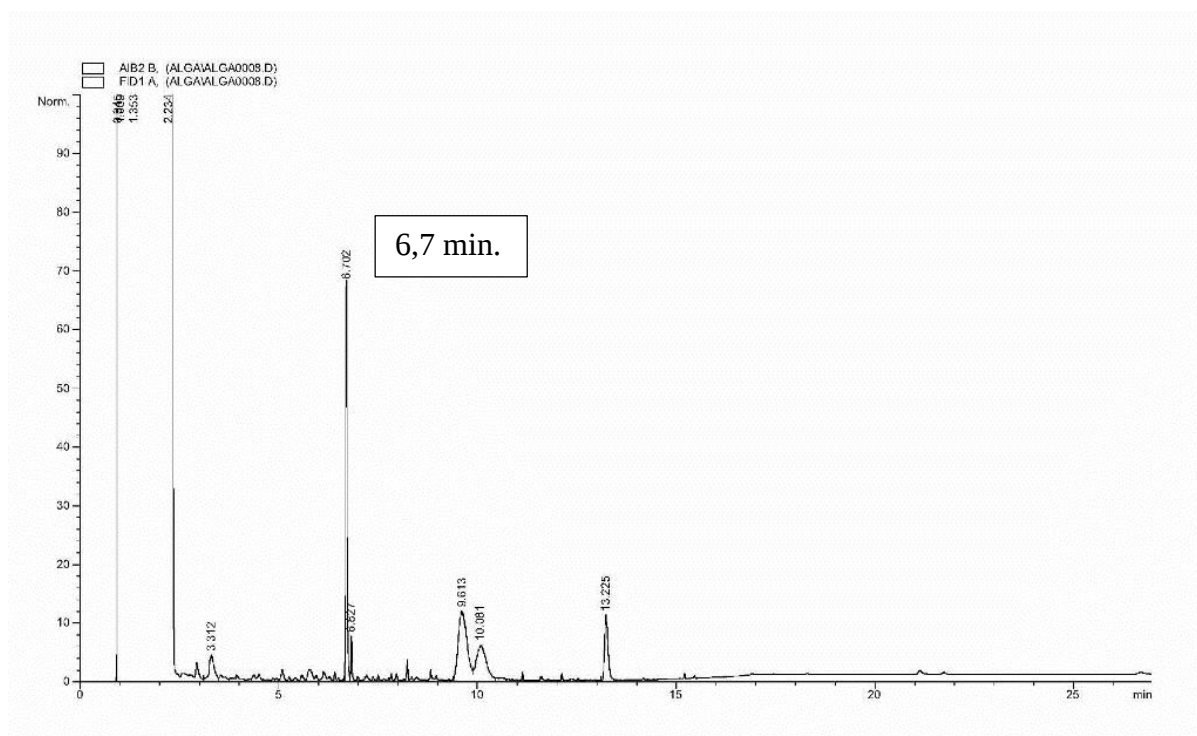
5.1. táblázat: A káposzta gyökérléggy tojásrakására repellens hatású cianobaktérium törzsek.

Vizsgált cianobaktériumok	Kísérleti év	Tojásrakás helye	Ismétlések száma	Repellens hatás (%)
<i>Pseudanabaena</i> (Norvég törzs)	2009	szűrőpapír	9	87,7±6,4
		tarlórépa	9	93,4±4,4
	2010	szűrőpapír	3	43,7±3,3
		tarlórépa	3	72,3±2,5
	2010	szűrőpapír	3	45,7±2,5
		tarlórépa	3	4,7±2,9
<i>Anabaena variabilis</i> (MACC-57)	2009	szűrőpapír	6	65,5±2,9
		tarlórépa	6	60,3±2,8
	2010	szűrőpapír	3	31,7±9,7
		tarlórépa	3	61,7±2,8
<i>Nostoc sp.</i> (MACC-71)	2010	szűrőpapír	3	69,0±2,6
		tarlórépa	3	46,3±3,3
	2010	szűrőpapír	3	42,3±3,4
		tarlórépa	3	0
<i>Pseudanabaena sp.</i> (MACC-182)	2009	szűrőpapír	6	100±0
		tarlórépa	6	66,7±2,9
	2010	szűrőpapír	3	0
		tarlórépa	3	13,0±2,0
<i>Anabaena azollae</i> (MACC-238)	2009	szűrőpapír	6	62,2±29,0
		tarlórépa	6	87,3±8,0
	2010	szűrőpapír	6	54,0±3,6
		tarlórépa	6	34,4±3,4
<i>Nostoc entophytum</i> (MACC-612)	2009	szűrőpapír	12	87,2±4,8
		tarlórépa	12	26,4±15,7
	2010	szűrőpapír	3	26,0±0,3
		tarlórépa	3	8,7±2,0
<i>Nostoc sp.</i> (MACC-661)	2009	szűrőpapír	9	46,3±12,2
		tarlórépa	9	67,5±8,6
	2010	szűrőpapír	3	12,3±1,7
		tarlórépa	3	16,3±16,3

dc_881_14

5.1. táblázat: A káposzta gyökérlégyséjének tojásrakására repellens hatású cianobaktérium törzsek.
(folytatás)

Anabaena variabilis (MACC-797)	2009	szűrőpapír	12	62,6±11,5
		tarlórépa	12	62,9±10,7
	2010	szűrőpapír	3	14,7±1,8
		tarlórépa	3	45,3±2,3
Nostoc muscorum (MACC-420)	2010	szűrőpapír	3	83,3±3,4
		tarlórépa	3	65,3±2,6
Nostoc sp. (MACC-513)	2010	szűrőpapír	3	54,0±3,2
		tarlórépa	3	0
Nostoc sp. (MACC-634)	2010	szűrőpapír	3	75,3±2,2
		tarlórépa	3	9,0±3,0
Leptolyngbya boryana (MACC-637)	2010	szűrőpapír	3	42,3±2,0
		tarlórépa	3	29,3±3,7
Leptolyngbya sp. (MACC-651)	2010	szűrőpapír	3	31,3±3,7
		tarlórépa	3	58,7±3,7



5.2. ábra: Az MACC-661 törzs fagyasztva szárított biomasszája által kibocsátott szaganyagokból készült gázkromatogram.

5.2. táblázat: A káposzta gyökérlégy tojásrakására kifejezetten és közepesen repellens hatású cianobaktérium törzsek szaporodásának jellemzői.

MACC törzs	Taxon	Szag intenzitás	Tapadás	Habképződés	Csomósodás
Kifejezetten repellens hatású cianobaktérium törzsek					
MACC-891	<i>Pseudanabaena</i> sp.	+	++	-	-
MACC-57	<i>Anabaena variabilis</i>	+	++	-	+
MACC-71	<i>Nostoc</i> sp.	+	-	-	+++
MACC-182	<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	+++	-	+++
MACC-238	<i>Anabaena azollae</i>	-	+	+++	+
MACC-612	<i>Nostoc entophytum</i>	+	-	+	+++
MACC-661	<i>Nostoc</i> sp.	+++	-	-	+++
MACC-797	<i>Anabaena variabilis</i>	+	+	-	++
MACC-420	<i>Nostoc muscorum</i>	+	+	-	+++
MACC-513	<i>Nostoc</i> sp.	++	+	+	++
MACC-634	<i>Nostoc</i> sp.	++	-	+	+++
MACC-637	<i>Leptolyngbya boryana</i>	-	+++	-	+++
MACC-651	<i>Leptolyngbya</i> sp.	-	++	-	+
Közepesen repellens hatású cianobaktérium törzsek					
MACC-146	<i>Anabaena constricta</i>	+	-	-	-
MACC-437	<i>Phormidium</i> sp.	-	+++	-	+
MACC-440	<i>Leptolyngbya</i> sp.	-	+++	-	++
MACC-465	<i>Tolypothrix</i> sp.	+	-	-	++
MACC-623	<i>Tolypothrix</i> sp.	++	+	-	++
MACC-627	<i>Nostoc</i> sp.	+	+	+++	+++
MACC-632	<i>Phormidium</i> sp.	+	-	-	+++

5.4. Eredmények megvitatása

A káposzta gyökérlégy elleni biotesztekhez a Nostocales, Oscillatoriales és Pseudanabaenales rendbe tartozó, potenciálisan geosmin és/vagy MIB termelő cianobaktériumokat választottunk (Watson 2003, Smith et al. 2008). A két szaganyag nagyon stabil, ezért hosszan tartó hatásával lehet számolni, ami célkitűzéseinknek kiválóan megfelel (Jüttner & Watson 2007). A

kiválasztott törzsek a *Nostoc* (22), *Anabaena* (12), *Phormidium* (9), *Tolypothrix* (6), *Calothrix* (5), *Leptolyngbya* (4), *Pseudanabaena* (3) és *Lyngbya* (1) nemzetségekbe tartoznak.

A kifejezetten és közepesen repellens törzsek közül 7 *Nostoc*, 4 *Anabaena*, 2 *Phormidium*, 2 *Tolypothrix*, 3 *Leptolyngbya* és 2 *Pseudanabaena*. A *Nostoc* és *Anabaena* törzsek harmada volt, egy-egy törzs kivételével, kifejezetten repellens hatású. A norvég *Pseudanabaena* kifejezetten repellens hatása alapján feltételezhető volt, hogy az MACC-ből kiválasztott további 2 *Pseudanabaena* is hasonló hatást mutat, de csupán az egyik törzs volt kifejezetten repellens, az MACC-182 *Pseudanabaena* sp. A 4 vizsgált *Leptolyngbya* törzsből 3 volt repellens, 2 kifejezetten (MACC-637 és MACC-651), 1 pedig közepesen (MACC-440).

5.3. táblázat: A káposzta gyökérléggy tojásrakását serkentő cianobaktérium törzsek szaporodásának jellemzői.

MACC törzs	Taxon	Szag intenzitás	Tapadás	Habképződés	Csomósodás
MACC-80	<i>Tolypothrix tenuis</i>	+	-	-	-
MACC-121	<i>Anabaena flos-aquae</i>	-	-	-	+
MACC-168	<i>Calothrix viguieri</i>	-	+++	-	+++
MACC-205	<i>Tolypothrix tenuis</i>	-	+++	-	+++
MACC-229	<i>Anabaena miniata</i>	-	-	-	+
MACC-250	<i>Calothrix</i> sp.	-	+++	-	+++
MACC-304	<i>Anabaena sphaerica</i>	-	+	+	+
MACC-319	<i>Phormidium</i> sp.	-	+++	-	++
MACC-403	<i>Calothrix</i> sp.	-	+++	-	++
MACC-429	<i>Phormidium</i> sp.	-	+++	-	+++
MACC-491	<i>Calothrix</i> sp.	-	++	-	++
MACC-536	<i>Phormidium</i> sp.	+	+++	-	+++
MACC-597	<i>Phormidium</i> sp.	+	+++	-	+++
MACC-611	<i>Leptolyngbya foveolatum</i>	-	++	-	+++
MACC-613	<i>Pseudanabaena galeata</i>	-	-	-	-
MACC-667	<i>Phormidium</i> sp.	-	++	-	++
MACC-668	<i>Nostoc</i> sp.	+	-	+	+++
MACC-683	<i>Nostoc</i> sp.	-	-	-	-
MACC-708	<i>Tolypothrix tenuis</i>	-	-	-	+++

A tojásrakást serkentő törzsek közül 2 *Nostoc*, 3 *Anabaena*, 5 *Phormidium*, 3 *Tolypothrix*, 4 *Calothrix*, 1 *Leptolyngbya* és 1 *Pseudanabaena* volt. Kiemelkedően sok, ötből 4 *Calothrix* törzs (MACC-168, MACC-250, MACC-403 és MACC-491) serkentette a káposzta gyökérlégy tojásrakását. A 9 *Phormidium* törzsből 5, a 6 *Tolypothrix* törzsből pedig 3 volt serkentő hatású a tojásrakásra.

A rovarok látása nagyon gyenge, ezért környezetük szaganyagai alapján tájékozódnak. A vizsgált törzsek közül összesen 18-ról állapítottuk meg, hogy az ember számára is érzékelhető szaganyagot termel, amelyek közül 14 volt repellens. A tojásrakást serkentő 19 törzsből csupán 4 esetben érzékeltük szaganyagok kibocsájtását, de ez feltehetően azért van így, mert azok a káposzta gyökérlégy számára érzékelhetőek, de az ember számára nem. A tojásrakást gátló és serkentő szaganyagok egymástól bizonyosan eltérőek. Tájékozódó analitikai vizsgálatainkban sikerült kimutatni a tojásrakást gátló hatásért felelős szaganyag gázkromatográfiás csúcsát, de a tojásrakás serkentésért felelős szaganyagról csupán annyit tudunk, hogy az nem lehet azonos a gátló szaganyaggal.

Az eredmények azt igazolják, hogy egyes cianobaktérium törzsek a káposzta gyökérlégy tojásrakására repellens szaganyagokat képesek termelni és kibocsájtani a környezetükbe. A tojásrakásra repellens anyagok termelésével kapcsolatban feltételezzük, hogy azok olyan szaganyagok lehetnek, amelyek csupán a rovarok, adott esetben a káposzta gyökérlégy számára érzékelhetőek. A káposzta gyökérlégy tojásrakására kifejezetten repellens hatású törzsek közül kiemelhető:

1. MACC-891 *Pseudanabaena* sp. (norvég *Pseudanabaena* sp.),
2. MACC-57 *Anabaena variabilis*,
3. MACC-71 *Nostoc* sp.

A három törzs szaporodási tulajdonságait is figyelembe véve a homogén szuszpenziót alkotó MACC-891 és a majdnem homogén szuszpenziót alkotó MACC-57 javasolható gyakorlati célokra, ill. minden olyan cianobaktérium törzs, amit még nem vizsgáltunk, de a repellens törzseinkhez hasonló szaganyagokat termelnek, homogén szuszpenziót alkotnak és gyorsan szaporodnak.

5.5. Új tudományos eredmények

Norvég kutatók kísérleti eredményei és a cianobaktériumok szaganyag termeléséről rendelkezésre álló irodalom alapján kiválasztottunk 60, a Nostocales, Oscillatoriales és Pseudanabaenales rendbe tartozó MACC-törzset, amelyek közül legalább néhány, szaganyag termelésével befolyásolja a káposzta gyökérlégy tojásrakását. A kísérleti eredmények alapján a törzsek mintegy harmada repellens hatású volt a káposzta gyökérlégy tojásrakására, másik harmada pedig serkentette azt. A 20 repellens cianobaktérium törzs közül 14 érzékelhető szaganyagot termelt, amit gázkromatogramon azonosítani tudtunk. A 19 tojásrakást serkentő törzs közül csupán 4 szaganyag termelését érzékeltük. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a cianobaktériumok szaganyagai alkalmasak a káposzta gyökérlégy tojásrakásának a befolyásolására.

A tojásrakásra repellens törzseket a leggyakrabban két nemzetségben találtunk: három vizsgált *Pseudanabaena* törzsből 2 és négy vizsgált *Leptolyngbya* törzsből 3 volt repellens hatású. A tojásrakást serkentő törzsek a leggyakrabban a *Calothrix* nemzetségben fordultak elő, öt vizsgált törzsből négy.

Kutatósi jövőkép

A mikroalgák, ezen belül a cianobaktériumok szaganyag termelésének a vizsgálata nem csupán a vízi ökoszisztémában betöltött ökológiai szerepük miatt fontos, hanem egy egészen más kutatási terület, a rovarok és az ellenük való védekezés szempontjából is hasznos. Sikerült munkahipotézisünk igazolása, miszerint a cianobaktériumok szaganyagai befolyásolják a káposzta gyökérlégy tojásrakását. Nem csupán a repellens hanem a serkentő hatású szaganyagoknak is komoly gyakorlati jelentősége lehet. A „push and pull” technológia alkalmazásával bizonyos rovarok egyik mikroalga törzzsel elriaszthatók egy adott területről, egy másikkal pedig oda csalogathatók és elpusztíthatók. A mikroalgák szaganyagainak a megismerése és rovarokra gyakorolt repellens vagy csalogató hatása kiszélesíti a mikroalgák biotechnológiai alkalmazásának spektrumát. Ha ismerjük a szaganyag hatását, akkor olyan mikroalgákat kell keresnünk, amelyek termelik ezt a szaganyagot és jól szaporodnak. Ezzel a megközelítéssel megnövelhetjük a merítési lehetőségünket a mikroalga nemzetségek és fajok között feltéve, hogy ugyanazt a szaganyagot számos mikroalga képes termelni és ez szinte biztosra vehető. A jövőben ezt a megközelítést követjük, amikor rovarokra ható mikroalga szaganyagokat keresünk.

6. Új tudományos eredmények összefoglalása

Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény létrehozása

Létrehoztuk a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményt (MACC), ami Európa 13. legnagyobb, a talajalgákat tekintve pedig a 3. legnagyobb mikroalga gyűjteménye. Az MACC összesen 970 törzsből ezen belül 588 talajalgából áll. A saját izolálású 307 brazil és a 78 magyar talajalga törzsek közül 50 cianobaktérium és 385 eukarióta alga. Megkezdjük a törzsek rendszertani besorolásának a pontosítását molekuláris biológiai módszerekkel. A gyűjtemény felét (509 törzs) a mikroalga biotechnológia számára fontos 6 nemzetség adja: a cianobaktériumok közül az *Anabaena* (82) és *Nostoc* (57), a zöldalgák közül pedig a *Chlorella* (122), *Scenedesmus* (106), *Chlorococcum* (72) és *Chlamydomonas* (70) törzsek. Jellemeztük az MACC törzsek szaporodását. Megállapítottuk, hogy a cianobaktériumok 60%-a BG-11, 20%-a a Zehnder-8 és 10%-a a Tamiya tápoldatban szaporítható. Az eukarióta mikroalgák 60%-a a Tamiya, 15-15%-a pedig a Bristol és BG-11 tápoldatban szaporodik a legjobban. A Tamiya tápoldatban szaporodó cianobaktériumok és eukarióta algák napi szárazanyag termelése hasonló ($0,17-0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ nap}^{-1}$) és lényegesen nagyobb, mint a másik három tápoldat bármelyikében szaporodó törzseké ($0,1-0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ nap}^{-1}$). A maximálisan elérhető biomassa a cianobaktériumoknál kisebb ($0,75-1,75 \text{ g L}^{-1}$) mint az eukarióta algáknál ($1-3 \text{ g L}^{-1}$).

A gyűjtemény mikroalga törzseit az elmúlt 20 évben számos hazai és nemzetközi projekt céljaira használtuk a mikroalgák növényi hormontermelésének, antimikrobiális hatásának és illékony szerves vegyületeinek a tanulmányozására a mezőgazdasági hasznosítást szem előtt tartva, míg a mikroalgák lipidtermelését megújuló energiaforrásként tanulmányoztuk.

Mikroalgák növényi hormontermelése

Elsőként közöltük endogén gibberellinek jelenlétét és összetételét mikroalgákban. Megállapítottuk, hogy a lassabban szaporodó alga törzsek több, a gyorsabban szaporodók kevesebb gibberellint tartalmaznak. A mikroalgákban kimutatott gibberellinek alapján feltételezzük, hogy a mikroalgákban a gibberellinek bioszintézise a következő úton megy végbe: $GS_{12} \rightarrow GS_{53} \rightarrow GS_{44} \rightarrow GS_{19} \rightarrow GS_{20} \rightarrow GS_5 \rightarrow GS_6$. A mikroalgákban a GS_6 a domináns biológiailag aktív gibberellin.

Másodikként közöltük a mikroalgákban a brasszinoszteroidokat, köztük a BL és a CS jelenlétét 24 vizsgált zöldalgában és három brasszinoszteroid jelenlétét (CT, 6-oxoCN és 6deoxo-*epi*CS) a *Chlorella minutissima* zöldalga szinkron tenyésztésében.

Az egyes hormonok termelése és a sejtciklus között nem sikerült meggyőző összefüggést találni, csupán néhány megállapítást tenni: (1) a sejtosztódásban szerepet játszó auxinok és citokininek koncentrációja növekedett a szinkrontenyészetekben a 48-órás kísérleti időszak alatt; (2) a gibberellineké, a mikroalgákban feltehetően szintén stresszhormonként működő abszcizinsavé és a sejtosztódásban közvetlenül részt nem vevő brasszinoszteroidoké viszont csökkent; (3) az *Arthronema africanum* cianobaktérium aszinkron tenyésztésével végzett biotesztek szerint nem a sejtciklustól, hanem a fénytől függően nőtt a tenyészet citokinin-szerű hatása.

Huszonöt zöldalga hormontartalmának és hormonösszetételének műszeres analitikai eredményei alapján valószínűsítjük, hogy minden zöldalga képes növényi hormonok termelésére, ezért a mikroalgák, a tengeri algakivonatokhoz hasonlóan alkalmasak lehetnek a termesztett növények növekedésének és fejlődésének a kedvező befolyásolására. Pótlólagos előnyük a tengeri algakivonatokkal szemben, hogy közülük célorientáltan specifikus hormonösszetételű algák használhatók, amelyek iparszerűen termeszthetők és még növényvédő hatásuk is lehet. Mindazonáltal a növénykezelési célokra termesztett mikroalga biomasszában, a növényi hormonok kimutatása műszeres analitikai módszerekkel nem elegendő. A felhasználás előtt a hormonok együttes biológiai hatásának a vizsgálata bioteszt módszerekkel feltétlenül szükséges.

Mikroalgák hatása növénypatogén gombákra

Agar géldiffúziós biotesztekkel a Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény 280 mikroalga törzsét vizsgáltuk 9 növénypatogén gombával szemben. Minden patogénre legalább egy, összesen 19 fungicid hatású mikroalgát találtunk. A legtöbb fungicid mikroalgát a *Phaeoramularia capsicicola* (11), a *Pythium ultimum* (5), a *Botrytis cynerea* (4) és az *Alternaria alternata* (4) ellen találtunk. A *Plasmopara viticola* ellen 3 erősen gátló hatású zöldalgát találtunk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek 45%-a legalább gyengén fungisztikus hatást mutatott legalább egy patogénnel szemben, ezért feltételezhető, hogy a mikroalgák többsége, ha nem minden mikroalga képes antimikrobiális anyagok termelésére valamilyen mikroszervezettel szemben. Fungicid hatású volt:

- a vizsgált cianobaktériumok 20%-a és az eukarióta algák 5%-a,
- a cianobaktériumok közül a talajalgák 15%-a és a vízből izolált algák 28%-a,
- az eukarióta algák közül a talajalgák 3,6%-a és a vízből izolált algáknak a 7,6%-a.

Az eredmények alapján vízből izolált cianobaktériumoktól várható a nagyobb antifungális hatás, ezért az MACC bővítése ebben az irányban célszerű. A fungicid biotesztek aránya az összes elvégzett bioteszten belül 1,2%, vagyis átlagosan mintegy 85 biotesztet kell elvégezni ahhoz, hogy egy fungicid eredményt kapjunk. A cianobaktériumok hátránya az eukarióta algákkal szemben a lassúbb szaporodás és a többnyire nem homogén szuszpenzió (lásd *Nostoc* és *Tolypothrix* törzsek), ami a fungicid cianobaktériumok gyakorlati felhasználását megnehezíti. Az eukarióta algák felhasználása mellett szól gyors szaporodásuk és esetenként specifikus hatásuk, például a *Plasmopara viticola* ellen.

Cianobaktériumok a káposzta gyökérlégy elleni védekezésben

Norvég kutatók kísérleti eredményei és a cianobaktériumok szaganyag termeléséről rendelkezésre álló irodalom alapján kiválasztottunk 60, a Nostocales, Oscillatoriales és Pseudanabaenales rendbe tartozó MACC-törzset, amelyek közül legalább néhány, szaganyag termelésével befolyásolja a káposzta gyökérlégy tojásrakását. A kísérleti eredmények alapján a törzsek mintegy harmada repellens hatású volt a káposzta gyökérlégy tojásrakására, másik harmada pedig serkentette azt. A 20 repellens cianobaktérium törzs közül 14 érzékelhető szaganyagot termelt, amit gázkromatogramon azonosítani tudtunk. A 19 tojásrakást serkentő törzs közül csupán 4 szaganyag termelését érzékeltük. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy

a cianobaktériumok szaganyagai alkalmasak a káposzta gyökérlégy tojásrakásának a befolyásolására.

A tojásrakásra repellens törzseket a leggyakrabban két nemzetségben találtunk: három vizsgált *Pseudanabaena* törzsből 2 és négy vizsgált *Leptolyngbya* törzsből 3 volt repellens hatású. A tojásrakást serkentő törzsek a leggyakrabban a *Calothrix* nemzetségben fordultak elő, öt vizsgált törzsből négy.

Kutatási jövőkép

A Mosonmagyaróvári Algagyűjteményt a különböző projektekben elért és az értekezésben összefoglalt eredmények alapján bővítjük. A mikroalgákon belül növeljük a talajból és vízből izolált cianobaktériumok arányát. A gyűjtemény felhasználásával továbbra is a mikroalgák mezőgazdaságban és a megújuló energiatermelésben való alkalmazhatóságát kutatjuk hazai és nemzetközi együttműködések keretében.

Nagyobb hangsúlyt szánunk a hormonok mikroalgákban betöltött szerepének a kutatására. Exogén hormonok hatását vizsgáljuk laboratóriumi tenyészetekre és üvegházban elhelyezett félüzemi tömegtermesztő berendezésekben szaporodó mikroalgákra. Gyakorlati célunk a tömegtermesztés során a mikroalgák szaporodásának gyorsítása, továbbá annak a vizsgálata, hogy a környezeti feltételek (pl. alacsony fényintenzitás és hőmérséklet) kedvezőtlen hatása csökkenthető-e specifikus hormonok adagolásával. Biotesztekkel értékeljük eltérő módon termesztett és/vagy különböző mikroalga törzsek hormonszerű hatását, különös tekintettel az auxinszerű és citokininszerű hatásra. PhD-hallgatók és növénytermesztők bevonásával vizsgáljuk ezeknek a „bevizsgált” biomassa mintáknak a hatását termesztett növények növekedésére és fejlődésére, valamint növények szövettenyészeire.

Az MACC cianobaktérium törzseinek hatását vizsgáljuk növénypatogén gombákra. Korábbi tapasztalataink és nemzetközi kapcsolataink segítségével a gyakorlatban használható alga termékek előállítására törekszünk.

A mikroalgák, ezen belül a cianobaktériumok szaganyag termelésének vizsgálata nem csupán a vízi ökoszisztémában betöltött ökológiai szerepük miatt fontos, hanem egy egészen más kutatási terület, a rovarok és az ellenük való védekezés szempontjából is hasznos. Nem csupán a repellens hanem a serkentő hatású szaganyagoknak is komoly gyakorlati jelentősége lehet. A „push and pull” technológia alkalmazásával bizonyos rovarok elriaszthatók egy adott területről, egy másikra pedig oda csalogathatók és elpusztíthatók. A mikroalgák szaganyagainak rovarokra gyakorolt repellens vagy csalogató hatásának megismerése kiszélesíti a mikroalgák biotechnológiai alkalmazásának spektrumát. Ha ismerjük a szaganyag hatását, akkor olyan mikroalgákat kell keresnünk, amelyek termelik ezt a szaganyagot és még jól is szaporodnak. Ezzel a megközelítéssel megnövelhetjük merítési lehetőségünket a mikroalga nemzetségek és fajok között feltéve, hogy ugyanazt a szaganyagot számos mikroalga képes termelni és ez szinte biztosra vehető. A jövőben ezt a megközelítést követjük, amikor rovarokra ható mikroalga szaganyagokat keresünk.

7. Irodalomjegyzék

- Alabouvette, C., Olivain, Ch. & Steinberg, Ch. (2006): Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114:329-341.
- Alborn, H., Karsson, H., Lundgren, L., Ruuth, P. & Stenhagen, G. (1985): Resistance in crop species of the genus *Brassica* to oviposition by the turnip root fly, *Hylemya floralis*. *Oikos* 44(1):61-69.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410.
- Alwathnani, H. & Johansen, J.R. (2011): Cyanobacteria in soils from a Mojave Desert ecosystem. *West N Am Naturalist* 5:71-89.
- Alwathnani, H.A. & Perveen, K. (2013): Evaluation of antifungal potential of *Dunaliella salina* and *Phormidium autumnale* against plant pathogenic fungi. *J. of Pure & Appl.Microbiol.* 7(2):1071-1077.
- Aponyiné & Garamvölgyi I. (Szerk.) (1997): Hatósági fungicid és baktericid vizsgálati módszertan. Földművelésügyi Minisztérium, Növényvédelmi és Agrárkörnyezet-gazdálkodási Főosztály. Budapest, pp. 460.
- Aremu, A.O., Masondo, N.A., Stirk, W.A., Ördög V. & Van Staden, J. (2014): Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. *J.Appl.Phycol.* 26:407-415.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J., Epple, P., To, J.P.C., Hutchison, C.E., Schaller, G.E., Dangl, J.L. & Kieber, J.J. (2012): Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genetics* 8(1):1-13.
- Atlas, R.M. (2004): *Handbook of Microbiological Media*. Third Edition, CRC Press, pp. 2056.
- Bajguz, A. & Czerpak, R. (1998): Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *J. Plant Growth Regul.* 17:131-139
- Bajguz, A. (2000): Effect of brassinosteroids on nucleic acid and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 38:209-215.
- Bajguz, A. & Tretyn, A. (2003): The chemical characteristics and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochem.* 62:1027-1046.
- Bajguz, A. (2009): Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). *J. Plant Physiol.* 166:1946-1949.
- Bajguz, A. & Hayat, S. (2009): Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47:1-8.
- Bajguz, A. (2011): Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60:406-416.
- Ballantine, D.L., Gerwick, W.H., Velez, S.M., Alexander, E. & Guevara, P. (1987): Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia* 151/152:463-469.

- Ban, S. – Burns, C. – Castel, J. – Chaudron, Y – Christou, E. – Escribano, R. – Umani, S.F. – Gasparini, S. – Ruiz, F.G. – Hoffmeyer, M. et al. (1997): The paradox of diatom-copepod interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157:287-293.
- Basova, M.M. (2005): Fatty acid composition of lipids in microalgae. *Internatiuonal Journal of Algae* 7(1):33-57.
- Bauer, R., Birch, A.N.E., Hopkins, R.J., Griffiths, D.W., Simmonds, M.S.J. & Stadler, E. (2004): Oviposition and chemosensory stimulation of the root flies *Delia radicum* and *D.floralis* is response to plants and leaf surface extracts from resistant and susceptible *Brassica* genotypes. *Entomol.Expt. Appl.* 78(1):61-75.
- Bechard, M. and Rayburn, W. (1979): Volatile organic sulphides from freshwater algae. *Journal of Phycology* 15:379-383.
- Beijerinck, M.W. (1890): Kulturversuche mit Zoochlorellen Lichenogonidien und anderen niederen Algen. *Bot.Z.* 48:725.
- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J. & Ostell, J. (1997): GenBank. *Nucleic Acids Res.* 25:1-6.
- Bhateja, P., Mathur, T., Pandya, M., Fatma, T. & Rattan, A. (2006): Activity of blue-green microalgae extracts against *in vitro* generated *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Fitoterapia* 77:233-235.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith G.D. & Tredici, M. (2004): Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. & Environ.Microbiol.* 70(6):3313-3320.
- Boland, W. (1995): The chemistry of gamete attraction – chemical structures, biosynthesis, and (a)biotic degradation of algal pheromones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:37-43.
- Boland, W., Ney, P., Jaenicke, L. & Gassmann, G. (1984): A “closed-loop-stripping” technique as a versatile tool for metabolic studies of volatiles. In: Schreier, P. (Edit): *Analysis of volatiles*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 371-380.
- Bold, H.C. (1949): The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bull. Torrey Bot.Club* 76:101-108.
- Bonjouklian R, Smitka TA, Doolin LE, Molloy RM, Debono M, Shaffer SA, Moore RE, Stewart JB, Patterson GM, Tjipanazoles L (1991). New antifungal agents from the blue-green alga *Tolypothrix tjipanasensis*. *Tetrahedron*, 47:7739-7750.
- Booth, C. (1971): *The Genus Fusarium*. Kew Surrey Commonwealth Mycological Institute, pp. 237.
- Borowitzka, M.A. (1995): Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J.Appl.Phycol.* 7:3-15.
- Borowitzka, M.A. (1997): Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J. Appl.Phycol.* 9:393-401.
- Borowitzka, M.A. (2013): High-value products from microalgae – their development and commercialization. *J.Appl.Phycol.* 25:743-756.
- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.P., Zarka, A. & Chen, F. (1999): Changes in pigment profiles of *Haematococcus pluvialis* during response to environmental stress. *Biotechnol.Lett.* 21:601-604.

- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z. & Richmond, A. (1997): A procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*. PCT Patent 9:728,274
- Bradley, P.M. (1991): Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *J. Phycol.* 27:317-321
- Bradow, J. and Connick, J. (1990): Volatile seed germination inhibitors from plant residues. *Journal of Chemical Ecology* 16:645-667.
- Brand, J.J. & Diller, K.R. (2004): Application and theory of algal cryopreservation. *Nova Hedwigia* 79(1-2):175-189.
- Brand, J.J. & Diller, K.R. (Eds.) (1998): International Symposium on the cryopreservation of algae (abstracts). *Cryo-Lett.* 19:201-212.
- Burja, A.M., Banaigs, E.B., Abou-Mansour, Burgess, J.G. & Wright, P.C. (2001): Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57:9347-9377.
- Burkiewicz, K. (1987a): Active substances in the media after algae cultivation. *Acta Physiologiae Plantarum* 9(4):211-217.
- Burkiewicz, K. (1987b): The influence of gibberellins and cytokinins on the growth of some unicellular Baltic algae. *Bot. Mar.* 30:63-69.
- Burlew, J.S. (Edit.) (1953): Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Inst. Wash. Publ., 357 pp.
- Büdel, B. (2001): Biological soil crusts of Asia including the Don and Volga region. In: Belnap, J. & Lange, O.L. (Eds): *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management*. Springer, Berlin
- Caire, G.Z.de, Cano M.M.S.de, Mulé M.C.Z.de & Halperin D.R.de (1990): Antimycotic products from the cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani*. *Fiton* 51(1):1-4.
- Caire, G.Z.de, Cano M.M.S.de, Mulé M.C.Z.de & Halperin D.R.de (1993): Screening of cyanobacterial bioactive compounds against human pathogens. *Fiton* 54(1):59-65.
- Cannell, R. (1993): Algae as a source of biologically active products. *Pesticide Science* 39:147-153.
- Cano, M.M.S.de, Mulé, M.C.Z.de, Caire, G.Z.de & Halperin, D.R.de (1990): Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *J. Appl. Phycol.* 2:79-81.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcao, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P. & Pinto, E. (2007): Metabolites from algae with economical impact. Review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146:60-78.
- Carmichael, W. (1997): The cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27:211-240.
- Castenholz, R.W. & Waterbury, J.B. (1989): Cyanobacteria. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 3*. Willimas and Wilkins, Baltimore, pp. 1710-1727.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S. & Solano, R. (2008): JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:486-494.
- Chisti, Y. (2007): Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.

- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.H. & Hwang, I. (2010): The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signalling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 19:284-295.
- Christaki, E., Karatzia, M. & Florou-Paneri, P. (2010): The use of algae in animal nutrition. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 61(3):267-276.
- Chröst, R.J. and Gajewski, A.J. (1995): Microbial utilisation of lipids in lakewater. *FEMS Microbial Ecology* 18:45-50.
- Codd, G.A. (1995): Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology* 32:149-156.
- Cole, R.A., Jones, T.H. & Finch, S. (1989): Deterrent effect of carboxylic acids on cabbage root fly oviposition. *Ann.Appl.Biol.* 115(1):39-44.
- Cowan, A.K. & Rose, P.D. (1991): Absciscic acid metabolism in salt-stressed cells of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 97:798-803.
- Craigie, J.S. (2011): Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23:371-393.
- Croft, K.P.C. – Jüttner, F. and Slusarenko, A.J. (1993): Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* Pv-phaseolicola. *Plant Physiol.* 101:13-24.
- Crosby, N.T. (1991): Determination of veterinary residues in food. New York, Ellis Horwood.
- Crouch, I.J. & van Staden, J. (1991): Evidence for rooting factors in a seaweed concentrate prepared from *Ecklonia maxima*. *J. Plant Physiol.* 137:319-322.
- Crouch, I.J. & van Staden, J. (1994): Commercial seaweed products as biostimulants in horticulture. *J. Home Consumer Horticul.* 1:19-75.
- Cuortois, J. (2009): Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology* 12:261-273.
- Cysewski, G.R. & Lorenz, R.T. (2004): Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential: *Haematococcus*. In: Richmond, A. (Ed.) *Microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Sciences, 281-288.
- Davies, P.J. (2004a): Introduction. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies, P.J. (Edit): *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Press, Dordrecht pp. 1-15.
- Davies, P.J. (2004b): Regulatory factors in hormone action: level, location and signal transduction. In: Davies, P.J. (Edit): *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Press, Dordrecht pp. 16-35.
- Day, J.G. (2004b): Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. *Nova Hedwigia* 79(1-2):191-205.
- Day, J.G. (2007): Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria. *Methods Mol.Biol.* 368:141-151.
- Day, J.G. & McLellan, M.R. (Eds.) (1995): *Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in Molecular Biology* 38:1-254. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

- Day, J.G., Benson, E.E., Harding, K., Knowles, B., Idowu, M., Bremner, D., Santos, L., Santos, F., Friedl, T., Lorenz, M., Lukesova, A., Elster, J., Lukavsky, J., Herdman, M., Rippka, R. & Hall, T. (2005): Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a Pan-European scientific and biotechnological resource (the COBRA project). *Cryo-Letters* 26:231-238.
- Day, J.G., Lukavsky, J., Friedl, T., Brand, T.J., Campbell, C.N., Lorenz, M. & Elster, J. (2004a): Pringsheim's living legacy: CCALA, CCAP, SAG and UTEX culture collection of algae. *Nova Hedwigia* 79(1-2):27-37.
- Debro, L.H. & Ward, H.B. (1979): Antibacterial activity of freshwater green algae. *Planta Med.* 36:375-378.
- Deliné Draskovits, Á. (1994): Tavaszi káposztalég (Delia radicum Linné). In: Jermy, T. & Balázs, K. (Eds.): A növényvédelmi állattan kézikönyve 5. Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 162-166.
- Del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E. & Gutierrez, C. (2005): Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol. Plant.* 123:173-183.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R. & Vincenzini, M. (2001): Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *J.Appl.Phycology* 13:293-299.
- De, P.K. (1939): The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.* 127:121-139.
- De Smet, I., Voß, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R.E., Swarup, R., Kerr, I., Hodgman, C., Bock, R., Bennet, M., Jürgens, G. & Beeckman, T. (2011): Unraveling the evolution of auxin signaling. *Plant Physiol.* 155:209-221.
- De Veylder, L., Beeckman, T. & Inzé, D. (2007): The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Rev.* 8: 655-665.
- Dicke, M. and Sabelis, M.W. (1988): Infochemical terminology: Based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funt. Ecol.* 2:131-139.
- Dixit, R.B. & Suseela, M.R. (2013): Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. *Antonie van Leeuwenhoek* 103:947-961.
- Dor, I. & Danin, A. (1996): Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea valley, Israel. *Algol.Stud.* 83:197-206.
- Drewes, K. (1928): Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch Blaualgen. *Zentr.Bakteriol.Parasitenk. Abt.II.* 76:88-101.
- Du, Y.J., Van Loon, J.J.A. & Renwick, J.A.A. (2008): Contact chemoreception of oviposition-stimulating glucosinates and an oviposition-deterrent cardenolide in two subspecies of *Pieris napi*. *Physiological Entomology* 20(2):164-174.
- Egorov, N.S. (1985): Antibiotics a scientific approach. Mir Publishers, Moscow, p. 151.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ed.) (2007): *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 428.
- Erwin, D.C. Ribeiro, O.K. (1996): *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 562.
- Evans, L.V. & Trewavas, A.J. (1991): Is algal development controlled by plant growth substances? Minireview. *J.Phycol.* 27:322-326.

- Felföldi T., Somogyi B. Márialigeti K. & Vörös L. (2011): Notes on the biogeography of non-marine planktonic picocyanobacteria: re-evaluating novelty. *J. Plankton Research* 33(10):1622-1626.
- Felföldy L., Szabó E. és Tóth L. (1964): Kétköbméteres algatermesztő berendezés Tihanyban. *Annal.Biol.Tihany* 31:185-222.
- Fink, P. (2007): Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 40(3):155-168.
- Fink, P. – von Elert, E. and Jüttner, F. (2006a): Volatile foraging kairomons in the littoral zone: Attraction of an herbivorous freshwater gastropod to algal odors. *J. Chem. Ecol.* 32:1867-1881.
- Fink, P. – von Elert, E. and Jüttner, F. (2006b): Oxylipins from freshwater diatoms act as attractants for a benthic herbivore. *Arch. Hydrobiol.* 167:561-574.
- Fish, S.A. & Codd, G.A. (1994): Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant cyanobacteria (blue-green algae). *World J. Microbiol.Biotech.* 10:338-341.
- Fogg, G.E. (1975): *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Univ. of Wisconsin Press, 175. pp.
- Frankmölle, W.P., Larsen, L.K., Caplan, F.R., Patterson, G.M.L., Knübel, G., Levine, I.A. & Moore, R.E. (1992): Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I. Isolation and biological properties. *J. Antibiotics* 45:1451-1457.
- Fujioka, S. & Yokota, T. (2003): Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:137-164
- Gacheva, G., Gigova, L., Ivanova, N., Iliev, I., Toshkova, R., Gardeva, E., Kussovski, V. & Najdenski, H. (2013): Suboptimal growth temperature enhance the biological activity of cultures cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *J.Appl.Phycology* 25(1):183-194.
- Gaydon, D.S., Probert, M.E., Buresh, R.J., Meinke, H. & Timsina, J. (2012): Modelling the role of algae in rice crop nutrition and soil organic carbon maintenance. *Eur.J.Agron.* 39:35-43.
- Gerwick, W.H., Roberts, M.A., Proteau, P.J. & Chen, J.L. (1994): Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity. *J.Appl.Phycol.* 6:143-149.
- Gerwick, W.H., Coates, R.C., Engene, N., Gerwick, L., Grindberg, R.V., Jones, A.C. & Sorrels, C.M. (2008): Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. *Microbe* 3:277-284.
- Glazebrook, J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annals Review of Phytopathology* 43:205-227.
- Glits M. (1992): Feoramuláriás levélfoltosság paprikán. *Kertészet és Szőlészet*, 34: 8-9.
- Goyal, S.K. (1996): Sustainability in rice cultivation through algal biofertilizer. In: Roy, N.K. (Ed.): *Agrochemicals and Sustainable Agriculture*. APC Publications Pvt. Ltd, New Delhi pp. 161-172.
- Granhall, U. (1975): Nitrogen fixation by blue-green algae in temperate soils. In: Stewart, W.D.P. (Ed.): *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 189-198.

- Grobbelaar, J.U., Soeder, C.J. & Stengel, E. (1990): Modeling algal productivity in large outdoor cultures and waste treatment systems. *Biomass* 21:297-314.
- Gromov, B.V., Vepritskiy, A.A., Titova, N.N., Mamkayeva, K.A. & Alexandrova, O.V. (1991): Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (Cyanobacterium). *J.Appl.Phycol.* 3:55-59.
- Gudesblat, G.E. & Russinova, E. (2011): Plants grow on brassinosteroids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 530-537.
- Guillard, R.R.L. (1973): Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Stein, J.R. (Ed): *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 69-85.
- Gupta, V., Kumar, M., Brahmabhatt, H., Reddy, C.R.K., Seth, A. & Jha, B. (2011): Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiol. Biochem.* 49:1259-1263.
- Gupta, V., Ratha, S.K., Sood, A., Chaudhary, V. & Prasanna, R. (2013a): New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) – Prospects and challenges. Review article. *Algal Research* 2:79-97.
- Gupta, V., Prasanna, R., Cameotra, S.S. Dureja, P., Singh, R.N. & Sharma, J. (2013b): Enhancing the production of an antifungal compound from *Anabaena laxa* through modulation of environmental conditions and its characterization. *Process Biochemistry* 48:768-774.
- Halliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. (2001): A plastid envelope location of *Arabidopsis* *ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J.* 28:201-208.
- Harborne, J.B. and Tomas-Barberan, E.A. (1989): *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids.* Clarendon Press, Oxford, 438 pp.
- Harder, R. (1917): Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen *Nostoc punctiforme*. *Z.Bot.* 9:145-158.
- Harder, R. & Witsch von H. (1942): Über die Massenkultur von Diatomeen. *Ber.Deutsch.Bot.Ges.* 60:146-152.
- Harrawijn, P. – Oosten van A.M. and Piron, P.G. (2001): *Natural terpenoids as messengers.* Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 400 pp.
- Hashtroudi, M.S., Ghassempour, A., Riahi, H., Shariatmadari, Z. & Khanjir, M. (2013): Endogenous auxins in plant growth-promoting cyanobacteria – *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. *J.Appl.Phycol.* 25:379-386.
- Hayashi, K., Hayashi, T. & Kojima, I. (1996): A natural sulphated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Research and Human Retroviruses* 12(15):1463-1471.
- Hegewald, E. (1978): Eine neue Unterteilung der Gattung *Scenedesmus* Meyen. *Nova Hedwigia* 33:343-376.

- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravi Kumar, R., Ganesan, V. & Anbazhagan, C. (2011): Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:1737-1746.
- Hermis, D.A. & Mattson, W.J. (1992): The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology* 67(3):283-335.
- Hess, C.E. (1961): The physiology of root initiation on easy- and difficult-to-root cuttings. *Hormonology* 3:3-6.
- Heydarizadeh, P., Poirier, I., Loizeau, D., Ulmann, L., Mimouni, V., Schoefs, B. & Bertrand, M. (2013): Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids. *Mar. Drugs* 11:3425-3471.
- Hirata, K., Takashina, J., Nakagami, H., Ueyama, S., Murakami, K. Jaki, B., Heilmann, J. & Sticher, O. (2000): New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). *J. Nat. Prod.* 63 1283-1285.
- Hirsch, R., Hartung, W. & Gimmler, H. (1989): Absciscic acid content of algae under stress. *Bot. Acta.* 102: 326-334-
- Hobson, P. & Fallowfield, H.J. (2003): Effect of irradiance, temperature and salinity on growth and toxin production by *Nodularia spumigena*. *Hydrobiologia* 493:7-15.
- Hoek, C. van den, Man, D.G. & Jahns, H.M. (1998): *Algae. An Introduction to phycology.* Cambridge University Press, 627 pp.
- Hombeck, M. and Boland, W. (1998): Biosynthesis of the algal pheromone fucoserratene by the freshwater diatom *Asterionella Formosa* (Bacillariophyceae). *Tetrahedron* 54:11033-11042.
- Hoshaw, R.W. & Rosowski, J.R. (1973): Methods for microscopic algae. In: Stein, J.R. (Ed): *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 53-68.
- Hradecká, V., Novák, O., Havlíček, L. & Strnad, M. (2007): Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 847:162-173.
- Ishibashi M, Moore RE, Patterson GML, Xu C, Clardy J (1986) Scytophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyte *Scytonema pseudohofmanni*. *J Org Chem* 51: 5300–5306.
- Issa, A.A. (1999): Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environ. Toxicol. Pharm.* 8:33-37.
- Iwamoto, H. (2004): Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species. In: Richmond, A. (Edit): *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* Blackwell Science Ltd. pp. 255-263.
- Izaugirre, G. and Taylor, W.D. (1995): Geosmin and 2-methylisoborneol production in a major aquaduct system. *Water Sci. Technol.* 31:41-48.
- Jaki, B., Orjala, J., Heilmann, J., Linden, A., Vogler, m B. & Sticher, O. (2000): Novel extracellular diterpenoids with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Nat. Prod.* 63:339-343.

- Jesus Raposo, M.F.de, Morais R.M.S.C.de & Morais A.M.M.B.de (2013): Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. Minireview. Life Sciences 93:479-486.
- Jirásková, D., Pouličková, A., Novák, O., Sedláková, K., Hradecká, V. & Strnad, M. (2009): High through-put screening technology for monitoring phytohormones production in microalgae. J. Phycol. 45:108-118.
- Johansen, J.R. (1993): Cryptogamic crusts of semiarid and arid lands of North America. J. Phycol. 29:140-147.
- Jüttner, F. (1995): Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater Cyanobacteria and algae. Water Science and Technology 31:69-78.
- Jüttner, F. (2005): Evidence that polyunsaturated aldehydes of diatoms are repellents for pelagic crustacean grazers. Aquat. Ecol. 39:271-282.
- Jüttner, F. and Watson, S.B. (2007): Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. Minireview. Applied and Environmental Microbiology 73(14):4395-4406.
- Kadam S.U., Tiwari, B.K. & O'Donnell, C.P. (2013): Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. J.Agricult. & Food Chemistry 61:4667-4675.
- Kajiyama, S., Kanzaki, H., Kawazu, K. & Kobayashi, A. (1998): Nostofungicidine, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green alga *Nostoc commune*. Tetrahedron Letters 39:3737-3740.
- Kang, H.K., Salim, H.M., Akter, N., Kim, D.W., Kim, J.H., Bang, H.T., Kim, M.J., Na, J.C., Hwangbo, J., Choiu, H.C. & Suh, O.S. (2013): Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. J.Appl.Poult.Res. 22:100-108.
- Kannaiyan, S., Aruna, S.J., Kumari, S.M.P. & Hall, D.O. (1997): Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. J. Appl. Phycol. 9:167-174.
- Karlsson, J.O.M. & Toner, M. (1996): Long term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. Biomaterials 17:243-256.
- Karthikeyan, N., Prasanna, R., Lata, N., Kaushik, B.D. (2007): Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. Eur.J.Soil Biol. 43:23-30.
- Karthikeyan, N., Prasanna, R., Sood, A., Jaiswal, P., Nayak, S. & Kaishik, B.D. (2009): Physiological characterization and electron microscopic investigations of cyanobacteria associated with wheat rizosphere. Folia Microbiol. 54:43-51.
- Kellam, S.J., Cannell, R.J.P., Owsianka, A.M. & Walker, J.M. (1988): Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. Br.phycol.J. 23:45-47.
- Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, D.M., Critchley, A.T., Craigie, J.S., Norrie, J. & Prithiviraj, B. (2009): Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. J. Plant Grow. Regul. 28:386-399.

- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U. & Cohen Z. (2011): LC-PUFA from photosynthesis microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:905-915.
- Kieber, J. (2002): Cytokinins: regulators of cell division. In: Taiz, L. & Zeiger, E. (eds.) *Plant Physiology* (3rd ed). Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Kimura, M. (2005): Populations, community composition and biomass of aquatic organisms in the floodwater of rice fields and effects of field management. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51:159-181.
- Kiseleva, A.A., Tarachovskaya, E.R. & Shishova, M.F. (2012): Biosynthesis of phytohormones on algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 59:595-610.
- Knop, W. (1865): Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. *Landw. Vers. Sta.* 7: 93.
- Knutsen, G. & Hansen, K. (1997): Search for bioactive substances from marine microalgae and cyanobacteria. In: Le Gal, Y. & Muller-Feuga, A. (Eds.): *Marine microorganisms for industry*. Editions Ifremer, Plouzané, pp. 169-178.
- Komarek, J. & Fott, B. (1983): Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, A. (Edit): *Das Phytoplankton des Süßwassers*, vol. 7/1., G.Fischer Verl.
- Kostál, V., Bauer, R. & Stadler, E. (2000): Exploration and assessment of the oviposition substrate by the cabbage root fly, *Delia radicum* (Diptera: Anomyiidae). *Eur. J. Entomol.* 97:33-40.
- Kotrbaček, V., Skrivan, M., Kopecký, J., Penkava, O., Hudečková, P., Uhriková, I. & Doubek, J. (2013): Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*. *Czech Journal of Animal Science* 58(5):193-200.
- Koussoroplis, A.M., Lemarchand, C., Bec, A., Desvillettes, C., Amblard, C., Fournier, C., Berny, P. & Bourdier, G. (2008): From aquatic to terrestrial food webs: Decrease of the docosahexaenoic acid/linoleic acid ratio. *Lipids* 43:461-466.
- Krupinska, k. & Humbeck K. (1994): Light-induced synchronous cultures, and excellent tool to study the cell cycle of unicellular algae. *New trends in photobiology* (invited review). *J. Photochemistry & Photobiology B: Biology* 26:217-231.
- Kulik, M.M. (1995): The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 101:585-599.
- Kuznetsov, E.D. & Vladimirova, M.G. (1964): Iron as a factor limiting the growth of *Chlorella* on Tamiya medium. *Sov. Plant Physiol.* 11(4):82-89.
- Lee, R.E. (Ed.) (1989): *Phycology*. Second Edition, Cambridge University Press, 645 pp.
- Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zenrella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J.E. & Kennedy, C. (2004): Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* 186:5384-5391.

- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M. & Pollmann, S. (2010): Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur. J. Cell Biol.* 89:895-905.
- Lehtimäki, J., Sivonen, K., Luukkainen, R. & Niemela, S.I. (1994): The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. *Arch.Hydrobiol.* 130:269-282.
- Lepossa A. (2003): Talajalgák mennyiségi vizsgálata a Balaton-felvidéki Nemzeti Parkban, valamint talajból izolált algatenyészetek növényi növekedést befolyásoló hatásainak kimutatása. PhD értekezés, Veszprémi Egyetem, Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok Doktori Iskola, Keszthely, pp. 124.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2011): Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology* 102:123-129.
- Loake, G. & Grant, M. (2007): Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 10(5):466-472.
- Ludwig-Müller, J. (2011): Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* 62:1757-1773-
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009): Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann.Rev.Microbiol.* 63:541-546.
- Lum, K.K., Kim, J. & Lei, X.G. (2013): Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. Review. *J.Animal Science and Biotechnology* 4(53):1-7.
- Lyons, R., Manners, J.M. & Kazan, K. (2013): Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. *Plant Cell Reports* 32:815-827.
- Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeck, R., McCaughey, M.J., Overbeek, R. & Woese, C.R. (1997): The RDP (ribosomal database project). *Nucleic Acids Res.* 25:109-110.
- Manjumath, M., Prasanna, R., Nain, L., Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., Jaggi, S. & Kaushik, B.D. (2010): Biocontrol potential of cyanobacterial metabolites against damping off disease caused by *Pythium aphanidermatum* in solanaceous vegetables. *Arch.Phytopathol. & Plant Protection* 43(7):666-677.
- Mano, Y. & Nemoto, K. (2012): The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 63:2853-2872.
- Marazzi, C., Patrian, B. & Stadler, E. (2003): Secondary metabolites of the leaf surface affected by sulphur fertilisation and perceived by the cabbage root fly. *Chemoecology* 14(2):87-94.
- Márton G., Péter J., Szajkó L. és Schmidt J. (1968): Algatermesztés és etetési kísérletek. I. rész Algatermesztés nem steril viszonyok között. Mosonmagyaróvári Agrártudományi Főiskola Közleményei 11(2):213-228.
- Marvan, P., Pribil, S. & Lhotsky, O. (Eds.) (1979): Algal assays and monitoring eutrophication. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 253 pp.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. (2010): Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew.Sustain.Energy Rev.* 14:217-232.

- Melkonian, M. (1990): Phylum Chlorophyta. Class Chlorophyceae. In: Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. & Chapman, D.J. (Eds.): Handbook of Protoctista. Jones & Bartlett Publ., Boston, pp. 608-616.
- Mendiola, J.A., Torres, C.F., Toré, A., Martín-Álvarez, P.J., Santoyo, S., Arredondo, B.O., Senoráns, F.J., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2007): Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. Eur. Food Res. Technol. 224:505-510.
- Metting, B. (1981): The systematics and ecology of soil algae. Bot.Rev. 47:195-311.
- Metting, B. & Rayburn, W.R. (1983): The influence of a microalgal conditioner on selected Washington soils: an empirical study. Soil Sci.Soc.Am.J. 47:682-685.
- Metting, B., Zimmerman, W.J., Crouch, I.J. & van Staden, J. (1990): Agronomic uses of seaweed and microalgae. In: Akatsuka, I. (ed) Introduction to Applied Phycology, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, pp 589-627.
- Milledge, J.L. (2011): Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. Mini-review. Rev.Environ.Sci.Biotechnol. 10:31-41.
- Miller, J.D.H. & Fogg, G.E. (1957): Studies on the growth of Xanthophyceae in pure culture. I. The mineral nutrition of *Monodus subterraneus* Petersen. Arch.Mikrobiol. 28:1-17.
- Miller, C.O. (1965): Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: compounds from maize which promote cell division. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54:1052-1058.
- Min Thein (1993): Production of Spirulina in Myanmar (Burma). Bull.Inst.Océanograph., Monaco, 12:175-178.
- Misra, S. & Kaushik, B.D. (1989): Growth promoting substances of cyanobacteria. II. Detections of amino acids, sugars and auxins. Proc.Indian natn.Sci.Acad. B55(5-6):499-504.
- Miyashita, K. – Nara, E. and Ota, T. (1993): Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in an aqueous solution. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 57:1638-1640.
- Molina Grima, E., Acién Fernández, F.G., Garcia Camacho, F. & Chisti, Y. (1999): Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. J.Biotechnol. 70:231-247.
- Molina Grima, E., Belarbi, E-H., Acién Fernández, F.G., Robles Medina, A. & Chisti, Y. (2003): Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnol.Adv. 20:491-515.
- Molina Grima, E., Fernández, J., Acién Fernández, F.G. & Chisti, Y. (2001): Tubular photobioreactor design for algal cultures. J.Biotechnol. 92:113-131.
- Mollenhauer, D. (2004): Historical aspects of culturing microalgae in Central Europe and the impact of Ernst Georg Pringsheim, a pioneer in algal culture collections. Nova Hedwigia 79(1-2):1-26.
- Monod, J. (1950): La technique de culture continue; théorie et applications. Annls.Inst.Pasteur, Paris 79:390-401.
- Moon, S.S., Chen, J.L., Moore, R.E. & Patterson, G.M.L. (1992): Calophycin, a fungicidal cyclic decapeptide from the terrestrial blue-green alga *Calothrix fusca*. J.Org.Chem. 57:1097-1103.

- Moore, R.E., Patterson, G.M.L. & Carmichael, W.W. (1988): New pharmaceuticals from cultured blue-green algae. In: Fautin D.G. (Edit): Biomedical importance of marine organisms. Mem. Calif. Acad. Sci. 13:143-150.
- Morton, S.L. & Bomber, J.W. (1994): Maximizing okadaic acid content from *Prorocentrum hoffmannianum* Faust. J. Appl. Phycol. 6:41-44.
- Möhren, S. and Jüttner, E. (1983): Odorous compounds of different strains of *Anabaena* and *Nostoc* (Cyanobacteria). Water Science and Technology 15:221-223.
- Mukherjee, G., Nayak, B.K. & Das, D. (2013): Cyanobacteria as a valuable source of antiviral, antibacterial and antifungal compounds – an overview. Algological Studies 143:3-25.
- Murphy, A. (2002): Auxin: the growth hormone. In: Taiz, L. & Zeiger, E. (eds.) Plant Physiology (3rd ed). Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Müller, D.G. – Jaenicke, L. – Donike, M. and Akintobi, T. (1971): Sex attractant in a brown alga – chemical structure. Science 171:815.
- Nain, L., Rana, A., Joshi, M., Jadhav, S.D., Kumar, D., Shivay, Y.S., Paul, S. & Prasanna, R. (2010): Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. Plant Soil 331:217-230.
- Najdenski, H.M., Hristo, M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavsky, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S. & Kussovski, V.K. (2013): Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. Int. J. of Food Science & Technology 48(7):1533-1540.
- Nambara, E. & Marion-Poll, A. (2005): Absciscic acid biosynthesis and catabolism. Annu. Rev. Plant Biol. 56:165-185.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P. & Jones, J.D. (2008): DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signalling. Curr. Biol. 18(9):650-655.
- Nelson, W.R. & van Staden, J. (1985): 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid in seaweed concentrate. Bot. Mar. 28:415-417.
- Neuhof, T., Schmieder, P., Preussel, K., Dieckmann, R., Pham, H., Bartl, F. & Dohren, H. von (2005): Hassallidin A, a glycosylated lipopeptide with antifungal activity from the cyanobacterium *Hassallia* sp. J. of Natural Products 68(5):695-700.
- Noaman, N.H., Fattah, A., Khaleafa, M. & Zaky, S.H. (2004): Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. Microbiol. Res. 159:395-402.
- Novák, O., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Lenobel, R. & Strnad, M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass-spectrometry. Anal. Chim. Acta 480:207-218.
- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K. & Strnad, M. (2008): Cytokinin profiling in plant-tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Phytochem. 69:2214-2224.
- Novick, A. & Szilard, L. (1950): Description of the chemostat. Science, Washington, D.C. 112:715-716.
- Olesen, P.E., Maretzki, A. & Almodóvar, L.R. (1964): An investigation of antimicrobial substances from marine algae. Bot. Mar. 6:224-232.

- Osman, M.E.H., El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H. & Gheda, S.F. (2010): Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biol.Fertil.Soil* 46:861-875.
- Ostensvik, O., Skulberg, O.M., Underdal, B. & Hormazabal, V. (1998): Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria – a comparative study of bacterial bioassays. *J.Appl.Microbiol.* 84:1117-1124.
- Oswald, W.J. (1989): Large-scale culture systems (engineering aspects). In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (Eds): *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 305-328.
- Ördög V. (1982): Apparatus for laboratory algal bioassay. *Int.Revue ges.Hydrobiol.* 67(1):127-136.
- Ördög V. (1984): Beiträge zur Erhaltung von Algenstammkulturen. *Acta hydrochim. et hydrobiol.* 12(4):425-429.
- Ördög, V., Stirk, W.A., van Staden, J., Novák, O. & Strand, M. (2004): Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. *J. Phycol.* 40:88-95.
- Ördög V., Stirk, W.A., Bálint P., Staden, J. van & Lovász Cs. (2012): Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J.Appl.Phycol.* 24:907-914.
- Ördög V., Stirk, W.A., Bálint P., Lovász Cs., Pulz, O. & van Staden, J. (2013): Lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella* and *Scenedesmus* strains grown in nitrogen stressed conditions. *J.Appl.Phycol.* 25(1):233-243.
- Painter, T. (1993): Carbohydrate polymers in desert reclamation: the potential of microalgal biofertilizers. Review paper. *Carbohydrate Polymers* 20:77-86.
- Pampolino, M.F., Laureles, E.V., Gines, H.C. & Buresh, R.J. (2008): Soil carbon and nitrogen changes in long-term continuous lowland rice cropping. *Soil Sci.Soc.Am.J.* 72:798-807.
- Panjaitan, T., Quigley, S.P., McLennan, S.R. & Poppi, D.P. (2010): Effect of the concentration of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) algae in the drinking water on water intake by cattle and the proportion of algae bypassing the rumen. *Animal Production Science* 50:405-409.
- Papenfus, H.B., Stirk, W.A., Finnie, J.F. & van Staden, J. (2012): Seasonal variation in the polyamines of *Ecklonia maxima*. *Bot. Mar.* 55:539-546.
- Parker, B.C. & Bold, H.C. (1961): Biotic relationships between soil algae and other microorganisms. *Amer.J.Bot.* 48:185-197.
- Patterson, G.M.L., Larsen, L.K. & Moore, R.E. (1994): Bioactive natural products from blue-green algae. *J.Appl.Phycol.* 6:151-157.
- Pawar, S.T. & Puranik, P.R. (2008): Screening of terrestrial and freshwater halotolerant cyanobacteria for antifungal activities. *World J. Microbiol.Biotechnol.* 24:1019-1025.
- Pearson, R.C. & Goheen, A.C. (1998): *Compendium of Grape Diseases*. Fourth printing, APS Press, St. Paul, MN. USA, pp. 93.
- Pencík, A., Rolčík, J., Novák, O., Magnus, V., Barták, P., Buchtík, R., Salopek-Sondi, B. & Strnad, M. (2009): Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta* 80:651-655.

- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y. (2011): Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Review. Water Research 45:11-36.
- Persson, P.E. (1988): Odorous algal cultures in culture collections. Water Science and Technology 20:211-213.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010): Cellular responses to auxin: division versus expansion. Cold Spring Harbour Perspectives in Biology 2:a001446.
- Perveen, K. & Alwathnani, H.A. (2013): Bioactivity of *Nostoc linckia* isolated from the Desert of Saudi Arabia against fungi responsible for the post harvest. J. of Pure & Applied Microbiology 7(3): 2161-2166.
- Piccardi, R., Frosini, A., Tredici, M.R. & Margheri, M.C. (2000): Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. J.Appl.Phycol. 12:553-556.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C. & Michaud, P. (2013): Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. Review. J.Ind.Microbiol.Biotechnol. DOI 10.1007/s10295-013-1281-7,
- Piotrowska, A. & Czerpak, R. (2009): Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinin. Acta Physiol. Plant. 31:573-585.
- Plaats-Niterink van der A.J. (1981): Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, 21: 242.
- Pohnert, G. (2000): Wound-activated chemical defence in unicellular planktonic algae. Angew. Chem.-Int. Edit. 39:4352-4354
- Pohnert, G. and Boland, W. (1996): Biosynthesis of the algal pheromone hormosirene by the freshwater diatom *Gomphonema parvulum* (Bacillariophyceae). Tetrahedron 52:10073-10082.
- Pouneva, I. (2006): Effect of abscisic acid and ontogenic phases of the host alga on the infection process in the pathosystem *Scenedesmus acutus* – *Phlyctidium scenedesmi*. Acta Phsiol. Plant. 28:395-400.
- Prasad, P.V.D. (1982) Effect of some growth substances on three freshwater green aglae. Cryptogamie Algol. 4:315-321.
- Prasad, K., Das, A.K., Oza, M.D., Brahmhatt, H., Siddhanta, A.P., Meena, R., et al. (2010): Detection and quantification of some plant growth regulators in a seaweed-based foliar spray employing a mass spectrophotometric technique sans chromatographic separation. J. Agric. Food Chem. 58:4594-4601.
- Prasanna, R., Sood, A., Jaiswal, P., Nayak, S., Gupta, V., Chaudhary, V., Joshi, M. & Natarajan, C. (2010): Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. Appl.Biochem.Microbiol. 46:133-147.
- Prasanna, R., Chaudhary, V., Gupta, V., Babu, S., Kumar, A., Singh, R., Shivay, Y.S. & Nain, L. (2013): Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. Eur.J. Plant Pathol. 136:337-353.
- Prashar, P., Kapoor, N. & Sachdeva, S. (2014): Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. Rev.Environ.Sci.Biotechnol. 13:63-77.

- Pringsheim, E.G. (1928): Algen-Reinkulturen. Ber.Deutsch.Bot.Ges. 46:216-219.
- Pringsheim, E.G. (1949): Pure cultures of algae. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 119.
- Pringsheim, E.G. (1954): Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung. VEB G. Fischer Verl., Jena, 109. pp.
- Prinsen, E., Redig, P., Vandongen, W., Esmans, E.L. & van Ockelen, H.A. (1995): Quantitative analysis of cytokinins by electrospray tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9:948-953.
- Procházková, G., Brányiková, I. Zachleder, V. & Brányik, T. (2013): Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. J.Appl.Phycol. DOI 10.1007/s10811-013-0154-9.
- Provasoli, L. & Carlucci, A.F. (1974): Vitamins and growth regulators. In: Stewart, W.D.P. (Edit): Algal physiology and biochemistry. Botanical Monographs 10. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 741-787.
- Pulz, O. (2001): Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl.Microbiol.Biotechnol. 57:287-293.
- Pulz, O. & Gross, W. (2004): Valuable products from biotechnology of microalgae. Mini-Review. Appl.Microbiol.Biotechnol. 65:635-648.
- Rashash, D. – Dietrich, A. – Hoehn, R. and Parker, B. (1995): The influence of growth conditions on odour-compound production by two chrysophytes and two cyanobacteria. Water Science and Technology 31:165-172.
- Rastogi, R.P. & Sinha, R.P. (2009): Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. Research review paper. Biotechnology Advances 27:521-539.
- Rastoll, M.J., Ouahid, Y., Martín-Gordillo, F., Ramos, V., Vasconcelos, V. & del Campo, F.F. (2013): The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. J.Appl.Phycol. 25(5):1483-1493.
- Rincon, D.D., Velasquez, H.A., Davila, M.J., Semprun, A.M., Morales, E.D. & Hernandez, J.L. (2012): Substitution levels of fish meal by *Arthrospira* (=Spirulina) maxima meal in experimental diets for red tilapia fingerlings (*Oreochromis* sp.). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 25(3):430-437.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J.Gen.Microbiol. 111:1-61.
- Robert-Seilantantz, A., Grant, M. & Jones, J.D.G. (2011a): Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just Jasmonate-Salicylate antagonism. Ann. Rev. Phytopathol. 49:317-343.
- Robert-Seilantantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. & Jones, J.D.G. (2011b): The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. The Plant Journal 67:218-231.

- Roger, P.A. (1995): Biological nitrogen fixation and its management in wetland rice cultivation. *Fertilizer Research* 42:261-276.
- Roger, P.A. & Kulasoorya, S.A. (1980): Blue-green algae and rice. IRRI, Los Banos
- Roger, P.A. & Ladha, J.K. (1992): Biological nitrogen fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant Soil* 141:41-55.
- Roger, P.A. & Reynaud, P.A. (1979): Ecology of blue-green algae in paddy fields. In: IRRI, *Nitrogen and Rice*, Los Banos, pp. 289-309.
- Rolčik, J., Lenobel, R., Siglerová, V. & Strnad, M. (2002): Isolation of melatonin by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. B* 775:9-15.
- Rontani, J. (2001): Visible light-dependent degradation of lipidic phytoplanktonic components during senescence: a review. *Phytochemistry* 58:187-202.
- Rotem, J. (1994): *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 326.
- Ruther, J. – Meiners, T. and Steidle, J.L.M. (2002): Rich in phenomena – lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* 12:161-167.
- Saadatnia, H. & Riahi, H. (2009): Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant Soil Environ.*, 55:207-212.
- Saeid, A., Chojnacka, K., Korczynski, M., Komiewicz, D. & Dobrzanski, Z. (2013): Biomass of *Spirulina maxima* enriched by biosorption process as a new feed supplement for swine. *J. Appl. Phycol.* 25(2):667-675.
- Saharan, G.S. & Naresh Mehta (2008): *Sclerotinia diseases of crop plants: biology ecology and disease management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. ???
- Sairanen, I., Novák, O., Pěňčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G. & Ljung, K. (2012): Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:4907-4916.
- Sakakibara, H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:431-449.
- Santos, L.M.A. & Santos, M.F. (2004): The Coimbra Culture Collection of Algae (ACOI). *Nova Hedwigia* 79(1-2):39-47.
- Schlegel, H.G. (1985): *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 571.
- Schwartz, R.E., Hirsch, C.F., Sigmund, J.M. & Pettibone, D.J. (1989): Hapalindolinone compounds as vasopressin antagonists. US Patent No. 4,803. pp. 217-223.
- Sharma H.S.S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J.R. & Martin, T. (2014): Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J. Appl. Phycol.* 26:465-490.
- Sharma, N.K. & Rai, A.K. (2011): Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environ. Rev.* 19:1-15.
- Shattock, R.C., D.S. Shaw, A.M. Fyfe, J.R. Dunn, K.H. Loney, and J.A. Shattock (1990): Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988: mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. *Plant Pathol.* 39: 242_248.

- Silva-Stenico, M.E., Silva, C.S.P., Lorenzi, A.S., Shishido, T.K., Etchegaray, A., Lira, S.P., Moraes, L.A.B. & Fiore, M.F. (2011): Microbiol.Res. 166:161-175.
- Singh, J.S., Pandey, V.C. & Singh, D.P. (2011): Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development, Agriculture, Ecosystems and Environment 140:339-353.
- Sivonen, K. (1990): Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl.Environ.Microbiol. 56:2658-2666.
- Skinner, G. & Finch, S. (1987): Reduction of cabbage root fly (*Delia radicum*) damage by protective discs. Ann.Appl.Biol. 108(1):1-10.
- Skulberg, R. & Skulberg, O.M. (1990): Research with algal cultures. NIVA's Culture Collection of Algae. Norwegian Institute for Water Research, Oslo, pp. 32.
- Skulberg, O.M. (2000): Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. J.Appl.Phycol. 12:341-348.
- Smith, J.L., Boyer, G.L. & Zimba, P.V. (2008): A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. Aquaculture 280:5-20.
- Smitka, T.A., Bonjouklian, R., Doolin, L., Jones, N.D., Deeter, J.B., Yoshida, W.Y., Prinsep, M.R., Moore, R.E. & Patterson, G.M.L. (1992): Ambiquine isonitriles, fungicidal hapalindole-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the Stigonemataceae. J.Org.Chem. 57:857-861.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. (1991): Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society, St Paul, USA, pp. 113.
- Soeder, C.J. (1979): Massive cultivation of microalgae: results and prospects. Hydrobiologia 72:197-209.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R.A., Yazdi, M.T., Shokravi, S. & Fernandez-Valiente, E. (2005): Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. Pharmaceutical Biology 43(5):455-459.
- Staub, R. (1961): Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. Schweiz. Z. Hydrol. 23: 83-198.
- Stein, J.R. (Ed.) (1973): Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge pp. 212.
- Stephens, E., Ross, I.L., Mussgnug, J.H., Wagner, L.D., Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. (2010): Future prospects of microalgal biofuel production systems. Trend sin Plant Science 15(10):554-564.
- Stewart, J.B., Bornemann, V., Chen, J.L., Moore, R.E., Caplan, F.R., Karuso, H., Larsen, L.K. & Patterson, G.L.M. (1988): Cytotoxic, fungicidal nucleosides from bluegreen algae belonging to the Scytonemataceae. J.Antibiotics 41:1048-1056.
- Stirk, W.A., Ördög, V., van Staden, J. & Jäger, K. (2002): Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. J. Appl. Phycol. 14:215-221.

- Stirk, W.A., Arthur, G.D., Lourens, A.F., Novák, O., Strnad, M. & van Staden, J. (2004): Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. *J. Appl. Phycol.* 16:31-39.
- Stirk, W.A., Novák, O., Hradecká, V., Pěňčík, A., Rolčík, J., Strnad, M. & van Staden, J. (2009): Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Dictyota humifusa* (Phaeophyta): towards understanding their biosynthesis and homeostasis. *Eur. J. Phycol.* 44:231-240.
- Stirk, W.A., van Staden, J., Novák, O., Doležal, K., Strnad, M., Dobrev, P.I., Sipos, G., Ördög, V. & Bálint, P. (2011): Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (Chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle. *J. Phycol.* 47:291-301.
- Stirk, W.A., Ördög, V., Novák, O., Rolčík, J., Strnad, M., Bálint, P. & van Staden, J. (2013a): Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J. Phycol.* 49:459-467.
- Stirk, W.A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M. & Ördög, V. (2013b): Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiol. Biochem.* 70:348-353.
- Stirk, W.A., Tarkowská, D., Turečová, V., Strnad, M. & van Staden, J. (2014a): Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak[®], a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *J. Appl. Phycol.* 26:561-567.
- Stirk, W.A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., Turečová, V., Strnad, M., Ördög, V. & van Staden, J. (2014b): Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae): *Plant Physiol. Biochem.* 79:66-76.
- Surek, B. (2008): Meeting report: Algal culture collections 2008. An International Meeting at the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), Dunstaffnage Marine Laboratory, Dunberg, Oban, United Kingdom; June 8-11, 2008. *Protist* 159:509-517.
- Suutari, M., Majaneva, M., Fewer, D.P., Voirin, B., Aiello, A., Friedl, T., Chiarello, A.G. & Blomster, J. (2010): Molecular evidence for a diverse green algal community growing in the hair of sloths and a specific association with *Trichophilus welckerei* (Chlorophyta, Ulvophyceae). *BMC Evolutionary Biology* 10:86.
- Swaczynová, J., Novák, O., Hauserová, E., Fuksová, K., Síša, M., Kohout, L. & Strnad, M. (2007): New techniques for the estimation of naturally occurring brassinosteroids. *J. Plant Grow. Regul.* 26:1-14.
- Sztein, A., Cohen, J.D., García de la Fuente, I. & Cooke, T.J. (1999): Auxin metabolism in mosses and liverworts. *Am. J. Bot.* 86:1544-1555.
- Tabachek, J.A.L. and Yurkowski, M. (1976): Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites, geosmin and 2-methylisoborneol in saline lakes in Manitoba. *J.Fish.Res.Board Can.* 33:25-35.
- Tamiya, H. (1966): Synchronous cultures of algae. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 17:1-27.
- Tamiya, H., Iwamura, T.I., Shibata, K., Hase, E. & Nihei, T. (1953): Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochem.biophys.Acta* 12:23-40.

- Tan, L.T. (2010): Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *J.Appl.Phycol.* 22:659-676.
- Tangl H. & Machay M.L. (1956): Large scale cultures of unicellular freshwater algae as protein and fat source for animal feeding. *Kísérletügyi Közlemények* 50(1):41-56.
- Tantawy, S.T.A. (2011): Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. *J.Food, Agriculture & Environment* 9(1):663-666.
- Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Y.I. & Shishova, M.F. (2007): Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54:186-194.
- Tate, J.J., Gutierrez-Wing, M.T., Rusch, K.A. & Benton, M.G. (2013): The effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of green algae *Chlorella* sp.: A review. *J.Plant Growth Regul.* 32:417-428.
- Tell, G. & Mataloni, G. (2005): Cyanobacteria (Cyanoprokaryota) from Andian arid soils (Argentina). *Algol.Stud.* 116:71-77.
- Thajuddin, N. & Subramanian, G. (2005): Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 89:47-57.
- Thepenier, C. & Guin, C. (1985): Studies on optimal conditions for polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *MIRCEN Journal* 1:257-268.
- Thomas, S.P., Zaritsky, A. & Boussiba, S. (1991): Ammonium excretion by a mutant of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. *Bioresource Technology* 38:161-166.
- Tietz, A., Ruttkowski, U., Köhler, R. & Kasprik, W. (1989): Further investigations on the occurrence and the effects of abscisic acid in algae. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 184:259-266.
- Tirkey, J. & Adhikary, S.P. (2005): Cyanobacteria in biological soil crusts of India. *Curr.Sci.* 89:515-521.
- Tirkey, J. & Adhikary, S.P. (2006): Blue-green algae in the biological soil crusts of different regions of India. *Feddes Repertor* 117:280-306.
- Tomaselli, L. (2004): The microalgal cell. In: Richmond, A. (2004): *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science, p. 3-19.
- Tominaga, N., Takahata, M. C. & Tominaga, H. (1993): Effects of NaCl and KNO₃ concentrations on abscisic acid content on *Dunaliella* sp. (Chlorophyta). *Hydrobiol.* 267:163-168.
- Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.F.M., Wiedner, C., et al. (2005): The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl.Environ.Microbiol.* 71:5177-5181.
- Tredici, M.R. (1999): Bioreactors, photo. In: Flickinger, M.C. & Drew, S.W. (Eds): *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. Wiley, pp. 395-419.
- Tredici, M.R. (2004): Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Richmond, A. (Ed.): *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Publ.Comp. pp.178-214.

- Turečková, V., Novák, O. & Strnad, M. (2009): Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L. leaves by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* 80:390-399.
- Ullmann, I. & Büdel, B. (2001): Biological soil crusts of Africa. In: Belnap, J. & Lange, O.L. (Eds): *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management*. Springer, Berlin
- Urbanová, T., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M. & Hedden, P. (2013): Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 112:85-94.
- Vance, B.D. (1987): Phytohormone effects on cell division in *Chlorella pyrenoides* Chick (TX-7-11-05) (Chlorellaceae). *J. Plant Grow. Regul.* 5:169-173.
- Vera, J., Castro, J., Gonzales, A. & Moenne, A. (2011): Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs* 9(12):2514-2525.
- Vestola, J., Shishido, T.K., Jokela, J., Fewer, D.P., Aitio, O., Permi, P., Wahlsten, M., Wang, H., Rouhiainen, L. & Sivonen, K. (2014): Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. *PNAS Early Edition*, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1320913111
- Volk, R.B. (2007): Studies on culture age versus exometabolite production in batch cultures of the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *J. Appl. Phycol.* 19:491-495.
- Volk, R.B. (2008): Screening of microalgae for species excreting norharmane, a manifold biologically active indol alkaloid. *Microbiol. Res.* 163:307-313.
- Vuts, J., Furlan, L., Bálintné-Csonka, É., Woodcock, C.M., Caulfield, J.C., Mayon, P., Pickett, J.A., Birkett, M.A. & Tóth, M. (2014): Development of a female attractant for the click beetle pest *Agriotes brevis*. *Pest Manag. Sci.* 70:610-614.
- Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K & Collet, Ch. (2005): Microalgae as bioreactors. Review. *Plant Cell Rep.* 24:629-641.
- Watanabe, A., Nishigaki, S. & Kinishi, C. (1951): Effect of nitrogen fixing blue-green algae on the growth of rice plant. *Nature (London)* 168:748-749.
- Watson, S.B. (1999): Outbreaks of taste/odour causing algal species: theoretical, mechanistic and applied approaches. PhD thesis. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, 36PP.
- Watson, S.B. (2003): Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity. *Phycologia* 42(4):332-350.
- Watson, S.B. (2004): Aquatic taste and odour: A primary signal of drinking-water integrity. *J. Toxicol. Env. Health Part A* 67:1779-1795.
- Watson, S.B. and Ridal, J. (2004): Periphyton: A primary source of widespread and severe taste and odour. *Water Sci. Technol.* 49:33-39.
- Weber, B., Wessels, D.C.J. & Büdel, B. (1996): Biology and ecology of cryptoendolithic cyanobacteria of a sandstone outcrop in the Northern province, South Africa. *Algol. Stud.* 83:565-579.
- Weiss, D. & Ori, N. (2007): Mechanisms of cross-talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol.* 144:1240-1246.

- Welch, A.M. (1962): Preliminary survey of fungistatic properties of marine algae. *J.Bact.* 83:97-99.
- Weller, R., Walsh Weller, J. & Ward, D.M. (1991): 16S rRNA sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Appl.Environ.Microbiol.* 57:1146-1151.
- Wendel, T. and Jüttner, F. (1996): Lipoxygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms. *Phytochemistry* 41:1445-1449.
- Westerhuizen, A.J. van der & Eloff, J.N. (1983): Effect of culture age and pH of culture medium on the growth and toxicity of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Z.Pflanzenphysiol.* 110:157-163.
- Whitton, B.A. (2000): Soils and rice-fields. In: Whitton, B.A. & Potts, M. (Eds.): *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, pp. 233-255.
- Wiedeman, V.E., Walne, P.L. & Trainor, F.R. (1964): A new technique for obtaining axenic cultures of algae. *Can.J.Bot.* 42:958-959.
- Wiedner, C., Wissner, P., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A. & Mur, L.R. (2003): Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Appl.Environ.Microbiol.* 69:1475-1481.
- Wilmotte, A. (1994): Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant, D.A. (Ed.): *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-25.
- Wnorowski, A.U. (1992): Tastes and odours in the aquatic environment – a review. *Water S.A. Pretoria* 18:203-214.
- Woodward, A.W. & Bartel, B. (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95:707-735.
- Wynn, J., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J. & Apt. K. (2010): Production of single cell oils from dinoflagellates. In: Cohen, Z. & Ratledge, C. (Eds.) *Single cell oils. Microbial and algal oils*. AOCS Press, Urbana, 115-129.
- Wu, J.T. and Jüttner, F. (1988): Differential partitioning of geosmin and 2-methylisoborneol between cellular constituents in *Oscillatoria tenuis*. *Arch.Microbiol.* 150:580-583.
- Yadav, S., Sinha, R.P., Tyagi, M.B. & Kumar, A. (2011): Cyanobacterial secondary metabolites. *International J Pharma & Bio Sciences* 2(2):144-167.
- Yamaguchi, S. (2008): Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:225-251.
- Yokota, T., Kim, S.K., Fukui, Y., Takahashi, N., Takeuchi, Y. & Takematsu, T. (1987): Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon reticulatum*: configuration at C-24. *Phytochem.* 26:503-506.
- Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K. & Hirata, K. (2004): Mitigation of osmotic and salt stress by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 167:1335-1341.
- Zaharah, S.S., Singh, Z., Symons, G.M. & Reid, J.B. (2012): Role of brassinosteroids, ethylene, abscisic acid, and indole-3-acetic acid in mango fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 31:363-372.

- Zahradnicková, H., Marsálek, B. & Polisenská, M. (1991): High-performance thin-layer chromatographic and high-performance liquid chromatographic determination of abscisic acid produced by cyanobacteria. *J.Chromatography* 555:239-245.
- Zhao, Z.R., Wu, Z.L., Huang, G.Q. & Li, G.R. (1992): An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. *J. Plant Grow. Regul.* 11:209-213.
- Zimmerman, W.J. (1992): Microalgal biotechnology and applications in agriculture. In: Metting, F.B.Jr. (Edit): *Soil Microbial Ecology*, Marcel Dekker, Inc. New York, USA, pp. 457-479.

dc_881_14

MELLÉKLETEK

M2.1. táblázat: Talajalgák izolálásához és laboratóriumi tenyésztéséhez felhasznált tápoldatok összetétele

Módosított Bristol-tápoldat (Bold 1949)

1. Törzsoldat	10 cm³ L⁻¹
	250 cm ³ deszt. vízben
NaNO ₃	6,25 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,625 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,875 g
K ₂ HPO ₄	1,875 g
KH ₂ PO ₄	4,375 g
NaCl	0,625 g
2. Törzsoldat	1 cm³ L⁻¹
	100 cm ³ deszt. vízben
Na ₂ -EDTA (Selecton B)	5 g
KOH	3,1 g
3. Törzsoldat	1 cm³ L⁻¹
	100 cm ³ L ⁻¹ deszt. vízben
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,498 g
H ₂ SO ₄ cc.	0,1 cm ³
4. Törzsoldat	1 cm³ L⁻¹
	100 cm ³ deszt. vízben
H ₃ BO ₃	1,142 g
5. Törzsoldat	1 cm³ L⁻¹
	100 cm ³ deszt. vízben
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,882 g
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0,144 g
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,242 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,157 g
Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	0,049 g

M2.1. táblázat: Talajalgák izolálásához és laboratóriumi tenyésztéséhez felhasznált tápoldatok összetétele (folytatás).

Zehnder-8 tápoldat (Staub 1961)

1. Törzsoldat	3 cm³ L⁻¹
	300 cm ³ deszt.vízben
NaNO ₃	46,7 g
Ca(NO ₃) ₂	5,9 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,5 g
2. Törzsoldat	1 cm³ L⁻¹
	300 cm ³ deszt.vízben
K ₂ HPO ₄	9,3 g
Na ₂ CO ₃	6,3 g
3. Törzsoldat	10 cm³ L⁻¹
A) 1,3515 g FeCl ₃ * 6H ₂ O + 1,5 cm ³ cc.HCl + 150 cm ³ deszt.víz	
B) 2,1915 g Na ₂ -EDTA (Selecton B) + 150 cm ³ deszt.víz	
5cm ³ A + 5cm ³ B + 490 cm ³ deszt.víz	
4. Mikroelem-oldat	0,08 cm³ L⁻¹
	500 cm ³ deszt.vízben
Na ₂ SiO ₃ * 9H ₂ O	0,025 g
H ₃ BO ₃	1,550 g
MnCl ₂ * 4H ₂ O	1,115 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	0,044 g
KBr	0,0595 g
KI	0,0415 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,1435 g
Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	0,073 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,0625 g
Al ₂ (SO ₄) ₃ * 18H ₂ O	0,237 g
LiCl * H ₂ O	0,025 g

M2.1. táblázat: Talajalgák izolálásához és laboratóriumi tenyésztéséhez felhasznált tápoldatok összetétele (folytatás).

Tamiya-tápoldat (Kuznetsov & Vladimirova 1964)

	1 L forralt csapvízben
KNO ₃	5,0 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,5 g
KH ₂ PO ₄	1,25 g
Na ₂ -EDTA	0,037 g
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,009 g
Zehnder-8 mikroelem-oldat (módosítás)	0,08cm ³

BG-11/-N tápoldat (Rippka et al. 1979)

1-8. Törzsoldatok	10 cm³ L⁻¹
	100 cm ³ deszt.vízben
1)NaCl	102,1 g
2) K ₂ HPO ₄	0,4 g
3) MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,75 g
4) CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,36 g
5)C ₆ H ₈ O ₇ * H ₂ O	0,06 g
6) C ₆ H ₅ O ₇ Fe * H ₂ O	0,06 g
7)Na ₂ -EDTA	0,01 g
8)Na ₂ CO ₃ * 10H ₂ O	0,2 g
9. Mikroelem-oldat	1 cm³ L⁻¹
	1000 cm ³ deszt.vízben
H ₃ BO ₃	0,061 g
MnSO ₄ * H ₂ O	0,169 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,287 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,0025 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	0,0125 g

M3.1. táblázat: Mungóbab bioteszttel vizsgált három cianobaktérium és hét zöldalga törzs taxonómiai helye, eredete és produktivitásának jellemzői (T = talaj).

Osztály/rend	Taxon	MACC	Eredet	Tápoldat	Biomassza (g L ⁻¹)
Oscillatoriales	<i>Phormidium animale</i>	MACC-302	román, T	Zehnder-8	1,68 (9 nap)
Nostocales	<i>Calothrix</i> sp.	MACC-403	brazil, T	Tamiya	2,16 (16 nap)
Nostocales	<i>Calothrix</i> sp.	MACC-405	brazil, T	BG-11	1,50 (16 nap)
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i> sp.	MACC-460	brazil, T	Tamiya	1,66 (12 nap)
Chlorophyceae	<i>Tetracystis</i> sp.	MACC-479	brazil, T	Tamiya	1,82 (12 nap)
Chlorophyceae	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	MACC-493	brazil, T	Tamiya	3,40 (12 nap)
Trebouxiophyceae	<i>Chlorella</i> sp.	MACC-519	brazil, T	Tamiya	2,84 (12 nap)
Chlorophyceae	<i>Coenochloris</i> sp.	MACC-534	brazil, T	Tamiya	2,70 (13 nap)
Chlorophyceae	<i>Chlorosarcina</i> sp.	MACC-560	brazil, T	Tamiya	3,52 (14 nap)
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i> sp.	MACC-693	brazil, T	Tamiya	2,82 (18 nap)

M3.2. táblázat: A növényi hormon összetétel vizsgálatához használt 24 eukarióta algtörzs taxonómiai jellemzése, eredete és 4 nap alatt termelt biomasszája (SzA = szárazanyag, mg L⁻¹) Bristol tápoldatban. (MACC = Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény)

Osztály	Taxon	MACC	Eredet	SzA mg L ⁻¹
Chlorophyceae	<i>Stigeoclonium nanum</i> (Dillwyn) Kütz.	790	Csehország, talaj	635
	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> Deason et Bold	712	Csehország, talaj	320
	<i>Gyoeffiana humicola</i> Kol et Chodat	334	Brazília, talaj	239
	<i>Monoraphidium contortum</i> (Thur.) Komárková-Legnerová	700	Csehország, talaj	470
	<i>Nautococcus mamillatus</i> Korschikov	716	Csehország, talaj	277
	<i>Poloidion didymos</i> Pascher	545	Brazília, talaj	427
	<i>Protosiphon botryoides</i> G.A. Klebs	32	Csehország, talaj	461
	^a <i>Acutodesmus acuminatus</i> (Lagerh.) Tsarenko	41	Csehország, talaj	630
	^b <i>Acutodesmus incrassatulus</i> (Bohlin) Tsarenko	730	Brazília, talaj	430
	^c <i>Desmodesmus armatus</i> (R. Chodat) E. Hegewald	59	Csehország, talaj	657
	<i>Scotiellopsis terrestris</i> (Reisigl) Punčoch. et Kalina	44	Csehország, talaj	385
	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (Korshikov) G. Nygaard, J. Komárek, Kristiansen et Skulberg	317	Csehország, talaj	1020
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> P.A. Dang.	772	Brazília, talaj	559
	<i>Desmococcus olivaceus</i> C. Agardh	219	Brazília, talaj	765
	<i>Coelastrum microporum</i> Nägeli	51	Csehország, talaj	525
	<i>Spongiochloris excentrica</i> Starr	504	Csehország, talaj	884
	<i>Coccomyxa</i> sp.	535	Brazília, talaj	429
Trebouxiophyceae	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> Chick	3	Oroszország, talaj	559
	<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck	755	Csehország, talaj	681
	<i>Chlorella minutissima</i> Fott et Nováková	361	Brazília, talaj	594
	<i>Myrmecia bisecta</i> Reisigl	594	Csehország, talaj	284
	<i>Stichococcus bacillaris</i> Nägeli	505	Csehország, talaj	376
Ulvophyceae	<i>Ulothrix</i> sp.	777	Brazília, talaj	413
Charophyceae	<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva, K.R. Mattox et W.H. Blackw.	692	Ukrajna, talaj	443

^aKorábban *Scenedesmus acuminatus*

^bKorábban *Scenedesmus incrassatulus*

^cKorábban *Scenedesmus armatus*

M3.3. táblázat: A 24 eukarióta algtörzs biomasszájának citokinin összetétele 4 napos tenyésztés után.* Az összes citokinin tartalmat nmol g⁻¹ szárazanyagra (SzA) számítottuk át.

Algtörzs	<i>Stigeoclonium</i> <i>nanum</i>	<i>Chlorococcum</i> <i>ellipsoideum</i>	<i>Gyoefferia</i> <i>humicola</i>	<i>Monoraphidium</i> <i>contortum</i>	<i>Nautococcus</i> <i>mamillatus</i>	<i>Poloidion</i> <i>didymos</i>	<i>Protosiphon</i> <i>botryoides</i>	<i>Acutodesmus</i> <i>acuminatus</i>
MACC	790	712	334	700	716	545	32	41
Citokinin	pmol g ⁻¹ SzA							
<i>tZ</i>	92,4±3,5	-	-	-	-	4,1±0,8	-	8,8±2,7
<i>tZR</i>	25,4±1,1	2,1±0,0	4,9±0,0	5,3±0,0	5,1±1,5	4,9±0,0	0,7±0,0	0,2±0,0
<i>tZOG</i>	132,4±15,2	71,0±20,0	121,9±18,9	57,3±2,3	72,8±23,4	-	-	47,2±8,1
<i>tZROG</i>	3,0±0,4	-	1,5±0,0	0,3±0,0	4,1±0,2	0,8±0,2	-	-
<i>tZ9G</i>	-	-	-	-	-	1,7±0,4	31,3±5,9	-
<i>tZRMP</i>	1045,7±347,0	675,9±194,5	284,9±110,6	10,5±3,64	31,3±6,3	13,8±3,9	1,8±0,5	14,2±4,7
<i>cZ</i>	566,5±29,4	520,7±64,8	843,8±321,1	86,8±8,8	967,7±98,6	1529,7±216,3	29,1±0,0	427,3±24,2
<i>cZR</i>	245,9±23,7	304,8±0,7	850,2±59,3	290,3±24,4	52,8±6,3	1091,0±43,0	-	41,6±8,0
<i>cZOG</i>	39,6±5,7	54,5±9,7	68,78±10,6	11,4±1,1	205,5±52,8	61,1±2,43	9,5±2,1	23,7±4,6
<i>cZROG</i>	28,5±5,0	64,8±13,8	113,6±12,8	28,6±6,7	508,7±60,5	133,6±1,9	-	9,6±2,8
<i>cZRMP</i>	8967,2±514,8	1511,0±8,3	2718,1±75,5	382,6±57,1	2223,4±482,9	641,7±38,7	41,8±4,6	882,7±20,1
<i>DHZ</i>	100,4±1,5	3,5±0,7	4,5±1,9	0,6±0,0	3,1±0,5	7,1±0,8	-	1,0±0,2
<i>DHZR</i>	210,9±11,3	6,2±1,4	19,3±0,8	28,6±0,9	-	32,5±1,9	-	1,3±0,4
<i>DHZOG</i>	27,0±0,9	-	-	0,9±0,0	-	-	1,6±0,2	-
<i>DHZROG</i>	57,8±4,4	-	6,4±1,1	8,5±0,3	6,0±2,4	2,4±0,8	-	-
<i>DHZRMP</i>	412,2±128,9	-	-	-	19,8±2,7	-	-	-
<i>iP</i>	161,1±11,1	206,9±6,9	178,1±5,3	6,2±0,2	27,2±0,7	158,7±9,7	213,4±13,6	10,2±0,1
<i>iPR</i>	605,4±0,0	766,9±53,1	721,9±71,7	123,3±14,4	-	1232,2±2,4	103,6±25,0	16,0±0,6
<i>iPRMP</i>	11376,3±558,9	578,6±70,3	452,1±99,6	142,7±32,3	965,1±275,2	154,8±8,6	895,4±63,6	89,2±29,7
Összes*	21,4	4,8	6,4	1,2	5,1	5,1	1,3	1,6

M3.3. táblázat: A 24 eukarióta alga törzs biomasszájának citokinin összetétele 4 napos tenyésztés után.* Az összes citokinin tartalmat nmol g⁻¹ szárazanyagra (SzA) számítottuk át (folytatás).

Alga törzs	<i>Acutodesmus incrassatulus</i>	<i>Desmodesmus armatus</i>	<i>Scotiellopsis terrestris</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Desmococcus olivaceus</i>	<i>Coelastrum microporum</i>	<i>Spongiocloris excentrica</i>
MACC	730	59	44	317	772	219	51	504
Citokinin	pmol g ⁻¹ SzA							
<i>tZ</i>	-	-	-	-	19,1±1,6	-	-	-
<i>tZR</i>	1,6±0,0	1,2±0,0	1,5±0,0	1,4±0,1	-	-	1,3±0,0	3,0±0,0
<i>tZOG</i>	-	-	-	-	32,2±4,4	-	-	15,5±2,0
<i>tZROG</i>	-	-	-	-	-	-	-	1,0±0,0
<i>tZ9G</i>	-	1,4±0,1	-	-	13,5±0,5	-	2,4±0,2	11,3±3,0
<i>tZRMP</i>	6,6±0,7	224,4±52,1	38,9±4,3	6,0±0,1	57,6±2,9	11,0±3,9	46,1±15,7	8,2±0,8
<i>cZ</i>	748,2±30,5	949,5±68,1	476,0±64,5	315,8±10,9	4328,9±16,7	2145,1±331,7	184,4±11,5	1306,0±260,7
<i>cZR</i>	411,1±25,0	363,6±16,4	319,4±42,8	146,5±3,8	-	29,8±3,7	449,4±9,8	317,1±13,6
<i>cZOG</i>	49,1±2,9	50,6±4,4	50,0±8,5	21,5±1,5	150,6±15,6	79,5±12,5	13,0±0,2	36,6±0,1
<i>cZROG</i>	44,1±8,4	81,4±6,6	30,4±9,8	6,3±0,4	28,4±5,4	2,2±0,9	55,7±15,9	121,6±6,1
<i>cZRMP</i>	1953,2±33,0	4735,3±466,9	7848,7±354,3	239,3±24,4	3655,7±187,1	1249,0±480,7	6224,3±498,3	2018,0±106,9
<i>DHZ</i>	3,2±0,0	4,8±0,0	3,0±0,9	6,4±0,1	19,5±0,6	6,6±1,0	0,7±0,2	3,1±0,1
<i>DHZR</i>	11,4±0,2	11,1±0,3	7,5±0,0	22,4±0,4	0,6±0,2	0,9±0,0	13,2±1,7	8,1±1,4
<i>DHZOG</i>	-	-	-	2,8±0,4	-	-	-	-
<i>DHZROG</i>	-	1,9±0,6	-	4,3±0,8	-	-	1,9±0,2	-
<i>DHZRMP</i>	23,4±1,1	-	100,0±4,3	-	31,4±4,6	-	40,9±11,9	20,0±2,7
<i>iP</i>	57,7±0,9	9,9±0,0	28,7±0,6	100,8±1,9	336,7±8,1	10,2±0,3	7,4±0,7	56,9±1,3
<i>iPR</i>	455,9±6,6	88,1±4,5	56,8±0,9	439,3±23,5	-	-	136,7±0,4	249,9±4,6
<i>iPRMP</i>	876,3±18,9	-	1017,2±30,6	294,5±46,3	541,9±24,4	-	412,4±32,8	902,4±1,2
Összes*	4,6	6,5	10,0	1,6	9,2	3,5	7,6	5,1

M3.3. táblázat: A 24 eukarióta alga törzs biomasszájának citokinin összetétele 4 napos tenyésztés után.* Az összes citokinin tartalmat nmol g^{-1} szárazanyagra (SzA) számítottuk át (folytatás).

Alga törzs	<i>Coccomyxa</i> sp.	<i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i>	<i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>	<i>Chlorella</i> <i>minutissima</i>	<i>Myrmecia bisecta</i>	<i>Stichococcus</i> <i>bacillaris</i>	<i>Ulothrix</i> sp.	<i>Klebsormidium</i> <i>flaccidum</i>
MACC	535	3	755	361	594	505	777	692
Citokinin	pmol g^{-1} SzA							
<i>tZ</i>	18,9±4,0	-	-	-	-	-	-	-
<i>tZR</i>	3,1±0,2	2,7±0,0	2,9±0,1	1,3±0,0	1,1±0,0	-	1,0±0,0	-
<i>tZOG</i>	44,0±10,0	40,6±7,4	11,9±3,4	58,7±19,0	161,1±25,3	27,7±9,17	15,1±6,4	160,0±38,7
<i>tZROG</i>	2,5±0,8	0,8±0,2	0,1±0,0	1,6±0,0	-	0,7±0,2	-	-
<i>tZ9G</i>	-	59,0±1,2	-	30,2±1,6	-	-	17,2±7,2	-
<i>tZRMP</i>	3,3±1,1	22,9±3,1	69,1±26,0	18,8±1,0	51,9±15,4	5,1±0,5	10,0±0,8	19,4±7,1
<i>cZ</i>	578,3±46,9	505,4±92,8	184,5±46,8	5339,1±316,5	49,8±5,6	16,5±3,0	187,4±36,2	96,8±1,9
<i>cZR</i>	501,4±23,7	708,7±31,6	625,1±26,9	-	-	-	176,2±0,0	-
<i>cZOG</i>	41,4±0,6	37,7±5,0	13,5±0,4	351,6±30,2	18,6±2,5	4,7±1,4	14,4±0,0	-
<i>cZROG</i>	55,0±2,3	120,8±13,6	61,4±2,9	312,1±21,9	-	-	16,2±2,3	-
<i>cZRMP</i>	363,9±4,2	4433,6±845,4	1485,3±350,5	914,9±32,5	4722,1±1652,6	-	1665,6±95,1	-
<i>DHZ</i>	1,9±0,4	1,0±0,2	1,1±0,3	8,5±0,4	-	-	-	-
<i>DHZR</i>	15,6±2,9	19,4±0,4	73,8±5,6	-	2,1±0,4	1,2±0,2	4,1±0,5	3,2±0,0
<i>DHZOG</i>	-	-	-	3,5±0,4	-	-	-	-
<i>DHZROG</i>	2,5±0,2	3,5±0,6	10,6±0,6	3,8±0,7	-	-	-	-
<i>DHZRMP</i>	-	17,5±0,8	22,6±1,0	4,9±0,2	-	-	8,2±3,3	-
<i>iP</i>	36,5±0,4	5,4±0,4	2,3±0,1	5,3±0,3	11,2±0,7	27,2±0,9	13,3±0,5	7,1±0,7
<i>iPR</i>	466,5±6,9	78,6±1,9	420,6±24,3	-	-	27,4±0,0	129,7±2,8	-
<i>iPRMP</i>	225,8±79,8	263,7±32,8	339,3±3,6	53,5±2,1	331,6±77,2	136,5±17,7	874,9±52,1	-
Összes*	2,4	6,3	3,3	7,1	5,4	0,3	3,1	0,3

M3.4. táblázat: A 24 eukarióta alga törzs biomasszájának gibberellin összetétele 4 napos tenyésztés után. Az eredmények 3 minta átlagértékét és a szórást mutatják (NM = méréshatár alatti érték, ^a = biológiailag aktív, ^b = végtermék).

Alga törzs	<i>Stigeoclonium nanum</i>	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	<i>Gyoefferffiana humicola</i>	<i>Monoraphidium contortum</i>	<i>Nautococcus mamillatus</i>	<i>Poloidon didymos</i>	<i>Protosiphon botryoides</i>	<i>Acutodesmus acuminatus</i>
MACC	790	712	334	700	716	545	32	41
Gibberellin	pg mg ⁻¹ SzA							
^a GA ₁	2,4±0,2	4,6±0,8	4,5±0,2	2,8±0,2	4,7±0,2	3,0±0,1	4,8±0,4	5,2±0,1
^a GA ₃	0,3±0,0	1,9±0,1	1,9±0,0	1,4±0,2	0,7±0,0	1,7±0,2	3,9±0,2	0,2±0,0
^a GA ₄	5,9±0,0	9,6±0,1	15,2±0,5	7,6±0,2	11,4±0,5	7,4±0,3	10,2±0,2	6,6±0,2
^a GA ₅	7,6±0,3	23,1±0,8	34,4±1,9	14,5±0,5	29,7±0,8	15,5±0,5	13,2±0,5	10,3±0,1
^a GA ₆	116,1±4,0	271,2±18,1	383,3±5,5	162,0±7,0	295,7±11,8	150,5±3,4	180,2±2,6	154,6±3,8
^a GA ₇	1,1±0,1	1,3±0,0	3,4±0,1	1,1±0,0	1,8±0,1	2,3±0,5	0,9±0,0	0,9±0,0
GA ₈	11,5±1,5	25,5±2,3	5,7±0,2	11,7±0,3	20,8±1,2	4,0±0,6	3,0±0,1	5,3±0,2
GA ₉	5,6±0,2	21,4±1,5	86,3±2,0	32,7±0,8	65,7±5,0	41,3±1,7	5,8±0,7	4,2±0,1
GA ₁₂	163,4±19,5	< NM	< NM	194,2±26,2	229,0±12,2	159,9±7,4	77,2±4,1	89,2±5,3
GA _{12ald}	< NM	< NM	494,4±16,5	< NM	403,3±19,4	106,7±2,5	86,8±7,6	129,9±14,8
^b GA ₁₃	67,3±0,5	348,7±5,9	62,5±2,8	156,4±1,8	263,1±12,3	53,7±2,5	20,3±0,9	14,9±0,8
GA ₁₅	97,8±1,2	218,1±7,9	745,3±13,6	91,7±3,5	146,8±4,6	98,4±2,4	54,2±3,4	62,8±3,5
GA ₁₉	0,7±0,0	1,3±0,1	1,4±0,1	0,8±0,1	1,7±0,1	1,0±0,0	2,8±0,1	1,4±0,2
GA ₂₀	1,1±0,0	2,0±0,1	7,4±0,3	1,3±0,1	4,7±0,2	1,7±0,3	1,1±0,0	0,9±0,2
GA ₂₄	3,6±0,3	6,8±0,7	17,9±1,8	4,7±0,3	7,3±0,8	4,5±0,6	4,0±0,4	5,4±0,6
GA ₂₉	5,2±0,2	5,9±0,3	17,9±0,7	11,6±1,0	2,9±0,2	3,7±0,4	3,0±0,1	4,9±0,8
GA ₃₄	1,3±0,1	1,2±0,1	2,7±0,2	1,4±0,2	3,1±0,5	0,9±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1
GA ₄₄	14,3±0,9	53,0±2,7	77,7±8,3	43,0±0,5	81,9±3,9	45,2±1,1	44,4±2,8	16,8±0,3
^b GA ₅₁	60,2±5,5	91,7±3,6	313,7±8,1	46,0±2,5	609,8±5,6	157,2±4,3	244,7±14,5	23,1±0,5
GA ₅₃	36,9±1,7	138,5±1,8	16,6±1,5	95,9±2,0	107,4±1,2	91,5±1,3	9,0±1,0	4,6±0,7

M3.4. táblázat: A 24 eukarióta alga törzs biomasszájának gibberellin összetétele 4 napos tenyésztés után. Az eredmények 3 minta átlagértékét és a szórást mutatják (NM = méréshatár alatti érték, ^a = biológiailag aktív, ^b = végtermék) (folytatás).

Alga törzs	<i>Acutodesmus</i> <i>incrassatulus</i>	<i>Desmodesmus</i> <i>armatus</i>	<i>Scotiellopsis</i> <i>terrestris</i>	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i>	<i>Raphidocelis</i> <i>subcapitata</i>	<i>Desmococcus</i> <i>olivaceus</i>	<i>Coelastrum</i> <i>microporum</i>	<i>Spongiochloris</i> <i>excentrica</i>
MACC	730	59	44	772	317	219	51	504
Gibberellin	pg mg ⁻¹ SzA							
^a GA ₁	12,6±0,7	2,0±0,2	14,4±0,5	7,6±0,2	6,5±0,3	2,8±0,1	4,4±0,3	2,5±0,2
^a GA ₃	2,0±0,1	1,6±0,0	1,8±0,0	1,1±0,0	0,6±0,0	0,8±0,0	2,7±0,2	0,3±0,0
^a GA ₄	13,8±0,1	8,9±0,2	10,6±0,2	3,4±0,0	5,8±0,1	5,7±0,2	9,1±0,2	5,8±0,1
^a GA ₅	24,1±1,7	5,7±0,1	10,8±0,4	9,2±0,2	6,6±0,1	4,7±0,3	8,2±0,1	4,3±0,2
^a GA ₆	189,9±5,2	135,3±8,3	205,6±14,8	145,9±7,2	87,1±2,5	124,2±4,5	169,9±11,2	94,3±3,3
^a GA ₇	1,7±0,1	1,8±0,0	2,7±0,1	1,9±0,0	0,9±0,0	1,6±0,0	1,2±0,1	1,1±0,1
GA ₈	12,1±1,0	1,6±0,4	10,7±0,1	15,4±1,1	3,4±0,5	6,0±0,7	2,6±0,7	3,3±0,5
GA ₉	14,1±2,2	4,3±0,3	47,2±1,8	13,0±2,2	33,8±1,2	4,4±0,2	42,8±0,4	14,6±0,7
GA ₁₂	117,0±10,5	80,1±5,3	312,6±28,3	118,9±13,1	88,8±4,8	177,0±15,1	170,3±14,8	93,8±2,7
GA _{12ald}	148,1±16,2	93,0±4,4	407,0±50,0	< NM	< NM	82,3±5,4	119,2±3,8	86,3±1,2
^b GA ₁₃	210,1±8,7	6,3±0,2	31,9±2,1	66,5±4,1	12,4±0,6	18,0±0,5	44,6±3,0	12,1±0,2
GA ₁₅	129,6±3,3	158,5±2,1	3452,9±178,1	115,8±5,8	32,6±1,6	32,5±1,4	473,8±24,6	14,7±0,2
GA ₁₉	2,3±0,1	0,5±0,0	1,1±0,3	0,9±0,1	0,3±0,0	1,0±0,1	3,4±0,2	0,9±0,1
GA ₂₀	1,4±0,0	1,8±0,1	1,6±0,3	1,1±0,0	4,5±0,2	1,5±0,1	4,8±0,1	0,6±0,0
GA ₂₄	4,9±0,4	4,3±0,2	5,2±0,4	3,8±0,3	2,5±0,3	8,4±0,6	14,2±1,5	4,4±0,2
GA ₂₉	2,0±0,1	2,1±0,0	12,8±1,2	1,7±0,1	1,4±0,0	2,1±0,4	6,2±1,4	1,6±0,2
GA ₃₄	1,2±0,0	1,2±0,2	2,1±0,1	1,2±0,2	0,5±0,0	0,7±0,1	0,7±0,0	1,8±0,1
GA ₄₄	60,6±1,0	23,8±0,8	24,3±3,9	24,3±0,9	21,0±0,2	18,7±0,9	19,5±2,2	41,9±0,8
^b GA ₅₁	91,7±2,7	207,2±11,1	164,8±9,4	142,3±5,6	30,3±1,3	110,1±3,8	169,1±5,6	29,2±1,4
GA ₅₃	63,4±2,2	4,4±0,6	26,4±1,7	46,6±1,6	2,8±0,3	3,6±0,3	5,2±0,4	1,5±0,1

M3.4. táblázat: A 24 eukarióta algtörzs biomasszájának gibberellin összetétele 4 napos tenyésztés után. Az eredmények 3 minta átlagértékét és a szórást mutatják (NM = méréshatár alatti érték, ^a = biológiailag aktív, ^b = végtermék) (folytatás).

Algtörzs	<i>Coccomyxa</i> sp.	<i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella</i> <i>minutissima</i>	<i>Myrmecia</i> <i>bisecta</i>	<i>Stichococcus</i> <i>bacillaris</i>	<i>Ulothrix</i> sp.	<i>Klebsormidium</i> <i>flaccidum</i>
MACC	535	3	755	361	594	505	777	692
Gibberellin	pg mg ⁻¹ SzA							
^a GA ₁	2,9±0,2	7,4±0,3	2,1±0,0	7,3±0,5	21,2±1,3	3,1±0,1	6,9±0,3	16,2±0,5
^a GA ₃	1,2±0,1	2,4±0,1	0,6±0,0	0,6±0,0	4,1±0,1	1,7±0,0	0,5±0,0	2,5±0,0
^a GA ₄	11,3±0,3	9,2±0,3	6,9±0,2	8,5±0,1	20,2±0,2	11,4±0,6	12,6±0,4	6,2±0,0
^a GA ₅	10,0±0,2	5,2±0,1	4,7±0,2	10,5±0,1	18,3±0,3	32,0±0,9	26,2±0,9	10,5±0,5
^a GA ₆	198,1±1,9	141,7±9,6	114,9±2,3	114,5±3,4	321,6±8,1	218,8±10,0	166,6±17,6	163,4±4,4
^a GA ₇	2,4±0,1	1,3±0,0	0,6±0,0	1,0±0,0	2,1±0,1	2,3±0,2	1,1±0,2	1,6±0,0
GA ₈	5,8±0,4	8,2±0,7	9,4±0,9	5,2±0,9	5,3±0,3	7,7±0,2	20,5±1,6	9,4±0,7
GA ₉	12,4±0,8	31,5±0,8	10,0±0,2	11,1±0,5	34,7±1,5	10,7±3,2	58,0±7,9	7,5±0,3
GA ₁₂	242,5±25,1	70,3±4,9	128,9±7,4	275,7±13,5	443,5±27,4	260,3±29,6	< NM	79,9±4,1
GA _{12ald}	221,2±17,1	79,1±10,2	238,6±33,8	< NM	479,5±9,5	415,5±16,9	< NM	263,0±8,6
^b GA ₁₃	15,8±0,6	12,3±0,2	39,1±1,1	12,6±0,3	28,8±0,2	11,4±0,8	58,9±3,2	35,2±2,2
GA ₁₅	226,9±14,8	114,4±9,4	42,8±2,2	117,3±1,5	246,8±6,6	132,6±8,2	119,4±3,8	61,2±3,7
GA ₁₉	0,8±0,0	1,5±0,2	0,6±0,3	0,6±0,0	5,8±0,5	0,9±0,0	1,1±0,1	1,00±0,1
GA ₂₀	1,2±0,1	3,0±0,0	1,9±0,1	4,4±0,2	7,4±0,6	15,6±1,2	1,6±0,0	3,0±0,1
GA ₂₄	5,4±0,3	13,7±0,7	3,1±1,7	9,7±0,5	22,3±2,7	11,7±0,4	6,2±0,4	5,1±0,5
GA ₂₉	1,5±0,1	3,7±0,2	6,4±0,4	3,7±0,2	6,6±0,3	3,8±0,2	4,9±0,4	7,8±0,3
GA ₃₄	0,9±0,1	1,5±0,1	1,9±0,3	0,5±0,1	3,2±0,1	1,2±0,0	1,0±0,1	1,2±0,1
GA ₄₄	28,1±1,0	33,4±3,4	3,6±0,1	33,8±1,2	49,0±0,6	41,3±0,7	14,5±1,9	38,5±1,7
^b GA ₅₁	168,4±6,3	57,1±1,6	129,6±5,8	399,0±2,3	244,0±6,5	182,3±6,2	234,1±9,1	26,3±4,7
GA ₅₃	5,8±0,1	10,4±0,8	69,6±1,7	19,8±0,7	85,4±2,7	15,2±1,0	66,3±1,0	46,2±3,1

M3.5. táblázat: A fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények (folyamatos sötét + glükóz) között 48 órán át szaporított MACC-360 *Chlorella minutissima* törzs biomasszájának szárazanyagában (SzA) mért IAA, indol prekursor és metabolit tartalom. Az eredmények átlagértékek (NM = méréshatár alatti érték).

Kezelés	Idő	10 ó	15 ó	24 ó	34 ó	48 ó
	Auxin	pg mg ⁻¹ SzA				
Fény : sötét	IAA	25,0	34,0	34,4	67,8	24,1
	ANT	106,0	82,6	202,3	711,0	175,7
	TRP	580,7	1573,6	2590,1	2894,9	2969,7
	IAM	73,1	290,9	614,6	713,0	1501,1
	TRA	4,9	8,0	7,4	20,2	17,2
	oxIAA	58,9	86,4	136,6	203,6	48,3
	IAA _{sp}	< NM	< NM	< NM	< NM	< NM
	Összes	848,6	2075,5	3585,4	4610,5	4736,1
Folyamatos sötét	IAA	45,2	48,1	26,0	62,8	55,2
	ANT	51,5	108,3	187,8	244,0	282,3
	TRP	1201,8	410,5	446,0	210,8	957,9
	IAM	110,2	253,7	170,2	244,1	308,4
	TRA	9,2	10,7	2,1	5,8	7,7
	oxIAA	75,2	88,3	102,4	115,7	149,1
	IAA _{sp}	< NM	< NM	< NM	< NM	< NM
	Összes	1493,1	919,6	934,5	883,2	1760,6
Folyamatos sötét + glükóz	IAA	45,8	66,6	80,5	74,7	649,4
	ANT	73,2	2377,0	880,1	1026,1	529,7
	TRP	556,3	12684,6	9655,6	14206,1	21520,4
	IAM	125,0	237,2	225,6	709,3	3974,7
	TRA	10,9	14,6	10,8	16,7	14,2
	oxIAA	79,5	56,8	63,7	81,9	112,0
	IAA _{sp}	< NM	22,5	11,9	< NM	< NM
	Összes	890,7	15459,3	10928,2	16114,8	26800,4

M3.6. táblázat: A fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények (folyamatos sötét + glükóz) között 48 órán át szaporított MACC-360 *Chlorella minutissima* törzs biomasszájának a szárazanyagában (SzA) mért citokininek. Az eredmények 2 minta átlagértékét mutatják (NM = méréshatár alatti érték).

Kezelés	Idő	10 ó	15 ó	24 ó	34 ó	48 ó
	Citokinin	pg mg ⁻¹ SzA				
Fény : sötét	<i>tZ</i>	3,7	3,0	1,1	1,4	0,7
	<i>tZR</i>	0,6	0,3	0,2	0,2	0,0
	<i>tZOG</i>	1,3	0,6	1,2	3,0	3,1
	<i>cZ</i>	15,8	13,0	29,9	116,8	89,5
	<i>cZR</i>	95,0	79,6	58,3	28,7	3,6
	<i>cZOG</i>	6,1	3,6	15,1	44,5	87,3
	<i>cZROG</i>	16,6	9,1	21,8	21,0	24,6
	<i>cZRMP</i>	62,6	227,6	224,7	412,8	557,9
	<i>iP</i>	0,4	0,3	6,7	15,6	15,0
	<i>iPR</i>	17,4	17,9	18,5	9,3	1,6
	<i>iPRMP</i>	70,0	65,5	24,3	24,3	11,5
	<i>DHZ</i>	0,7	0,3	0,2	0,4	0,4
	<i>DHZR</i>	1,3	0,8	0,7	0,6	0,1
	<i>DHZOG</i>	< NM	< NM	0,1	< NM	0,3
	<i>DHZROG</i>	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3
	Összes	291,7	421,8	403,2	678,7	795,9
Folyamatos sötét	<i>tZ</i>	3,4	2,1	0,6	0,8	1,2
	<i>tZR</i>	0,7	0,3	0,2	0,2	0,2
	<i>tZOG</i>	0,4	0,4	7,0	0,4	1,4
	<i>cZ</i>	14,9	17,6	18,9	23,4	31,4
	<i>cZR</i>	16,7	40,5	54,1	60,3	70,9
	<i>cZOG</i>	4,9	3,7	6,3	7,8	13,3
	<i>cZROG</i>	13,3	8,8	14,4	14,8	22,5
	<i>cZRMP</i>	58,7	111,0	99,7	132,8	12,7
	<i>iP</i>	0,5	0,8	1,1	1,7	3,0
	<i>iPR</i>	18,3	15,2	18,2	18,3	22,7
	<i>iPRMP</i>	49,6	53,3	56,5	41,8	51,6
	<i>DHZ</i>	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2
	<i>DHZR</i>	0,8	0,8	1,3	1,1	1,4
	<i>DHZOG</i>	< NM	0,1	< NM	< NM	< NM
	<i>DHZROG</i>	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
	Összes	183,0	255,0	278,7	303,8	232,8

M3.6. táblázat: A fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények (folyamatos sötét + glükóz) között 48 órán át szaporított MACC-360 *Chlorella minutissima* törzs biomasszájának a szárazanyagában (SzA) mért citokininnek. Az eredmények 2 minta átlagértékét mutatják (NM = méréshatár alatti érték) (folytatás).

Kezelés	Idő	10 ó	15 ó	24 ó	34 ó	48 ó
	Citokinin	pg mg ⁻¹ SzA				
Folyamatos	<i>t</i> Z	3,9	1,4	1,0	0,6	3,3
sötét +	<i>t</i> ZR	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1
glükóz	<i>t</i> ZOG	0,4	0,8	0,3	0,3	0,4
	<i>c</i> Z	19,0	15,3	29,5	33,4	53,2
	<i>c</i> ZR	101,3	38,4	9,9	4,2	4,6
	<i>c</i> ZOG	6,0	3,3	8,7	9,7	15,0
	<i>c</i> ZROG	15,4	5,6	5,8	10,1	21,3
	<i>c</i> ZRMP	46,1	55,2	70,9	398,1	310,7
	<i>i</i> P	0,5	0,8	2,7	4,8	22,4
	<i>i</i> PR	18,4	10,0	5,2	2,5	1,4
	<i>i</i> PRMP	192,5	29,4	19,4	15,7	58,0
	DHZ	0,7	0,2	0,2	0,1	0,4
	DHZR	1,2	0,5	0,3	0,2	0,1
	DHZOG	0,1	< NM	0,0	< NM	< NM
	DHZROG	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2
	Összes	406,3	161,2	154,1	479,9	491,1

M3.7. táblázat: A fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények (folyamatos sötét + glükóz) között 48 órán át szaporított MACC-360 *Chlorella minutissima* törzs biomasszájának a szárazanyagában (SzA) mért gibberellinek. Az eredmények 3 minta átlagértékét és a szórást mutatják (NM = méréshatár alatti érték).

Kezelés	Idő Gibbe- rellin	10 ó	15 ó	24 ó pg mg ⁻¹ SzA	34 ó	48 ó
Fény : sötét	GA ₁	45,8±2,2	67,7±4,4	6,2±0,7	11,8±1,0	11,7±0,7
	GA ₃	6,5±0,6	4,5±0,2	9,6±0,2	3,4±0,1	0,9±0,0
	GA ₄	53,9±1,1	25,4±1,0	16,3±1,3	14,8±0,5	8,9±0,2
	GA ₅	43,0±0,9	62,9±1,9	39,9±1,0	35,2±2,2	14,5±0,2
	GA ₆	744,6±30,7	705,5±4,6	538,0±8,3	459,1±3,4	182,1±18,2
	GA ₇	14,4±0,5	8,6±0,3	3,8±0,1	6,4±0,1	2,2±0,2
	GA ₈	45,9±1,8	38,6±3,6	28,0±1,5	23,7±0,3	7,3±0,5
	GA ₉	160,7±0,7	27,1±2,3	15,6±1,1	32,9±0,6	33,6±1,5
	GA ₁₂	691,7±0,7	328,5±18,5	247,2±22,3	1249,6±29,2	186,0±11,3
	GA _{12ald}	2058,7±129	1175,5±78,9	731,1±53,2	509,9±45,2	< NM
	GA ₁₃	643,7±3,6	825,7±13,6	694,4±8,8	634,4±23,4	210,5±3,1
	GA ₁₅	531,4±22,0	717,9±13,1	126,0±4,7	340,2±26,1	119,9±12,4
	GA ₁₉	8,2±0,7	12,7±1,7	2,1±0,1	1,9±0,1	0,8±0,0
	GA ₂₀	39,4±3,1	75,5±2,6	2,6±0,2	2,8±0,2	6,5±0,3
	GA ₂₄	17,8±2,9	19,0±0,9	10,6±0,4	35,3±1,1	4,3±0,4
	GA ₂₉	37,3±3,1	14,4±2,1	3,5±0,3	7,2±0,3	13,4±1,5
	GA ₃₄	6,3±0,3	5,3±0,5	3,2±0,2	4,0±0,3	2,1±0,1
	GA ₄₄	71,4±4,3	57,0±7,2	65,0±5,4	34,4±1,8	14,9±1,3
	GA ₅₁	762,3±14,7	234,9±2,2	291,1±14,0	383,2±10,6	125,6±8,4
	GA ₅₃	11,2±1,1	23,4±2,2	13,7±1,5	6,8±0,3	13,4±0,3
	Összes	5994,2	4430,1	2847,9	3797,0	958,6
Folyamatos sötét	GA ₁	12,1±0,4	22,4±0,6	46,0±2,4	11,7±1,1	21,4±1,1
	GA ₃	3,0±0,1	12,7±0,5	26,3±0,8	6,1±0,1	5,5±0,2
	GA ₄	34,6±0,8	30,5±2,1	42,4±1,2	31,0±2,5	52,2±1,1
	GA ₅	25,3±0,8	85,5±1,1	54,4±2,9	56,1±1,6	50,1±3,8
	GA ₆	959,8±11,0	911,0±58,9	849,4±20,8	789,6±15,1	721,0±22,5
	GA ₇	11,9±0,6	7,8±0,1	7,5±0,3	4,7±0,3	6,5±0,1
	GA ₈	66,2±2,3	62,5±1,8	45,1±5,0	19,0±2,0	25,7±2,0
	GA ₉	77,5±2,0	34,3±2,5	23,5±1,6	34,6±2,6	27,3±0,8
	GA ₁₂	1000,8±15,8	457,4±3,5	392,4±45,1	911,4±42,6	449,8±10,2
	GA _{12ald}	1018,2±25,7	812,4±23,3	577,6±11,5	803,5±58,0	1065,5±36,8
	GA ₁₃	666,0±28,8	1305,3±82,3	846,2±26,4	1177,3±49,7	378,4±27,0
	GA ₁₅	717,1±18,8	472,6±8,6	601,6±71,8	274,6±18,1	771,5±63,1

M3.7. táblázat: A fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények (folyamatos sötét + glükóz) között 48 órán át szaporított MACC-360 *Chlorella minutissima* törzs biomasszájának a szárazanyagában (SzA) mért gibberellinek. Az eredmények 3 minta átlagértékét és a szórást mutatják (NM = méréshatár alatti érték) (folytatás).

Kezelés	Idő Gibbe- rellin	10 ó	15 ó	24 ó pg mg ⁻¹ SzA	34 ó	48 ó
Folyamatos sötét (folytatás)	GA ₁₉	4,0±0,1	3,6±0,5	3,5±0,2	3,7±0,1	3,5±0,3
	GA ₂₀	26,3±2,2	32,1±3,1	12,6±1,1	17,2±0,7	10,0±0,1
	GA ₂₄	19,5±1,2	19,8±1,2	15,5±0,8	24,7±2,2	19,2±0,8
	GA ₂₉	63,9±1,5	36,2±3,5	6,6±0,6	22,0±0,7	13,2±0,8
	GA ₃₄	2,4±0,1	5,2±0,7	4,9±0,4	2,0±0,1	5,5±0,3
	GA ₄₄	73,1±4,1	109,7±6,1	47,4±3,2	42,6±2,5	78,6±3,8
	GA ₅₁	446,1±37,2	859,7±16,1	288,1±31,4	520,5±14,0	444,3±36,4
	GA ₅₃	13,3±1,6	11,7±0,2	12,7±2,0	49,9±3,0	42,4±0,4
	Összes	5241,1	5292,4	3903,7	4802,2	4191,6
Folyamatos sötét + glükóz	GA ₁	104,0±2,0	28,6±1,6	43,8±1,7	19,0±0,8	4,1±0,3
	GA ₃	6,0±0,1	15,4±0,5	3,3±0,2	6,5±0,1	1,7±0,0
	GA ₄	37,2±1,5	27,1±0,7	28,9±1,5	15,8±0,2	8,1±0,2
	GA ₅	76,6±2,4	46,6±2,5	38,4±0,9	21,1±0,2	7,5±0,1
	GA ₆	916,0±21,8	583,3±10,3	459,6±17,6	282,8±2,6	157,2±6,8
	GA ₇	15,6±0,1	8,0±0,0	3,9±0,1	2,5±0,1	1,6±0,1
	GA ₈	27,8±0,6	19,4±1,8	26,9±1,1	7,7±0,8	6,1±0,3
	GA ₉	24,7±0,5	75,4±3,9	32,0±0,6	45,8±2,0	4,5±0,0
	GA ₁₂	1116,5±38,1	524,8±10,2	< NM	404,2±10,5	151,7±3,9
	GA _{12ald}	500,4±89,6	440,2±13,8	935,3±12,5	457,0±41,0	302,5±20,9
	GA ₁₃	673,9±15,7	747,9±25,8	519,3±11,3	359,0±9,9	116,1±4,9
	GA ₁₅	621,5±20,7	369,8±2,4	333,4±11,8	147,3±3,4	85,5±1,2
	GA ₁₉	3,6±0,2	8,0±0,5	2,1±0,2	1,8±0,1	0,7±0,0
	GA ₂₀	35,8±2,8	55,5±2,8	6,2±0,0	2,2±0,2	6,5±0,3
	GA ₂₄	34,7±1,2	11,7±1,5	13,1±0,2	8,4±0,5	3,0±0,1
	GA ₂₉	22,3±1,4	8,9±0,8	7,5±0,6	9,3±0,6	2,3±0,2
	GA ₃₄	8,2±0,6	4,9±0,6	3,4±0,2	1,4±0,2	1,1±0,1
	GA ₄₄	171,1±5,2	77,8±2,5	20,7±0,8	26,9±2,5	19,2±0,7
	GA ₅₁	814,8±15,6	165,9±12,9	133,3±17,3	198,5±6,8	52,8±1,6
	GA ₅₃	36,5±3,4	7,7±0,6	6,9±0,5	18,4±1,0	4,8±0,1
	Összes	5247,2	3226,9	2618,0	2035,6	937,0

M3.8. táblázat: A fény:sötét, folyamatos sötét és heterotróf körülmények (folyamatos sötét + glükóz) között 48 órán át szaporított MACC-360 *Chlorella minutissima* törzs biomasszájának a szárazanyagában (SZA) mért brasszinoszteroidok. Az eredmények 3 minta átlagértékét és a szórást mutatják.

Kezelés	Idő Brasszino- szteroid	10 ó	15 ó	24 ó pg/g SZA	34 ó	48 ó
Fény : sötét	CT	11,2±2,7	12,3±0,2	41,4±2,4	8,6±0,6	6,0±0,1
	6-oxoCN	34,7±3,1	54,5±2,6	56,1±8,3	12,9±0,0	16,8±10,6
	6-deoxo- <i>epi</i> CS	830±170	3380±420	1580±150	730±20	350±20
	Összes	875,9	3446,8	1677,5	751,5	372,8
Folyamatos sötét	CT	6,2±1,1	85,8±4,1	20,8±3,1	20,1±2,6	8,4±1,3
	6-oxoCN	71,2±2,7	23,4±0,2	10,2±2,4	26,3±4,1	12,8±2,2
	6-deoxo- <i>epi</i> CS	2130±130	3490±300	1730±20	1360±60	970±80
	Összes	2207,4	3599,2	1761,0	1406,4	991,2
Folyamatos sötét + glükóz	CT	4,0±1,0	10,6±2,0	6,7±1,0	5,9±0,9	2,1±0,3
	6-oxoCN	12,7±1,6	28,4±5,0	3,3±1,1	10,7±0,1	9,5±3,4
	6-deoxo- <i>epi</i> CS	1380±180	860±130	490±40	310±0	170±20
	Összes	1396,7	899,0	500,0	326,6	181,6

M4.2. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen hatásos 141 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--, G----: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; S+, S++, S+++ : gyenge, közepes, erősen serkentő hatás; a jelek utáni szám a gátlási vagy serkentési zóna mm-ben kifejezve

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
MACC-6					G-16(-)				
MACC-7		G-11(-)	G-16(-)	G-20(--)	G-13(-)				
MACC-9		G-12(-)	G-13(-)	G-34(-)	G-17(-)	T-10			
MACC-10		G-35(-)		G-22(--)	G-24(-)	T-14			T-24
MACC-13					G-14(-)				
MACC-14					G-21(-)			T	
MACC-15					G-18(-)				
MACC-21		G-25(-)		G-16(-)	G-30(-)				G-20(---)
MACC-76		G-12(-)	G-17(-)		G-18(-)			T	
MACC-88						S-21(+)			
MACC-90		G-28(--)		G-25(--)	G-23(--)				T-25
MACC-116					G-17(-)				
MACC-145		G-15(-)		G-13(-)	G-15(--)				
MACC-147		G-25(-)			T-21				G-20(-)
MACC-150				G-15(---)	T-23				G-25(---)
MACC-151				G-13(-)	T-22	G-15(-)			
MACC-205	T-19	G-23(-)	T-17	T-17	T-24	T-15			G-25(---)
MACC-212					G-22(-)				
MACC-250					G-23(--)		G-15(-)		
MACC-251	T-19			G-16(--)		G-20(---)	G-14(-)		
MACC-267					G-16(-)				
MACC-302		G-16(-)						T	
MACC-304	T-13	G-20(--)	T-13	T-13	T-13	T-13	T-12		
MACC-307		G-16(-)							
MACC-309		G-10(-)							
MACC-312		G-45(-)							

M4.2. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen hatásos 141 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--, G----: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; S+, S++, S+++: gyenge, közepes, erősen serkentő hatás; a jelek utáni szám a gátlási vagy serkentési zóna mm-ben kifejezve (folytatás)

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
MACC-317		G-22(--)		G-16(-)	G-20(-)				
MACC-319		G-16(-)							
MACC-325						S-26(+)			
MACC-326					G-12(-)	G-15(--)			
MACC-327						S-17(+)			
MACC-328						S-19(+)			
MACC-329					S-12(+)				
MACC-339		G-12(-)		T-20	T-20	G-21(---)			
MACC-340						G-15(-)			
MACC-342						G-12(-)			
MACC-343				G-22(---)	T-25				
MACC-344					G-11(-)				
MACC-348					G-15(-)				
MACC-357		G-12(-)							
MACC-358		G-11(-)							
MACC-374	G-16(--)								
MACC-375	G-16(--)			G-30(-)	G-19(--)	G-12(--)	G-12(-)		
MACC-377	G-17(--)			G-20(---)	G-25(--)	G-11(-)			
MACC-382					G-13(-)				
MACC-388					G-10(-)				
MACC-399						S-15(+)			
MACC-401					G-16(--)				
MACC-403		G-14(--)		G-23(--)	G-16(--)				
MACC-405				G-20(---)	G-15(--)				
MACC-406		G-18(-)		G-22(--)	G-16(--)				
MACC-408					G-20(-)				

M4.2. táblázat: Agar géldiffúziós diotesttel növényi gombabetegségek ellen hatásos 141 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--, G----: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; S+, S++, S+++: gyenge, közepes, erősen serkentő hatás; a jelek utáni szám a gátlási vagy serkentési zóna mm-ben kifejezve (folytatás)

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
MACC-409					G-20(-)				
MACC-413						G-9(-)			
MACC-417				G-18(-)	G-15(-)				
MACC-419						G-10(-)			
MACC-422						G-13(-)			
MACC-425				G-18(-)	G-18(-)				
MACC-430		G-15(---)		G-22(-)	G-15(--)				
MACC-461						G-12(-)			
MACC-465		G-12(-)	G-18(-)	T-15	T-13	G-13(-)			
MACC-467			S-11(+)						
MACC-470	G-25(-)	G-23(-)	G-15(--)	G-11(-)	G-21(---)	G-15(-)			
MACC-471		G-35(-)							
MACC-472		G-23(-)							
MACC-474	G-11(-)					G-11(-)			
MACC-476	G-15(-)					G-11(-)			
MACC-485		G-13(-)				G-13(--)			
MACC-488						G-12(-)			
MACC-490		G-14(-)							
MACC-491	G-18(-)	G-13(-)							
MACC-492		G-12(-)							
MACC-494	G-10(-)								
MACC-499		S-23(++)							
MACC-502		G-22(-)				G-11(-)			
MACC-504		G-19(-)				G-13(-)			
MACC-506		G-22(-)							
MACC-518						G-11(-)			

M4.2. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen hatásos 141 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--, G----: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; S+, S++, S+++: gyenge, közepes, erősen serkentő hatás; a jelek utáni szám a gátlási vagy serkentési zóna mm-ben kifejezve (folytatás)

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
MACC-519		G-28(--)			G-21(-)				
MACC-520						G-14(-)			
MACC-521						G-15(-)			
MACC-523	G-12(-)			G-18(-)					
MACC-524				G-19(-)		G-10(--)			
MACC-525				G-17(-)		G-10(--)			
MACC-527				G-21(-)					
MACC-531						G-10(-)			
MACC-532						G-10(--)			
MACC-533						G-10(--)			
MACC-538						S-20(++)			
MACC-539		G-29(--)							
MACC-540	G-10(---)	G-20(-)			T-14				
MACC-545		G-28(-)		G-22(-)	G-21(-)				
MACC-546				G-16(-)					
MACC-548				G-15(-)		S-15(+)			
MACC-549				G-23(-)					
MACC-551		S-12(+)			G-12(-)	S-21(+)			
MACC-552						S-18(+)			
MACC-553		G-10(-)				S-18(+)			
MACC-556		G-15(-)							
MACC-557					G-17(-)				
MACC-560		S-13(+)		G-10(-)	G-23(-)	S-16(+)			
MACC-564		G-31(-)			S-12(+++)	S-13(+)			
MACC-566					S-14(++)	S-14(++)			
MACC-569		G-29(-)							

M4.2. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen hatásos 141 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--, G----: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; S+, S++, S+++: gyenge, közepes, erősen serkentő hatás; a jelek utáni szám a gátlási vagy serkentési zóna mm-ben kifejezve (folytatás)

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
MACC-572		S-15(+)				S-12(++)			
MACC-575		S-15(+)			G-14(-)	S-12(++)			
MACC-576					G-14(-)				
MACC-577						S-12(+)			
MACC-586						S-12(+)			
MACC-595				G-20(-)	G-15(-)				
MACC-596					G-16(---)	S-18(+)			
MACC-597					G-18(--)	G-18(--)			
MACC-604					G-10(-)				
MACC-606				G-27(-)					
MACC-612	T-9	T-9		T-9	T-9	G-10(-)			G-12(--)
MACC-631		G-23(--)				S-18(+)			
MACC-645					G-22(-)				
MACC-647	G-10(-)								
MACC-657					G-14(-)	G-18(--)			
MACC-661				G-18(-)	T-13	G-20(-)			
MACC-663		G-20(-)					G-18(--)		
MACC-677					G-16(--)				
MACC-678				G-23(-)	G-20(--)	G-20(-)			
MACC-682	G-21(---)	G-21(--)	T-13	G-21(--)	G-21(--)				
MACC-683		G-22(-)	G-22(--)						
MACC-697						S-14(+)			
MACC-711		G-12(-)							
MACC-713					G-14(-)				
MACC-714		G-24(-)							
MACC-715		G-13(-)							

M4.2. táblázat: Agar géldiffúziós bioteszttel növényi gombabetegségek ellen hatásos 141 mikroalga törzs.

T: fungicid hatás; G-, G--, G----: gyenge, közepes, erősen gátló hatás; S+, S++, S+++: gyenge, közepes, erősen serkentő hatás; a jelek utáni szám a gátlási vagy serkentési zóna mm-ben kifejezve (folytatás)

Vizsgált törzsek	Vizsgált kórokozók								
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phaeoramularia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>	<i>Plasmopara</i>	<i>Phytophthora</i>
MACC-720					G-14(-)				
MACC-722				G-26(-)					
MACC-729				G-28(-)					
MACC-771					G-20(--)				
MACC-775		G-15(-)			G-18(-)				
MACC-777					G-18(-)				
MACC-778					G-20(--)				
MACC-781					G-18(-)				
MACC-783					G-18(-)				
MACC-808				G-19(--)	G-25(--)				
MACC-821					G-22(--)				

M4.3. táblázat: A PDA táptalaj összetétele (Atlas, R.M., 2004)

Burgonyakivonat	4,0 g
Glükóz	20,0 g
Agar	18,0 g
	1000 ml desztillált víz
	pH = 5,6

M4.4. táblázat: A borsóagar táptalaj összetétele (Shattock et al., 1990)

Borsó (mag)	140,0 g
L-aszparagin	1,0 g
KH ₂ PO ₄	500,0 mg
MgSO ₄ 7 H ₂ O	10,0 g
Szacharóz	10,0 g
Tiamin	1,0 mg
Agar	1,5%
	1000 ml desztillált víz
	pH = 6,5

M5.1. táblázat: Káposzta gyökérlégység tojásrakására vizsgált 60 cianobaktérium törzs taxonómiai helye, eredete és produktivitásának jellemzői.

T: talaj, V: víz

Osztály/rend	Taxon	MACC	Eredet	Tápoldat	Biomassza (g L ⁻¹)
Nostocales	<i>Anabaena variabilis</i>	MACC-57	angol, V	Zehnder 8	1,24 (10 nap)
Nostocales	<i>Anabaena sp.</i>	MACC-68	magyar, V	BG-11	1,14 (10 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-71	német, V	Zehnder 8	1,12 (11 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix tenuis</i>	MACC-80	cseh, V	Zehnder 8	0,87 (8 nap)
Nostocales	<i>Anabaena variabilis</i>	MACC-118	magyar, V	BG-11	1,2 (10 nap)
Nostocales	<i>Anabaena flos-aquae</i>	MACC-121	angol, V	Zehnder 8	1,08 (8 nap)
Nostocales	<i>Anabaena flos-aquae</i>	MACC-122	magyar, V	BG-11	1,08 (12 nap)
Nostocales	<i>Nostoc ellipsosporum</i>	MACC-132	német, V	Zehnder 8	1,02 (8 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-139	cseh, T	Zehnder 8	0,97 (12 nap)
Nostocales	<i>Anabaena constricta</i>	MACC-146	szerb, T	BG-11 (N-free)	0,93 (12 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-149	cseh, T	Zehnder 8	0,88 (13 nap)
Nostocales	<i>Nostoc commune</i>	MACC-150	magyar, V	Zehnder 8	0,86 (8 nap)
Nostocales	<i>Anabaena constricta</i>	MACC-159	szerb, T	BG-11 (N-free)	0,72 (9 nap)
Nostocales	<i>Calothrix viguieri</i>	MACC-168	cseh, T	Zehnder 8	0,58 (10 nap)
Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	MACC-173	cseh, T	BG-11	1,37 (11 nap)
Nostocales	<i>Nostoc pruniforme</i>	MACC-181	német, V	BG-11	2,27 (8 nap)
Pseudanabaenales	<i>Pseudanabaena sp.</i>	MACC-182	magyar, T	BG-11	1,82 (8 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix tenuis</i>	MACC-205	német, V	Zehnder 8	1,98 (15 nap)
Nostocales	<i>Anabaena miniata</i>	MACC-229	magyar, V	Zehnder 8	1,37 (10 nap)
Nostocales	<i>Anabaena azollae</i>	MACC-238	orosz, V	Bristol	1,26 (9 nap)
Nostocales	<i>Anabaena tenericaulis</i>	MACC-248	magyar, V	BG-11	1,14 (10 nap)
Nostocales	<i>Calothrix sp.</i>	MACC-250	magyar, T	Zehnder 8	1,05 (15 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix sp.</i>	MACC-281	brazil, T	BG-11 (N-free)	0,66 (10 nap)
Nostocales	<i>Anabaena sphaerica</i>	MACC-304	orosz, V	Tamiya	3,54 (21 nap)
Pseudanabaneales	<i>Leptolyngbya boryana</i>	MACC-312	cseh, V	BG-11	2,28 (17 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-319	brazil, T	Tamiya	2,9 (18 nap)
Nostocales	<i>Calothrix sp.</i>	MACC-403	brazil, T	Tamiya	2,16 (16 nap)

M5.1. táblázat: Káposzta gyökérlégy tojásrakására vizsgált 60 cianobaktérium törzs taxonómiai helye, eredete és produktivitásának jellemzői.

T: talaj, V: víz (folytatás)

Osztály/rend	Taxon	MACC	Eredet	Tápoldat	Biomassza (g L ⁻¹)
Nostocales	<i>Calothrix sp.</i>	MACC-405	brazil, T	BG-11	1,5 (16 nap)
Nostocales	<i>Nostoc muscorum</i>	MACC-420	brazil, V	BG-11	1,08 (15 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-427	brazil, T	Zehnder 8	1,78 (18 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-429	brazil, V	BG-11	2,12 (18 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-437	brazil, T	Tamiya	1,12 (15 nap)
Oscillatoriales	<i>Lyngbya sp.</i>	MACC-440	brazil, T	Zehnder 8	1,2 (15 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-461	brazil, V	Tamiya	3,16 (12 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-462	brazil, T	Zehnder 8	1,48 (12 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix sp.</i>	MACC-465	brazil, T	Zehnder 8	2,16 (8 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-484	brazil, T	Tamiya	1,64 (13 nap)
Nostocales	<i>Calothrix sp.</i>	MACC-491	brazil, T	Tamiya	2,5 (12 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-498	brazil, V	Tamiya	1,38 (13 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-513	cseh, V	Zehnder 8	0,9 (13 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-536	brazil, T	BG-11	1,24 (12 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-597	brazil, T	BG-11	2,14 (15 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-605	magyar, V	Bristol	2,6 (14 nap)
Pseudanabaneales	<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	MACC-611	cseh, V	BG-11	2 (14 nap)
Nostocales	<i>Nostoc entophytum</i>	MACC-612	cseh, V	Tamiya	3,14 (12 nap)
Pseudanabaenales	<i>Pseudanabaena galeata</i>	MACC-613	cseh, V	BG-11	1,58 (12 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix sp.</i>	MACC-623	cseh, V	BG-11	1,1 (14 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-627	magyar, V	BG-11	1,72 (14 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-629	ausztria, T	BG-11	1,46 (19 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-632	magyar, V	Zehnder 8	2,18 (15 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-633	magyar, V	Zehnder 8	1,38 (15 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-634	magyar, V	Tamiya	2,2 (15 nap)
Pseudanabaneales	<i>Leptolyngbya boryana</i>	MACC-637	cseh, V	Zehnder 8	1,54 (14 nap)
Pseudanabaneales	<i>Leptolyngbya sp.</i>	MACC-651	cseh, V	BG-11	1,16 (20 nap)

M5.1. táblázat: Káposzta gyökérlégy tojásrakására vizsgált 60 cianobaktérium törzs taxonómiai helye, eredete és produktivitásának jellemzői.

T: talaj, V: víz (folytatás)

Osztály/rend	Taxon	MACC	Eredet	Tápoldat	Biomassza (g L ⁻¹)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-661	cseh, T	Tamiya	1,86 (10 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-667	cseh, V	BG-11	1,44 (14 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-668	cseh, T	Bristol	1,28 (10 nap)
Nostocales	<i>Nostoc sp.</i>	MACC-683	brazil, T	Bristol	2 (15 nap)
Nostocales	<i>Tolypothrix tenuis</i>	MACC-708	ukrán, V	Tamiya	2,9 (14 nap)
Nostocales	<i>Anabaena variabilis</i>	MACC-797	angol, V	Tamiya	2,12 (14 nap)
Pseudanabaenales	<i>Pseudanabaena sp.</i>	MACC-891	NIVA-CYA III.	Zehnder 8	1,52 (14 nap)
Oscillatoriales	<i>Phormidium sp.</i>	MACC-892	NIVA-CYA 7.	Zehnder 8 (agar)	-