

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Technológiai Kar



**A króm hatása a *Chlorella pyrenoidosa* néhány
anyagcsere-folyamatára**

doktori (PhD) értekezés

Hörsik Tibor Zsolt

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2009

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK *Juhász-Nagy Pál* Doktori Iskola *Környezettudomány* programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2009.

.....
Hörcsik Tibor Zsolt

Tanúsítom, hogy Hörcsik Tibor Zsolt doktorjelölt 2003 - 2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola *Környezettudomány* programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2009.

.....
Dr. Mészáros Ilona

Tanúsítom, hogy Hörcsik Tibor Zsolt doktorjelölt 2003 - 2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola *Környezettudomány* programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2009.

.....
Dr. Lakatos Gyula

Tanúsítom, hogy Hörcsik Tibor Zsolt doktorjelölt 2003 - 2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola *Környezettudomány* programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2009.

.....
Dr. Balogh Árpád

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés, célkitűzések.....	9
2.	Irodalmi áttekintés.....	12
2.1.	A fémek előfordulása, funkciói, toxicitása az élő szervezetekben.	12
2.1.1.	Az élő szervezeteket felépítő, eszenciális elemek.....	12
2.1.2.	A fémek előfordulása az élő szervezetekben és fiziológiai hatásaik	13
2.1.3.	Nehézfémek és a növények közötti kölcsönhatások	15
2.1.4.	Nehézfémek hatása a fotoszintézisre	21
2.1.5.	A klorofill fluoreszcencia.....	22
2.1.6.	A krómról általában.....	24
2.1.7.	Króm és mikroorganizmusok kölcsönhatása	28
2.1.8.	A króm hatása a fotoszintetizáló élőlényekre	29
2.1.9.	Króm hatása zöldalgák és a hajtásos növények növekedésére	29
2.1.10.	Króm felvétel és eloszlás növényekben	31
2.1.11.	Króm hatása fotoszintetizáló szervezetek anyagcsere folyamataira.....	31
2.1.12.	Króm tolerancia növényekben	32
3.	Anyag és módszer	34
3.1.	Vegyszerek.....	34
3.2.	Algatenyésztet-algatenyésztés.....	34
3.3.	Algatenyésztet Cr(III) és Cr(VI) - ionnal történő kezelése	35
3.4.	Az algasejtek szaporodásának vizsgálata.....	35
3.5.	Algasejtek frakcionálása és elemösszetételének meghatározása.....	35
3.6.	Fotoszintetikus pigment vizsgálatok	37
3.7.	Mintaelőkészítés a szabad aminosav analízishez.....	37
3.7.1.	Aminosav analízis	37
3.8.	Fotoszintézis vizsgálatok	38
3.9.	Szénhidrát-anyagcsere szabályozással kapcsolatos mérések	38
3.10.	A kataláz és a peroxidáz aktivitások mérése.....	39
3.11.	Fitokelatin szintáz (PC szintáz) enzimaktivitás mérés.....	40
3.12.	Fitokelatin szintáz termékek HPLC-s analízise	40
4.	Eredmények és megvitatásuk.....	42
4.1.	A króm hatása a <i>Chlorella pyrenoidosa</i> növekedésére.....	42
4.2.	Króm és mikroelem eloszlás a különböző sejtfrakciók között... ..	47
4.3.	Fotoszintetikus pigment összetétel változása <i>Chlorella pyrenoidosa</i> zöldalgában Cr(VI) kezelés hatására	50

4.4.	Szabadaminosav mennyiségének változása <i>Chlorella pyrenoidosa</i> zöldalgában Cr(VI) hatására.....	53
4.5.	Oxidoreduktázok aktivitásának változása <i>Chlorella pyrenoidosa</i> zöldalgában Cr(VI) kezelés hatására.....	56
4.6.	Fitokelatin szintáz aktivitásának változásai <i>Chlorella pyrenoidosa</i> zöldalgában Cr(VI) kezelés hatására.....	61
4.7.	A Cr(VI) hatása a <i>Chlorella pyrenoidosa</i> fotoszintetikus aktivitására	63
4.8.	A Cr(VI) hatása a <i>Chlorella pyrenoidosa</i> szénhidrát-anyagcsere folyamataira.....	70
5.	Összefoglalás.....	73
5.1.	A Cr(VI) hatása a <i>Chlorella pyrenoidosa</i> szaporodására.....	74
5.2.	Mikroelem összetétel, króm akkumuláció	75
5.3.	Fotoszintetikus pigmentek és a szabad aminosavak mennyiségének változása	75
5.4.	Az oxidatív stressz kivédésében fontos szerepet játszó oxidoreduktázok aktivitásának változása.....	76
5.5.	Fitokelatin szintáz aktivitásának változásai	77
5.6.	Fotoszintetikus aktivitásban beálló változások	77
5.7.	Szénhidrát-anyagcsereben beálló változások	78
6.	Summary	79
6.1.	Introduction and objectives	79
6.2.	Materials and Methods.....	80
6.2.1.	Algal cultures	80
6.2.2.	Treatment of algae with chromium compounds.....	81
6.2.3.	Analysis of growth rate	81
6.2.4.	Fractionation of algal cells and elemental analysis.....	81
6.2.5.	Extraction of photosynthetic pigments of algae and their separation by HPLC	82
6.2.6.	Amino acid analysis	82
6.2.7.	Photosynthetic measurements	82
6.2.8.	Assay of carbohydrate-metabolism.....	83
6.2.9.	Assay of peroxidase and catalase activity.....	83
6.2.10.	Phytochelatin synthase assay	84
6.3.	New scientific results	84
6.3.1.	Effects of Cr(VI) on the reproduction of <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	85
6.3.2.	The composition of micro-elements and the accumulation of chromium	85

6.3.3.	Changes in the amounts of photosynthetic pigments and free amino acids.....	85
6.3.4.	Changing activities of oxidoreductases as important factors of the protection against oxidative stress	86
6.3.5.	Alterations in the activity of phytochelatine synthase	86
6.3.6.	Changes in the photosynthetic activity	86
6.3.7.	Carbohydrate metabolism	87
7.	Köszönetnyilvánítás	88
8.	Irodalomjegyzék.....	89
9.	Hörcsik Zsolt tudományos tevékenységének jegyzéke.....	100
9.1.	Az értekezés témakörében megjelent előadások és posztterek .	100
9.2.	Az értekezés témakörében megjelent szakcikkek.....	100
9.3.	Egyéb előadások, posztterek	101
9.4.	Egyéb szakcikkek.....	101

Rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
MDA	malondialdehid
POD	peroxidáz
CAT	kataláz
TBRI	tiobarbitursav reaktív intermedier
PSI	első fotokémiai rendszer
PSII	második fotokémiai rendszer
LHCPI	az első fotokémiai rendszer fénygyűjtő antennájának pigment-proteinje
LHCPII	az második fotokémiai rendszer fénygyűjtő antennájának pigment-proteinje
CCI	a első fotokémiai rendszer felépítésében résztvevő klorofill-karotinoid komplex
CCII	a második fotokémiai rendszer felépítésében résztvevő klorofill-karotinoid komplex
P680	az első fotokémiai rendszer reakciócentruma
P700	a második fotokémiai rendszer reakciócentruma
Q_A	az első fotokémiai rendszer elsődleges kinon akceptora
Q_B	az első fotokémiai rendszer másodlagos kinon akceptora
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
F₀	a fluoreszcencia indukció kezdeti értéke
F_m	a fluoreszcencia indukció maximális értéke
F_v	változó fluoreszcencia (F _m -F ₀)
EC₅₀	az a nehézfém koncentráció melynél 50%-os funkciósökkenés következik be
SDS	nátrium-lauril-szulfát
P_pBQ	fenil-p-benzokinon
PEG	polietilén-glikol
PFP	pirofoszfát-fruktóz-6-foszfát-foszfotranszferáz
PFK	foszfofruktokináz
Tris	trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
EDTA	etilén-diamino-tetraacetát
F1,6P₂	fruktóz-1,6-difoszfát
NADP	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
5-SSA	szulfoszalicilsavv
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
TFA	trifluor-ecetsav
DTNB	ditio-nitrobenzol
Pi	anorganikus foszfát

1. Bevezetés, célkitűzések

Az élőlények számos olyan terhelésnek vannak kitéve környezetükben, melyek aktivitásukat, fejlődési folyamataikat, lehetőségeiket korlátozzák. Ezeket a terheléseket egyrészt természetes abiotikus (alacsony-, ill. magas hőmérséklet, UV-A, UV-B sugárzás), másrészt biotikus (baktériumok gombák, rovarok), míg harmadrészt antropogén eredetű (savas eső, xenobiotikumok, nehézfémek, stb.) tényezők váltják ki. Mindezek a hatások - összefoglaló néven a stresszorok - olyan rövid- és hosszútávú válaszokat váltanak ki a szervezetekben, amelyek létrehozzák az egyed életében túlélést biztosító akklimációt és akklimatizációt; a több nemzedék során kialakuló tartós ellenállóképességet, adaptációt és ennek eredményeként a rezisztenciát. Akklimáció (rövidtávú, fenotipusos válasz az egyed életében): a növényegyed szervezettani és élettani illeszkedése, egy adott stresszorra adott kiegyensúlyozó válasz, ami kompenzálja a stresszor hatására az élettani parameterekben bekövetkező csökkenést. Akklimatizáció (szintén rövidtávú fenotipusos válasz az egyed életében): számos környezeti tényező esetén bekövetkezett komplex változásokra adott kiegyensúlyozó válaszok összessége. Adaptáció (hosszútávú válasz): az öröklődés során egy populációban alakul ki, az adott gének előfordulása megváltozik, kedvezőbb génkombinációk jönnek létre, eredménye a tartós rezisztencia. A különböző stresszorok által kiváltott stresszválaszok egyes esetekben teljesen specifikusak. Hidegstressz hatására ún. „antifreeze” proteinek jelennek meg, más esetekben általános válaszok következnek be, például antioxidáns gének expressziója figyelhető meg UV-A, UV-B és nehézfém terhelések esetén is (Nilsen és Orcutt 1996). Figyelembe véve, hogy a növények esetében egy-egy generáció viszonylag hosszú életű, valamint többségük helyhez kötött, az akklimáció szerepe rendkívül fontosnak tűnik.

Mind a talaj, mind pedig a felszíni és felszín alatti vizek esetében komoly gondot okoznak az oldható nehézfém-ionok és ezek különböző szervesetlen komponensekkel képzett komplex vegyületei. A különböző feldolgozóiparok (bőr, papír, fémkohászat, galvánüzemek) által kibocsátott nehézfém szennyezőket részletesen elemezték makro-, illetve mikroökológiai szempontok alapján, kevésbé ismertek azonban a nehézfém-ionok által okozott molekuláris hatásmechanizmusok. A vizekben minden szennyező ágens elsősorban az algák és más mikroorganizmusok életműködését befolyásolja, bár a jól detektálható környezeti károsodásokat gyakran csak összetettebb szervezetekben vesszük észre.

Nehézfémet okozta stresszek esetében jellegzetes változások lépnek fel a fotoszintetizáló élőlényekben (plazmamembrán - károsodások, oxigényökök képződése, szabad fémionok jelennek meg a citoszolban, tápanyagfelvételi-, vízháztartásbeli-, fotoszintetikus zavarok, növekedésgátlás, csökkent virág- és magképződés), melyek egy része közvetlen, míg másik részük közvetett hatásokra vezethető vissza.

Kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy egy lokálisan, a környezetbe gyakran nagy mennyiségben kikerülő toxikus nehézfémet - a króm - milyen módon és milyen mértékben befolyásolja egy jól ismert zöldalga faj - a *Chlorella pyrenoidosa* - egyes anyagcsere folyamatait. A krómot azért választottuk vizsgálataink céljául, mert az élőlényekre gyakorolt hatásainak molekuláris mechanizmusa kevésbé ismert, feltárása jelenleg is folyamatban van. Toxikussága bár kevésbé ismert, mint a toxikológiai kutatások homlokterében lévő kadmiumé és ólomé, de a Cr(VI) karcinogén és teratogén hatása az állati szervezetre bizonyított (Wetterhahn és Hamilton 1989). Munkánk során kísérleteket végeztünk Cr(III)-mal is, ezeket az eredményeket itt részletesen nem taglaltam. A Cr(III) egy stabilis forma, élettani jelentősége a Cr(VI)-hoz képest elhanyagolható.

Számos ipari, mezőgazdasági terület jelentős mennyiségű nehézfémmel - közöttük krómmal - szennyezett, ezek többsége hagyományos módszerekkel csak jelentős költségek árán krómmentesíthető. A XXI. században ezekben a folyamatokban egyre nagyobb szerepet kapnak a bioremediációs (fitoremediációs) módszerek. A szárazföldi növénytakaróval kapcsolatban elvégzett vizsgálatok eredményeit vízi környezetben nehéz alkalmazni, azonban az algák felhasználásával újabb lehetőségek kínálkoznak mind indikáció, mind pedig az akkumuláció és elimináció folyamatában. A különböző algafajok - illetve ezeknek a fajoknak a speciális törzsei - gyakran nagy mennyiségben képesek felhalmozni nehézfémet, egyrészt intra-, másrészt extracellulárisan. Ezeknek a nehézfémeteknek a felvétele és megkötése közben gyakran olyan redoxfolyamatok játszódnak le bennük, amelyek az adott fémiont kevésbé oldható, az élőlények számára kevésbé felvehető formába alakítják át. Vizsgálataink közvetett módon választ kerestek arra is, hogy egy - nehézfémetekkel szennyezett - vizes élőhely restaurációjában milyen módon használhatók fel a zöldalgák.

Munkánk során a Cr(VI) hatását vizsgáltuk a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga szaporodására és a nehézfémet-stresszekre jellemző, fontosabb anyagcsere folyamataira.

Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy:

- Milyen módon befolyásolja a Cr(VI) a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga szaporodását, növekedését és biomasszájának változását?
- Képesek-e a zöldalga sejtek akkumulálni a krómot, illetve milyen ennek a sejten belüli megoszlása? Milyen tendenciájú változások történnek a sejtek mikroelem-összetételében Cr(VI) kezelés hatására?
- Hogyan változik meg a sejtek fotoszintetikus pigment összetétele, ill. mintázata, az aminosav tartalom - különösen a proliné - Cr(VI) kezelés hatására?
- Milyen mértékben változik a fotoszintézis hatékonysága? Közvetlen, vagy közvetett hatásokra vezethetők-e vissza ezek a változások, illetve milyen változások következnek be a szénhidrát-anyagcserében és milyen metabolikus, enzimatikus következmények tapasztalhatók?
- Hogyan változik a nehézfém terhelések hatására várhatóan fellépő oxidatív stresszt kontrolláló oxidoreduktázok - kataláz, peroxidázok - aktivitása?
- Jelennek-e meg speciális nehézfém kötő proteinek (fitokelatinok) illetve indukálódnak-e a szintézisükhöz szükséges enzimek króm(VI) terhelés hatására?

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A fémek előfordulása, funkciói, toxicitása az élő szervezetekben

A kémiai és a biológiai evolúció összetett fejlődési folyamatában rendkívül fontos és igen sokrétű szerepet játszottak az egyes fémionok, hiszen már a legegyszerűbb szerves molekulákkal, valamint szerves komponensekkel, mint az ammónia és a cianid-ion is komplexeket tudnak képezni. E komplexek reakciókészsége nőhet és új reakcióutak nyílhatnak meg. A fémionok templátként viselkedhetnek, így a körülöttük elhelyezkedő ligandumok is kapcsolódni tudnak egymással és nagyobb molekulák alakulhatnak ki. Egyes fémionok és az egyszerű fémkomplexek katalitikus, vagy inhibitor funkciót is elláthatnak egyes reakciókat gyorsítva, másokat lassítva. Ez az oka annak, hogy a fémionok az élő szervezetnek fontos - egyesek nélkülözhetetlen - elemeivé váltak. Ilyen irányú ismereteink zömét az utolsó három évtizedben szereztük (Lawrence 2000).

2.1.1. Az élő szervezeteket felépítő, eszenciális elemek

Az élő szervezetekből megfelelő analitikai módszerekkel szinte az összes stabil elemet ki tudjuk mutatni, ennek ellenére alig harminc körülire tehető a biológiailag szükséges elemek száma. Az említett elemek közül néhány a molekulák alkotójaként van jelen és kovalens kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, a többi ionok formájában, szabadon helyezkedik el a citoplazmában, vagy kapcsolódik más részecskékhez.

Az új felfedezések kizárólag az ún. mikroelemekkel kapcsolatosak. A kobalt létfontosságának felismerése óta (1935) közel két évtized telt el, amikor sikerült a molibdén (1953) a króm (1957) és a szelén (1959) lényeges biológiai szerepét is bizonyítani. Ezt követően teljesen új vizsgálati és műszeres analitikai módszerek vezettek a fluor, az ón és a vanádium szerepének tisztázásához (Kőrös 1980).

Az élőlényeket felépítő elemeket három csoportra osztjuk.

Az 1. csoportba mindössze hat biogén elem (hidrogén, szén, nitrogén, oxigén, foszfor és kén) tartozik. Belőlük épülnek fel a szénhidrátok, zsírok, fehérjék és a nukleinsavak. Ezek a molekulák maguk is fontosak, másrészt biológiailag aktív nagyobb molekulák építőkövei. A

kén és foszfor sok koenzim alkotórésze, szulfát- és foszfát-ion formában is jelen van.

A létfontosságú elemek második csoportja felelős a sejtek elektrokémiai tulajdonságaiért. Az alkálifém- és alkáliföldfém-ionok szerepe a legegyszerűbb baktériumoktól kezdve, a legfejlettebb növényi és állati szervezetekig rendkívül sokrétű. Befolyásolják számos enzim aktivitását, fontos szerepük van az ingerületvezetési folyamatokban. A kálium-, magnézium-, kalcium-, nátrium-, klorid-, szulfát- és foszfát-ionok elektromosan semleges teret biztosítanak a sejtek és a testfolyadékok számára, részt vesznek folyadéktérfogatok fenntartásában, illetve biztosítják az ozmotikus és ioneqyensúlyt a sejtthártya mindkét oldalán.

A biológiailag fontos elemek harmadik legnépesebb csoportját a mikroelemek alkotják. A bór, fluor, szilícium és jód - nemfémes elemek - biokémiai szerepéről a jód kivételével nem sokat tudunk. A fémes mikroelemek közül a vas, réz, cink, mangán, kobalt és molibdén viszont az összes földi életforma számára nélkülözhetetlen. Ismerünk azonban olyan fémes mikroelemeket is (szelén, vanádium, króm, ón), melyek csak bizonyos élőlénycsoportok számára nélkülözhetetlenek (Kőrös 1980).

2.1.2. A fémek előfordulása az élő szervezetekben és fiziológiai hatásai

A fémeket a periódusos rendszerben az ún. bór-polónium vonaltól balra találjuk. Az s-mezőben az alkáli- és alkáliföldfémeket, a p-mezőben a bór-polónium vonaltól balra félfémes, illetve fémes elemeket, míg a d-mezőben az ún. átmeneti fémeket találjuk.

Az alkálifémek és alkáliföldfémek biológiai szerepéről közismert, hogy sejten belüli és sejten kívüli eloszlásuk nem a termodinamikai egyensúlynak megfelelő, hanem az ionokra nézve a sejtmembrán két oldalán koncentráció gradiens alakul ki. A sejten belüli térben a kálium- és magnézium-ion koncentrációja, míg a sejten kívül a nátrium- és kalcium-ion koncentrációja magasabb. Ez a jelenség több tényező eredője: aktív transzport, membránszelektivitás, anionok (klorid-ionok és töltéssel rendelkező fehérjék, szerves savak) speciális eloszlása, ami élőlénycsoportonként eltérő módon szabályozódik (Hua et al. 2003). Szikes és más magas nátrium tartalmú talajok esetén sóstressz léphet fel, amelynek következtében a fotoszintetikus aktivitás drasztikusan csökken (Zhu 2003).

A p-mező fémei közül biológiai szempontból az ón az egyetlen, amely létfontosságú a patkányok és a nyulak idegi működésében és

kiválasztásában (Toda et al. 2002, Koeppen és Dickson 2002), bár még ma sincs ezzel kapcsolatosan egységesen kialakult szakmai álláspont.

Az ólom mind a növényekre (Slaveykova és Wilkinson 2002), mind pedig az állatokra toxikus. Egyes ipari körzetekben - ahol ólomfeldolgozás folyik - 10-50-szeresére növekedhet a növények ólomtartalma.

Az alumínium - bár a természetben viszonylag kevés formája mobilis (Kinraide 1991) - növényekben jelentős mennyiségben felhalmozódhat, ahol bizonyos esetekben toxikus tüneteket is mutathat. Főleg a gyökérmegnyúlásban (Ryan et al. 1993) és a kalcium anyagcserében okoz problémákat (Rengel 1992), míg patkányban és emberben idegrendszeri problémákkal hozható kapcsolatba.

A d-mező fémek közül több, szinte minden élőlény számára létfontosságú, ugyanakkor néhányuk a legtoxikusabb ágensnek közé tartozik. A sejtek a nehézfémek közül a vas után a cinket tartalmazzák a legnagyobb mennyiségben, ezért nem meglepő, hogy a baktériumokban, növényekben és állatokban lejátszódó számos folyamatban a cinknek fontos szerepe van. A biológiai rendszerekben a cink egyrészt enzimaktivátor, mint például a karboxipeptidáz-A és a szénsav-anhidráz esetében, másrészt szerkezetalkotó ion. A cink sok enzimnek lehet kofaktora és számos fehérjeszekvencia tartalmaz Zn^{2+} -kötő struktúrdoméneket (Clarke és Berg 1998). A cink hiánya súlyos következményekkel jár, gátolja a fehérje- és a szénhidrát-anyagcserét, zavarokat okoz a növekedésben és a csontképzésben (Ovesen et al. 2001).

A kadmium és a higany egyaránt erősen mérgező az élőlényekre, bár hatásuk fajonként igencsak eltérő. A kadmium ugyanakkor erősen zavarja a vas anyagcserét is. A higany rendkívül könnyen kapcsolódik tiol- (SH-) csoportokhoz, toxikussága részint ennek, részint viszonylagos mobilitásának köszönhető (Patra és Sharma 2000).

A réz(II) növényekben és állatokban egyaránt megtalálható, legtöbbször enzimek alkotórészeként. Sok vonatkozásban hasonló a biokémiája a vaséhoz, mindkét fém rendkívül fontos szerepet tölt be a molekuláris oxigén anyagcseréjében. A réz, protein vezérelt elektrontranszfer reakciók komponense lehet a szuperoxid-dizmutáz, citokró-m-c oxidáz és a plasztocianin esetében (Van Assche és Clijsters 1990). Esszenciális volta ellenére - oldható formái - nagyobb koncentrációban rendkívül toxikus hatásúak minden élőlényre.

A molibdén - bár a ritka elemek közé tartozik - szinte minden élő szervezet számára létfontosságú. Kiemelkedő fontossága van a növények nitrogén anyagcseréjében és a légköri nitrogén megkötésére képes baktériumok nitrogenáz enzimében. Általában redoxreakciókat katalizáló

enzimek kofaktora, ahol a molibdén oxidációs állapota +5 és +6 között változik (Taylor és Cowan 2004).

A mangán is minden élőlény számára létfontosságú elem. A növényi fotoszintézisben a vízbontó komplex részeként vesz részt, bár ennek pontos ultrastruktúráját és működési mechanizmusát még nem ismerjük (Wydrzynski 2004).

A kobalt biológiai szerepe döntő mértékben egy kobalt(III) központi atomot tartalmazó komplexhez a B12-vitaminhoz kapcsolódik, melyet zömében anaerob baktériumok szintetizálnak. Növények esetében leginkább a toxikus hatásait emelhetjük ki. Különböző kobalt-komplexek gátló hatásáról számoltak be a növekedés (Ahluwalia és Kaur 1988), a fotoszintetikus aktivitás és a klorofill-szintézis kapcsán (Hochman et al. 1979), képes befolyásolni a fotoperiodizmust is pl. borsó növényben (Shimazaki és Furuya 1980).

A nikkellről viszonylag kevés ismeretünk van. Biztosnak látszik, hogy a DNS- és RNS- metabolizmusban játszik szerepet (Rogstad et al. 2003). A növényvilágban toxikus elemként tartják számon (Lustigman et al. 1995), hajtásos növényekben nagy koncentrációban klorotikus tüneteket okoz.

2.1.3. Nehézfémek és a növények közötti kölcsönhatások

A nehézfémek toxicitásának biokémiai alapjai gyakran kevésbé tisztázottak. Néhány nehézfém - réz, cink, mangán - a növényeknél számos élettani folyamatban esszenciális mikroelem. Ugyanezek a fémek toxikusak lehetnek az optimális koncentráció felett, szulfhidril-csoportokkal összekapcsolódva inaktíválják azokat (Knauer et al. 1997). A redoxaktív tulajdonságú réz az optimálistól magasabb koncentrációban - de gyakran hiánya esetén is - reaktív oxigén intermedierek megjelenéséhez vezethet, ami lipidperoxidációt, membránkárosodást okozhat (De Vos et al. 1989).

Emellett a növények kapcsolatba kerülhetnek olyan potenciálisan toxikus nehézfémekkel, mint a kadmium, vagy higany. Ezek a fémek rendkívül könnyen reakcióba lépnek az aminosav oldalláncok kén és nitrogén atomjaival, megváltoztatva ezáltal az adott fehérjék konformációját (Lee et al. 1992, Sanita di Toppi és Gabbrielli 1999).

A növény-nehézfém kölcsönhatás során keletkező károsodásokat a hatást jelző paraméterrel az 1. táblázat mutatja be. Az első hatások már a fémionok és növényi sejtek első kölcsönhatásánál fellépnek (Clemens 2001) és reaktív oxigén intermedierek keletkezésén (Randhawa et al.

2001), valamint fémionoknak a plazmában való megjelenésén keresztül a fotoszintézis hatékonyságának csökkenéséhez, növekedésgátláshoz, magasabbrendű növények esetében csökkent virág- és magképződéséhez vezetnek.

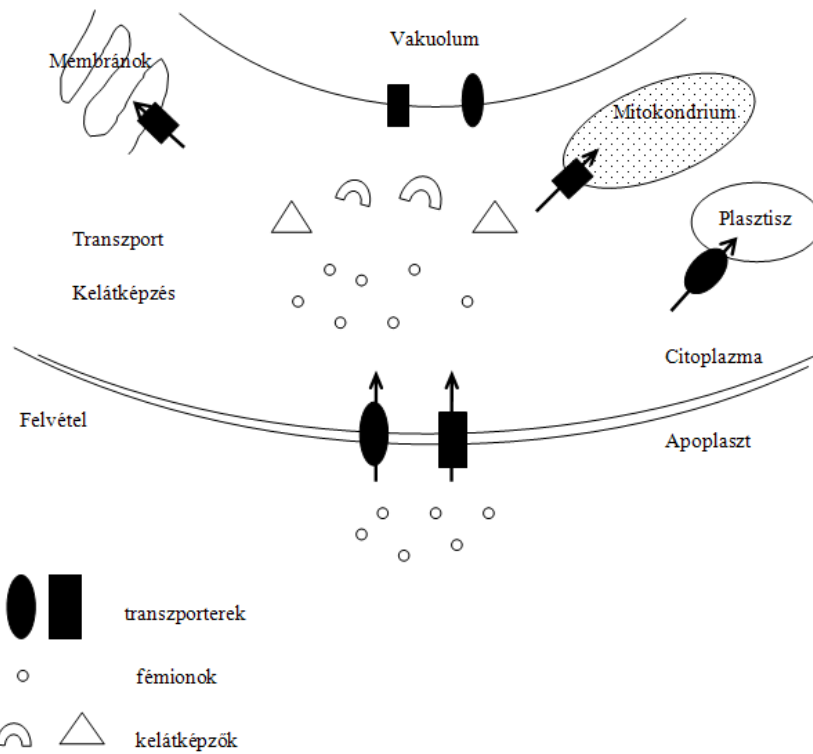
1. táblázat. Különböző nehézfém stresszek hatására fellépő károsodások növényekben

Fázis	Hatás	Mérhető paraméter	Irodalom
1.	plazmamembrán károsodás	K^+ efflux, festékfelvétel	DeVos et al. 1989
2.	reaktív oxigén intermedie- rek keletkezése, lipidperoxidáció	sejtmegnyúlás, malondial- dehid szint növekedése POD, CAT aktivitás válto- zása	Randhawa et al. 2001 Panda et al. 2003
3.	szabad fémionok megjele- nése a citoplazmában	sejtosztódási zavarok, fitokelatin szintáz aktivitás változása	Hörcsik et al. 2002
4.	zavarok a - tápanyagfelvételben - fotoszintézisben - vízháztartásban	elemanalízis fluoreszcencia analízis oxigen termelés termolumineszcencia szénhidrát-anyagcsere prolin, etilén	Hörcsik et al. 2002 Oláh et al. 2004 Wu et al. 1998
5.	növekedésgátlás	biomassza, sejtszám, gyökér/hajtás arány morfológiai változások	Hörcsik et al. 2006 Bassi et al. 1990
6.	csökkent virág- és magképződés	magszám, magminőség	Cary és Kubota 1990

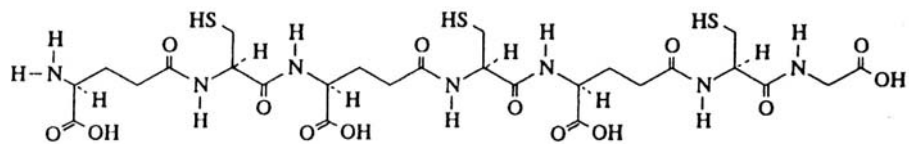
Mindezeknek a toxikus hatásoknak az elkerülésére és minimalizálására a növények kifejlesztettek egy komplex homeosztatis rendszert, amely kontrollálja a nehézfémek felvételét, akkumulációját, szállítását, illetve detoxifikációját (Clemens 2001). A fém-homeosztázis fő elemei: a transzport, a kelátképzés és a kiválasztási folyamatok (1. ábra).

Ezek a jelenségek alkotják a növényi nehézfém tolerancia alsó szintjét és szabályozzák a fémionok felvételét és elosztását sejt és szervezet szintjén (Clemens 2001). Például egy fitokelatin szintézis-hiányos *Arabidopsis* mutáns (*cad1*) érzékenyebb a Cd^{2+} -ra mint a vad típusú növény (Howden et al. 1995). Ugyanakkor a fémionok megkötése és immobilizálása a sejtfalban még nem lehet a rezisztencia alapja, mert bár a különböző nehézfém-ionok eltérő affinitást mutatnak a sejtfal pektin alkotórészeihez és egyéb kötőhelyeihez, de egy szenzitív és rezisztens növény sejtfalának kémiai összetételében nem találunk akkora különbséget, ami biztosítaná a rezisztenciát. Ez a jelenség önmagában egy rövid idejű expozíció esetén lehet hatásos. A membránpermeabilitás változása és az azt követő kompartmentizáció a vakuólumokban (Vögeli-Lange és Wagner 1990), valamint az aktív visszatranszportálás jelenthetnek új rezisztenciautakat. Ezek a folyamatok általában alacsony dózisú nehézfém stressz esetén hatékonyak.

Nagyon fontos stratégiai elemek a nehézfém detoxifikációban, a stresszoroknak karbonsavak (Mathys 1977, Sagner et al. 1998), fémkötő proteinek és polipeptidok általi kikapcsolása kelátképzés révén. Ezekben a folyamatokban fontos szerep jut a fitokelatinoknak (2. ábra). A fitokelatinok kisméretű fémkötő peptidok. Jellegzetes összetételük $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gly}$, $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-}\beta\text{-ala}$, $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-ser}$, $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-glu}$, $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gln}$, $(\gamma\text{-glu-cys})_n$, ahol az n értéke 2-11 érték között változhat (Klapheck et al. 1994). Szintézisüket glutationból, hidroximetilglutinationból, γ -glutamil-ciszteineiből történik fitokelatin szintáz elnevezésű transzpeptidáz segítségével (Grill et al. 1989). Az enzim poszttranszlációs nehézfém aktiválást igényel (Chen et al. 1997).



1. ábra. A növények fém homeosztázisának főbb elemei (Clemens munkája alapján 2001)



(γ -glutamilciszteinil)₃-glicin

2. ábra. Kisméretű fitokelatin molekula szerkezete

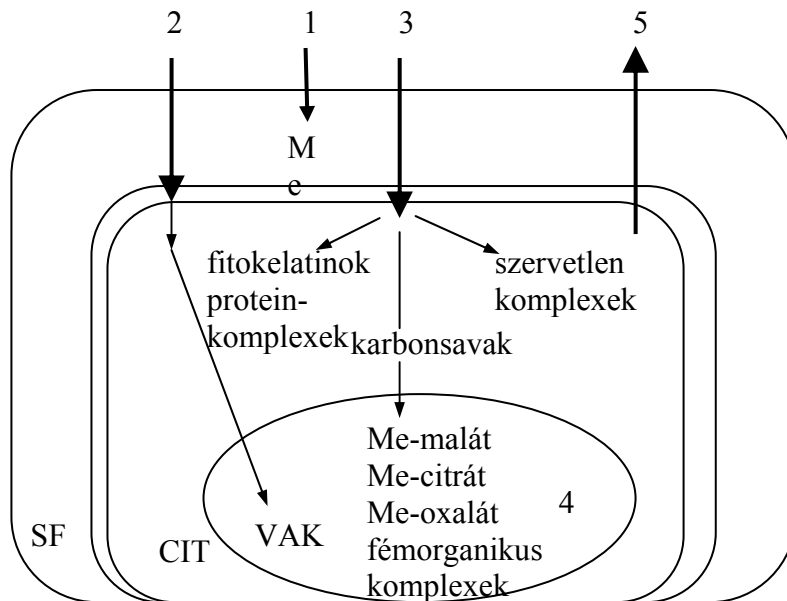
A fitokelatin szintáz aktivitását nehézfémek széles skálájával - Cd, Zn, Ag, Pb, Cu, Hg, Sn, Au, As, Cr (Maitani et al. 1996, Schmöger et al. 2000) - sikerült kimutatni mind algákban, mind magasabbrendű növényekben. A fitokelatin szintáz termelés lehetősége minden magasabbrendű növényben és az algák többségében is megvan. Az enzim aktivitását megmérték számos gombában is (Miensch et al. 2001).

Érdekesség, hogy a *Caenorhabditis elegans* fonálféregben is megtalálható egy fitokelatin szintáz gén, mely helyreállítja az enzim szintézisét és a Cd toleranciát egy fitokelatin szintáz hiányos *Saccharomyces pombe* mutánsban, ami azt jelzi, hogy funkcionális fitokelatin szintáz gének előfordulnak állatokban is (Clemens et al. 2001).

A fitokelatinok és a fitokelatin szintáz funkciójának megítélésében jelentős változásnak lehetünk tanúi. Kezdetben a sejt homeosztázisának fenntartásában, ill. esszenciális nehézfémek - Zn és Cu - szállításában tartották jelentősnek (Thumann et al. 1991), ezeket eredményeket borsó leveleken végzett kísérletek során kapták. Ugyanakkor ezekben a sejtekben általában magas Cu és Zn koncentrációkat mértek, gyakran a normál szint felett, közel a toxicitási határhoz. Fitokelatin szintáz hiányos *Arabidopsis cad1* mutánsokban sem számoltak be magasabb fémgénnyről, valamint nem mutattak jelentősen megemelkedett szenzitivitást Cu- vagy Zn-ionokra (Howden et al. 1995). Roncsolt fitokelatin szintáz génekkel rendelkező *Saccharomyces pombe* sejtek viszont hiperszenzitívek lettek Cu-stresszre (Clemens et al. 1998) jelezvén, hogy a fitokelatin szintáz szintézis fontos lehet a Cu detoxifikációjában. Kiderült, hogy a fitokelatin szintáz jelenléte elengedhetetlen a normál toleranciához, számos nem esszenciális fém, különösen Cd esetében. A Cd hipertoleráns sejtvonalak megnőtt fitokelatin szintézissel válaszoltak a Cd stresszre, köszönhetően a megemelkedett γ -glutamil-cisztein szintetáz aktivitásnak (Chen and Goldsbrough 1994).

Fontosak a növényi metallotioneinek is, mint a nehézfém-homeosztázis alkotóelemei. Az első növényi metallotioneint (III. osztályú metallotioneinek) érett búza embriókból izolálták 1987-ben (Lane et al. 1987), azóta mintegy 50 szekvenciát találtak különböző fajokban. Expressziójuk és élettani szerepük összetett, számos kérdés még tisztázatlan. Megjelenésük nemcsak nehézfém expozíció esetén figyelhető meg, hanem hormonkezelés, só-, hideg- és ozmotikus stressz hatására is (Rauser 1999). Tisztításuk eddig nem járt sikerrel, az említett búza és egy *Arabidopsis* metallotionein kivételével (Murphy et al. 1997).

Jelen ismereteink azt sugallják, hogy a növényeknek van egy általánosnak nevezhető nehézfém-tolerancia mechanizmusuk, melynek vázlatát a 3. ábrán mutatjuk be.



3. ábra. Lehetséges fémrezisztencia mechanizmusok:

1. Fémion immobilizálódás a sejtfalban
 2. Membrán permeabilitás gátlása
 3. Kelátképzés
 4. Kompartmentizáció
 5. Retranszport
- Me: fémion, SF: sejtfal, CIT: citoplazma, VAK: vakuolum

Néhány növényfaj egyedei képesek magas nehézfém koncentráció mellett is növekedni, ezek természetes szelekciós toleranciával, ún. hipertoleranciával, vagy hiposzenzitivitással rendelkeznek (Chaney et al. 1997). Ez a hipertolerancia gyakran bizonyos fémekre specifikus (Schat et al. 1997). Néhány növényfaj nemcsak tolerálja a magasabb fémkoncentrációkat, de akkumulálja is azokat. Mintegy 400 faj - változatos rendszertani megoszlásban - tartozik a hiperakkumulátorok közé, ezek 75%-a nikkelt hiperakkumuláló (Baker és Brooks 1989). Hiperakkumulátoroknak tekintjük általánosságban azokat a növényeket amelyek 0,1 % Ni, Co, Pb-t képesek felhalmozni szárazanyagára vonatkoztatva. Cd esetén ez az érték 0,01%, míg a Zn-nél >1% (Broadhurst et al 2004). A hiperakkumuláció az alapja a fitoremediációs eljárásoknak (Lakatos 2000, Lakatos et al. 2001).

2.1.4. Nehézfémek hatása a fotoszintézisre

A nehézfémek és más stresszorok fotoszintézisre gyakorolt gátló hatása napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő kutatási területe. Számos strukturális és metabolikus vonatkozását vizsgálták és vizsgálják, mind laboratóriumi, mind szabadföldi kísérletekben. A legtöbb korai vizsgálat izolált kloroplasztiszokra és részlegesen tisztított enzimekre vonatkozik, azonban ezeket az eredményeket csak fenntartásokkal fogadhatjuk el. Példaként említhető, hogy Zn-ionokkal a bab kloroplasztiszokon *in vitro* kimutatható elektrontranszport gátlást nem lehetett kimutatni az intakt növényen (Van Assche et al. 1979). Napjainkban előtérbe kerültek az algákon és intakt növényeken végzett kísérletek.

A fotoszintetikus pigment vizsgálatok több nehézfém és növény esetében a klorofill tartalom csökkenését, valamint a klorofill *a/b* arány csökkenését mutatták. Hasonló tünetek voltak megfigyelhetők pl. paradicsom esetében is, ha Cd, Hg ill. Zn nehézfémekkel kezelték. A karotinoidokra gyakorolt hatás általában kevésbé volt jelentős, ami alacsonyabb klorofill/karotinoid arányt eredményezett (Baszynski et al. 1980). Cd és Pb kezelés hatására a kloroplasztisz ultrastruktúra szétesése, valamint a gránum/kloroplaszt és tilakoid/gránum arány csökkenése volt megfigyelhető mind hajtásos növényekben, mind algákban (Lindsey és Lineberger 1981, Thomas et al. 1980).

A PSII aktivitásának csökkenése volt megfigyelhető Zn, Cd és Hg kezelés hatására is, mivel a hatás mértéke csökkenthető volt szemikarbaziddal, a hatás valószínűleg a vízbontó hely közelében jelentkezett (Baszynski et al. 1980, De Filippis et al. 1981). Kloroplasztiszokon, algákon és hajtásos növényeken végzett kísérletek arra utalnak, hogy a nehézfémek fő támadási pontja a PSII, míg a PSI kevésbé érzékeny (Prasad és Strzalka 1999). A CO₂ redukciós ciklusának illetve a fotofoszforilláció enzimrendszerének SH-csoportjai szintén célpontjai a nehézfémek támadásának (Uribe és Stark 1982, Prasad és Strzalka 1999).

Mivel a nehézfémek a fotoszintézis szinte minden pontján képesek interakcióra, feltételezhetjük, hogy hatásuk kaszkádszerű, és nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy más tényezők - szabadgyökreakciók, szövet- és membránkárosodások - is befolyásolják a hatást (Clijsters és Van Assche 1985).

A legutóbbi évtizedben előtérbe került a pigmentrendszerben lejátszódó, általában rövid idejű fotofizikai és fotokémiai folyamatok vizsgálata, amelyek alapvető fontosságúak a fotoszintézis hatékonyságának megítélés szempontjából. Vizsgálatokkal előre jelezhetjük egy növény hosszútávú fotoszintetikus képességét.

2.1.5. A klorofill fluoreszcencia

A fotoszintézis komplex folyamatában a fény és sötétszakasz mind idő, mind térbeli kompartmentációval jellemezhető, ami a kloroplasztiszok szerkezetében is megnyilvánul. A kloroplasztiszok alapállományában történik a CO₂ megkötése, míg a tilakoidmembránban az elsődleges fizikai folyamatok - a fényenergia összegyűjtése és redukáló erővé történő átalakítása megy végbe. Ezeknek a folyamatoknak két egymástól eltérő fotoszisztéma a színtere. A második fotokémiai rendszer (PSII) és a fénybegyűjtő klorofill-fehérje komplex (LHCP) zömében a gránulumokban, míg az első fotokémiai rendszer (PSI) a sztrómatilakoidokban található, a két rendszert speciális elektrontranszportlánc köti össze. A két fotorendszer közötti elektronáramlás mellett protonvándorlás is megvalósul a membrán két oldala között és az így létrejött pH-, töltés, és potenciálkülönbség ATP szintézisre használódhat fel.

A fényenergia begyűjtését végző klorofill-protein komplexek (klorofill-karotinoid komplexek) több fajtáját sikerült kimutatni (CCI, CCII, LHCP1, LHCP2), amelyek maguk is több komplex összekapcsolódása révén jöhetnek létre. Ezek egy része a reakciócentrumok felépítésében játszik szerepet, míg más részük a reakciócentrumok belső és külső antennarendszerét alkotja (Laskay és Lehoczky 1989).

A fény abszorpciója során a fotoszintetikus pigmentek alapállapotból gerjesztett állapotba kerülnek, energia tartalmuk éppen annyival növekszik, mint amennyi az elnyelt foton energiatartalma. E megnövekedett energiatartalmú, excitált állapotban a molekula egyik elektronja magasabb energiaszintű pályán helyezkedik el, ahová az elnyelt fénykvantum "emelte". A fotoszintézis során a klorofill molekulák fotokémiai reakciójának a lényege, hogy a gerjesztett klorofill molekula egy lazítópályára juttatott elektront átad egy - a közvetlenül a környezetében lévő - elektronakceptoroknak. A klorofill oxidálódik és egy, a környezetében lévő donortól vesz fel egy elektront. Bár a fotoszintézis során csak két klorofill *a* forma vesz részt a töltésszeparációval járó folyamatban - a P680 és a P700 - speciális energiatranszferekkel más molekulaformák - antennapigmentek - által abszorbeált energia is hasznosul. Ez az energiatranszfer csaknem két nagyságrenddel növeli meg fotokémiai reakciók gyakoriságát a reakciócentrumokban (Krause és Weiss 1991).

A gerjesztési energia azonban nem minden esetben hasznosul fotokémiai reakcióban. Ezt a gerjesztési energia és a reakciócentrumok redoxállapota határozza meg elsősorban. A gerjesztett molekulák dezaktivációjának módja némileg eltérő az antenna, ill. reakciócentrum-pigmentek esetén. Az antennapigmentekben nincs lehetőség fotokémiai

hasznosulásra, míg a reakciócentrumokból más pigmentekre történő átadásra. A gerjesztési energia egy része hő, fluoreszcencia, késleltetett fluoreszcencia, belső konverzió, ritkábban foszforeszcencia révén disszipálódhat (Krause és Weiss 1991).

A fotoszintézis és a fluoreszcencia egymással komplementer folyamatok, arányuk egymással fordítottan arányos, magasabb fluoreszcencia érték mellett a fotoszintézis alacsonyabb mértékű. Ennek az állapotnak az eléréséig számos részfolyamatnak kell egyensúlyba kerülnie. Ha a levelet néhány percre sötétben (vagy alacsony fényintenzitás alatt) tartjuk, majd erősen megvilágítjuk, a fluoreszcencia egy kezdeti csúcsra emelkedik (néhány másodperc), majd egy steady-state értékre csökken (másodpercek v. percek). A fluoreszcencia indukció kinetika (Kautsky-effektus) azonban ennél sokkal összetettebb. Az indukciós görbe egy változó fluoreszcenciás görbe és egy konstans fluoreszcenciás háttér összegeként tekinthető. A görbét gyakran OIDPSMT elnevezéssel illetik. Az ebben a szakaszban megfigyelt változásokból következtethetünk a minta potenciális fotoszintetizáló képességére. A gyors fluoreszcencia indukciós szakaszban megfigyelhető változások a PSII reakciócentrumának redox állapotával állnak kapcsolatban. A PSII reakciócentrumában az első stabil elektronakceptor egy kinonmolekula (Q_A), amely egy másodlagos elektronakceptorra a (Q_B) adja át az elektront. Amennyiben a Q_A redukált állapotban van, további elektront nem képes fogadni a reakciócentrum felől, ilyenkor megnő a komplementer folyamatok, például a fluoreszcencia valószínűsége. A gyors fluoreszcencia indukciós görbe alakja a Q_A redoxállapotjának időbeli változásáról tanúskodik. Bár néha kutatóintézetenként is különböző fluoreszcencia pontok és paraméterek használatosak, a legfontosabbak a következők:

O: megvilágítás hatására a fluoreszcencia emelkedik (pikoszekundumos nagyságrendű, mondhatjuk tehát, hogy a fényforrás "nyitási idejétől" függ), és eléri konstans fluoreszcencia értékét

I: az összes elsődleges plasztokinon akceptor Q_A redukált állapotban van (0,5 ms)

D: az összes másodlagos plasztokinon akceptor Q_B redukált állapotban van (100-600 μ s)

P: a teljes plasztokinon mennyiség redukált állapotban van (0,5-2 s)

S: NADPH és ATP akkumulálódik, a pH emelkedik

M: a maximum fluoreszcencia másodlagos csúcsa, gyakran a P után következik, általában ez az a pont, ahol a szén redukciós ciklusa elindul

T: a klorofill fluoreszcencia értéke állandóvá válik (80-300 s)

F₀: a fluoreszcencia kiindulási szintje, mely a fotokémiai folyamatoktól független, függ az alkalmazott fényintenzitástól, a minta pigmenttartalmától. Pontos értéke csak akkor mérhető, ha a Q_A teljesen oxidált állapotban van, amit általában sötétadaptációval lehet biztosítani. A hőmérséklet növelése jelentős jelentősen növeli az F₀ értékét, a fagyasztás viszont kevésbé befolyásolja.

F_m: a maximális fluoreszcencia, teljesen redukált Q_A akceptorpool mellett. Értéke csökken erős megvilágítás és hőmérsékletemelkedés hatására.

F_v: változó fluoreszcencia, az F_m és az F₀ különbsége. A PSII centrumok fényenergia befogásával arányos. A gyors fluoreszcencia indukciós görbék kvantitatív kiértékelése egyrészt a változó fluoreszcencia részarányának meghatározására irányul. Környezeti stresszek hatására értéke csökken, ez a hatás a tilakoidok károsodásával magyarázható.

F_v/F_m: tájékoztat az úgynevezett kvantumhatásfokról a fotoszintézis fotokémiai szakaszában. Ennek az aránynak a csökkenése jó indikátora a különböző környezeti stresszfolyamatok által - szárazság, hő, hideg, magas intenzitású fény, sóstressz, nehézfémek - előidézett fotoszintetikus aktivitás gátlásának.

F_m/F₀: szintén a kvantumhatásfok egyik mutatója, értéke leginkább a vízpotenciáltól függ. Szárazságstressz hatására értéke lecsökken, ez azonban a vízpotenciál növekedésével helyreállítható (Krause és Weiss 1991, Laskay és Lehoczki 1989).

2.1.6. A krómról általában

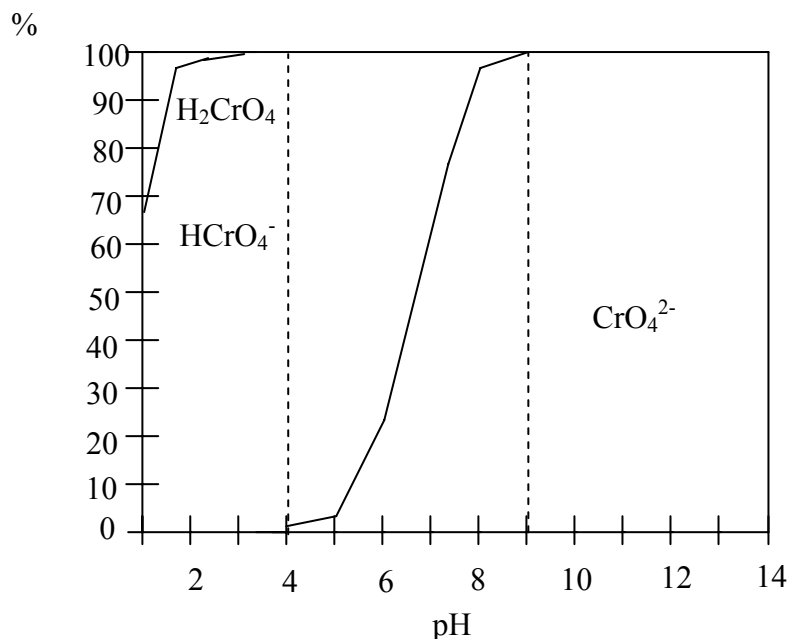
A króm fényes, ezüstfehér, kemény és rideg fém, a periódusos rendszer d-mezőjében található. Rendszáma 24, atomtömege 51,996, sűrűsége 7,2 g cm⁻³, olvadáspontja 1857°C, forráspontja 2672°C (Kotás és Stasicka 2000). 1798-ban fedezte fel a francia Vauquelin a Szibériából származó vörösólomérc vizsgálatakor, elnevezését ragyogó fényes színéről kapta (Losi et al. 1994). A földkéregben a 21. leggyakoribb elem (Krauskopf 1979), a földkéreg mintegy 0,0083%-át alkotja, kontinentális talapzatokban átlagosan 125 mg kg⁻¹ az előfordulási aránya a National Academy of Sciences USA (1974) alapján. Bizonyos szerpentin anyagközetekben koncentrációja elérheti a 125 000 mg kg⁻¹ értéket is (Adriano 1986).

Elemi állapotban nem, csak vegyületeiben található meg. A d-mező elemeinek többségéhez hasonlóan különböző oxidációs állapotokat vehet fel - 2, 3, 4, 5, 6 - ,de a természetben csak a Cr(III) és a Cr(VI) vegyületek stabilak (Saleh et al. 1989).

A Cr(VI) formák nagy része a környezetben ipari tevékenység eredményeként jelenik meg, fő forrása a kromit, amit ferrokromitnak, vagy krómvaskőnek is neveznek. Ideális összetétele FeCr_2O_4 de előfordulási helyenként integránsan előfordulhat benne Mg és Al is, ekkor $[(\text{Fe},\text{Mg})\text{O}(\text{Cr},\text{Al},\text{Fe})_2\text{O}_3]$ összetétellel jellemezhetjük. A világ éves krómércstermelése mintegy 11 megatonna, melynek zömét Dél-Afrikában, Zimbabweban, Oroszországban, Albániában és Indiában bányásszák, az évente feldolgozott mennyiség folyamatosan növekszik (Kotás és Stasicka 2000). A legnagyobb felhasználók a galvánipar, kerámiaipar, kohászat, mágneses szalaggyártók, bőripar és festékipar. Ezek az iparágak a legnagyobb kibocsátók, jelentős mennyiségű szennyvizükkel, nagy mennyiségű krómot is juttatnak a környezetbe (Langard 1980).

A különböző krómformák megtalálhatók a talajban, a vizekben, sőt a levegőben is. A levegőben található króm mintegy 60%-a antropogén, a többi természetes eredetű (vulkánkitörések, erdőtüzek, stb.). Gázállapotú krómforma az atmoszférában nem található, a króm a légköri aeroszol szilárd vagy csepprészecskéihez kötődik. A $2\ \mu\text{m}$ és annál kisebb átmérőjű részecskék nagy távolságot is megtehetnek, melyek belélegezve és a tüdőben visszamaradva rákot okozhatnak (Kotás és Stasicka 2000).

A vizek krómtartalma a levegőből kiülepedő porból, kőzetek mállásából és a kibocsátott szennyezésektől ered. Az édesvizek krómtartalma $0,1\text{-}800\ \mu\text{g dm}^{-3}$ között található, szennyezett területeken ettől magasabb értékek is előfordulnak (Gaines 1988). A természetes vizekben a Cr(III) és a Cr(VI) stabilis. A 4. ábra a Cr(VI) formák jelenlétét mutatja a természetes vizekben.



4. ábra. Króm(VI) formák előfordulása vizes oldatokban pH 1-14 tartományban
 A szaggatott vonalak a természetes vizek pH tartományát jelzik
 (Tandon munkája alapján 1984).

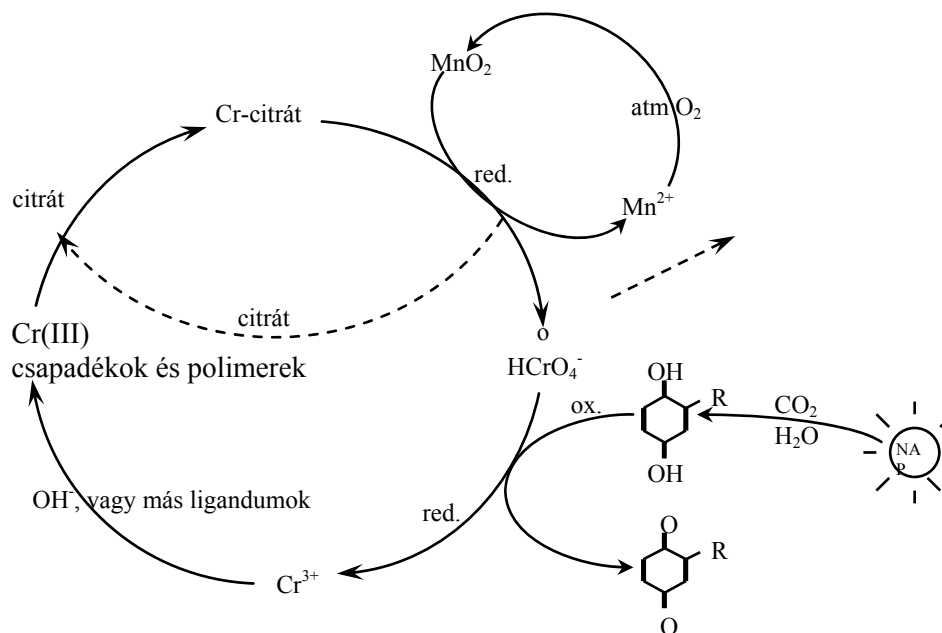
A talajok természetes krómforrását főképpen saját anyagközeteik képezik ezért a króm mennyisége a különböző talajokban igen eltérő. Az emberi közreműködéssel nem szennyezett talajok krómtartalma 10 mg kg^{-1} és 150 mg kg^{-1} között van, az átlag 40 mg kg^{-1} (Losi et al. 1994).

A két krómforma aránya a környezet fiziko-kémiai tulajdonságaitól, jelenségeitől függ (Mertz 1969). Oxigéndús környezetben és $\text{pH} \geq 7$ mellett a CrO_4^{2-} ionok, oxigénszegény környezetben és $\text{pH} \leq 6$ értéknél a Cr(III) ionok jelenléte várható. Átmeneti pH tartományban a Cr(III)/Cr(VI) aránya függ az oxigénkoncentrációtól, valamint a jelenlevő redukáló - Fe(II) - és esetleges oxidáló ágensek - mangán oxidok - jelenlététől (Schroeder és Lee 1975, Pettine et al. 1998). A felszíni levegőzött, magasabb oxigéntartalmú vizek kivételével a Cr(VI) csak alacsony pH-n jelenik meg H_2CrO_4 formában. A toxikusabbnak tekintett Cr(VI) formák előfordulását a 4. ábra mutatja. A természetes vizek normális pH-Eh tartományában a Cr(III)

hidroxokomplex, szerves komplexek, és $\text{Cr}(\text{OH})_3$ csapadék formájában fordul elő (Rai et al. 1989). A komplexképződés csökkenti a csapadékkiválás lehetőségét. A szerves komplexek nehezebben oxidálódnak, mint a hidroxokomplexek (Rai et al. 1989, Stein és Schwedt 1994).

A talajok krómtartalma zömmel az anyaközetek mállásából származik, amit növelhetnek a levegőből kiülepedő és kimosódó részecskék és az ipari tevékenység során keletkező krómtartalmú hulladékok. Semleges pH-jú talajban a Cr(III) legnagyobb része hidroxid csapadék formájában fordul elő, melynek mozgékonyasága kicsi és a növények számára sem felvehető. Savas talajokban, $\text{pH} < 4$ mellett $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ illetve a CrOH^{2+} .aq jellemző (Bartlett és Kimble 1976 a,b). A Cr(VI) semleges és lúgos talajokban általában a jól oldódó Na_2CrO_4 formában található, de előfordulnak a rosszabbul oldódó alkáliföldfém- és Pb-kromátok is. A CrO_4^{2-} és HCrO_4^- redukciós lehetőségei és katalizátorai hasonlóak a vízi környezetben leírtakhoz, fordított irányban itt is a mangán(III, IV) oxidok, hidroxidok katalizálnak (Eary és Ray 1987, Makino et al. 1998). Az 5. ábrán a króm természetes körforgásának vázlata található.

A levegő króm tartalma szintén széles skálán mozog. Pacyna és Nriagu (1988) az Anktartisz, Grönland és a norvég északi-sark levegő króm tartalmát vizsgálva a következő eredményt kapták: 5.0×10^{-6} és $1.2 \times 10^{-3} \mu\text{g m}^{-3}$. Ez a króm olyan természetes forrásokból származik, mint a vulkánkitörések és a szél által odafújott szennyezés, melynek mennyisége külön-külön, évi 3.9×10^3 és 50×10^3 tonna.



5. ábra. Króm-ciklus a természetben (Bartlett munkája alapján 1991)

2.1.7. Króm és mikroorganizmusok kölcsönhatása

A króm toxikusságára utaló első jelek a laboratóriumi edények tisztítására használt króm-kénsav használata során merültek fel. Az így tisztított edényekben nevelt baktériumtenyészetek növekedése gátolt volt számos öblítés után is (Hervey 1949).

A természetben lezajló Mn-katalizált oxidáció mellett nagyobb súllyal bír a Cr(VI) - Cr(III) átalakulás. Anaerob viszonyok mellett a mikroorganizmusok által végrehajtott redukció nem valószínű, itt a Fe(II) és különböző szulfidok szerepe jelentős. Aerob környezetben azonban a mikrobiális redukció szerepe döntő, amelyre számos baktérium - *Pseudomonas* (Bopp és Ehrlich 1988, Horitsu et al. 1987), *Aeromonas* (Kvasnikov et al. 1986), *Enterobacter* (Ohtake et al. 1987.), *Bacillus* (Eliseeva et al. 1991) nemzetség fajai - képesek. Szulfátredukáló baktériumok vizsgálatakor szintén figyeltek meg króm(VI) redukciót (DeFilippi és Lupton 1992), azonban speciális kromát reduktáz nem volt kimutatható. Algákkal végzett remediációs kísérletek során az inkább jellemző bioszorpció mellett bioredukciót is megfigyeltek *Chlamydomonas*

ssp. esetében (Ayoub és Sayigh 1987). A megjelent publikációk alapján kromát redukció mind aerob, mind anaerob környezetben végbemehet, azonban nincsenek bizonyítékok arra vonatkozóan, hogy a kromát elektronakceptorként részt venne az energiatermelés folyamatában.

A reduktáz aktivitás mértéke csoportonként rendkívül nagy eltéréseket mutathat. A bakteriális kromátredukció a sejt két frakciójához köthető. Egyes törzsekben a membránkapcsolt elektrontranszportlánc tehető felelőssé, mely tagjai citokrómok, kinonok, és flavoproteinek. A membránkapcsolt reduktáz aktivitásért felelős fehérjét (fehérjéket) azonban nem sikerült izolálni, működésük feltétele minden esetben a membrán integritása volt (Myers et al. 2000). Más törzsekben a reduktáz aktivitás vízoldható fehérje frakciókhoz köthető. A tisztított, illetve részlegesen tisztított enzimekre általánosan jellemző, hogy több alegységből - 2-3 - épülnek fel, a monomerek molekulatömege 20-25 kDa-nak, míg az aktív enzim molekula 50-60 kDa-nak adódott (Park et al. 2000). Bár a vizsgált enzimek mindannyian a Michaelis-Menten kinetikát követik, paramétereikben, hőmérsékleti optimumokban, felhasznált elektrondonor vonatkozásában jelentős eltérések figyelhetők meg.

2.1.8. A króm hatása a fotoszintetizáló élőlényekre

A toxikus nehézfémek és a növények kölcsönhatásával számos publikáció foglalkozik (Samantaray et al. 1998). Érthető módon - oldhatósági tulajdonságok és élettani vonatkozások miatt - a megjelent közlemények zöme a klasszikusan toxikus nehézfémek (Cu, Zn, Pb, Cd és Hg) által okozott problémákat vizsgálja. Kevesebb figyelmet kaptak azok a fémek (Al, Ga, Ti, Co, Ni, Zr) melyek toxicitása kevésbé nyilvánvaló, vagy hiánytünetei nincsenek. Ide tartozik a króm is, melynek toxikusságára már az 1960-as évek elején felfigyeltek. Az akkor még kevésbé nyilvánvaló, illetve kevésbé elemzett környezeti problémák miatt azonban kevés kutatócsoport tartotta napirenden a témakör kutatását. Az érdeklődés az utóbbi másfél évtizedben nőtt meg a téma iránt, miután tisztázódott, hogy a $\text{Cr(III)} \leftrightarrow \text{Cr(VI)}$ átalakulás mind vízi, mind szárazföldi környezetben végbemehet.

2.1.9. Króm hatása zöldalgák és a hajtásos növények növekedésére

A krómot sohasem tekintették esszenciális elemnek a növényi növekedés szempontjából, bár néhány esetben pozitív változásokat

tapasztaltak a szerves anyag, vagy a felvett nitrogén mennyiségében (Leroux 1941). Egyes megfigyelések szerint a króm alacsony koncentrációban elősegítette a növények növekedését, de magasabb koncentrációkban határozottan gátló hatás volt tapasztalható (Watanabe 1984, Samantaray és Das 1991). Zabon, uborkán, paradicsomon és burgonyán végzett korai kísérletek során 5-100 mg dm⁻³ Cr(VI) hatására vasklorózishoz hasonló klorotikus tünetek léptek fel, egyben tisztázódott, hogy a Cr(VI) toxikusabb a Cr(III)-nál (Hunter és Vergnano 1953).

Hasonló megfigyeléseket végeztek dohány és kukorica (Soane és Saunde 1959), valamint bab (Barcelo et al. 1985) növényen. Folyadékultúrában tartott rizs nagyobb - 60 mg dm⁻³ - koncentráció esetén három nap alatt elpusztult (Samantaray et al. 1996). Szintén rizsszel végzett kísérletek igazolták először, hogy krómkezelés hatására a gyökérmegnyúlás nem korrelál a hajtásmegnyúlással, hosszú idejű kezeléseknél csökken a gyökér/hajtás arány, megváltozik a gyökérszövet architektúra: csökken a laterális kiterjedés, sűrűbb, kompaktabb a gyökérrendszer, a gyökérszőrök sűrűsége csökken (Samantaray et al. 1996). A szuberizáció miatti gyökérbarnulás is a magasabb fémkoncentráció következményeként jelent meg. A stresszelt növények vízfelvételi problémái - gátolt vízáramlás a gyökérbe és a gyökéren belül is - a redukált gyökérszövetre voltak visszavezethetőek (Samantaray et al. 1996). Borsóval végzett kísérleteknél a kezelt növények hüvelyei kevesebb és kisebb számú szemet tartalmaztak (Bishnoi et al. 1993). Már alacsony koncentrációjú (0,1-5 mg dm⁻³) Cr(VI) kezelés hatására is növekedésgátlás volt tapasztalható *Lemna gibba* L. esetében (Oláh et al. 2004).

A alga-nehézfém kölcsönhatás vizsgálatok jelentős múltra tekintenek vissza. A krómmal kapcsolatos kísérletek a 70-es években kezdődtek, amit hosszabb szünet követett, de az érdeklődés az utóbbi néhány évben megnövekedett. Meisch és Schmitt-Beckmann különböző összetételű Cr(III) és Cr(VI) vegyületek hatását vizsgálták egy laboratóriumi és egy vad *Chlorella* törzsön. Alacsony koncentrációk esetében (0,1-0,5 mg dm⁻³) mind a növekedést, mind a fotoszintetikus aktivitást serkentő hatásról számoltak be, míg magasabb koncentrációknál a sejtszaporodás és a sejtméret csökkenését illetve a klorofill szintézis gátlását figyelték meg (Meisch és Schmitt-Beckmann 1979). *Glaucocystis nostochinearum* esetében az EC₅₀ érték 1 mg dm⁻³ értéknek adódott, atomabszorpciós vizsgálatokkal nagymértékű króm felhalmozódást észleltek (Rai et al. 1992). A fémakkumuláció és a toxicitási tünetek - klorofill koncentráció, protein tartalom, nitrát reduktáz aktivitás - koncentrációfüggőnek bizonyult (Rai et al. 1992). Több toxikus nehézfém (Cu, Cr, Ni) egyéni és kombinált

hatásvizsgálatánál szinergisztikus hatásokat figyeltek meg a *Chlorella pyrenoidosa* 251 növekedésében, fotoszintetikus aktivitásában és klorofill szintézisében. A vizsgált algafaj esetében használt nehézfémek egyéni alkalmazásánál a toxikusság a Cu, Cr, Ni irányban csökkent (Wong és Chang 1990).

2.1.10. Króm felvétel és eloszlás növényekben

A nehézfémekkel szennyezett talajok okozta toxicitási problémák és az erre alkalmas vizsgálati módszerek fejlődése miatt dinamikusan növekszik a növények által felvett nehézfémek mennyiségének és eloszlásának vizsgálata, különösen a mezőgazdaságban termelt növények esetében. Különböző fajok esetében az akkumulált króm mennyisége rendkívül eltérő. A felvett króm mennyisége függ a talaj krómkoncentrációjától (Cary és Kubota 1990). Főleg mezőgazdasági szempontból hasznos növényeken végzett mérések azt bizonyítják, hogy az átlagos krómtartalom 0,01-0,5 mg kg⁻¹ között állapítható meg, mungóbabbal és dohánnyal végzett kísérletekben - szennyezett talajok esetén - mértek 70-200 mg kg⁻¹ értéket is (Soane és Saunder 1959, Samantaray és Das 1997).

Az akkumulált króm nagy része a gyökérben található, kevésbé transzportálódik a hajtásba (Moral et al. 1994, Samantaray és Das 1997), feltehetően amiatt, mert a gyökérsejtek vakuolumaiban lokalizálódik (Barcelo et al. 1985). Hasonló eredményeket értek el folyadékkultúrák kísérletekben is több növény esetében (Moral et al. 1996). Mangi és társai zöldalga fajok és *Lemna minor* növekedését vizsgálták Cr(VI) jelenlétében. A növekedésgátlás mellett nagymértékű krómakkumuláció volt megfigyelhető mind az élő, mind pedig a már elpusztult (bioszorpció) növények esetében (Mangi et al. 1978). Különböző fémionok (Cd, Cr) interaktív toxikus hatásának vizsgálata *Chlorella ellipsoidea*-n koncentráció és időfüggőnek bizonyult. A nehézfém akkumuláció a két toxikus nehézfém egyidejű jelenlétekor szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a külön-külön alkalmazásnál (Okamura és Aoyama 1994).

2.1.11. Króm hatása fotoszintetizáló szervezetek anyagcsere folyamataira

Előfordulási gyakoriságuk, néhányuk esszenciális szerepe miatt nagyszámú publikáció foglalkozik a nehézfémek biokémiai, élettani

tulajdonságaival. Bár számos szerző számolt be a króm stimulatív hatásáról, mindezidáig nem született olyan publikáció, amelyik határértéket állapított volna meg krómszükséglet vonatkozásában (Soane és Saundeer 1959, Turner és Rust 1971). A nehézfémek felvehető formái lecsökkentik a fotoszintetikus elektrontranszportot illetve a nettó fotoszintetikus hatékonyságot (Van Assche és Clijsters 1988).

Króm kezelés után néhány órával *Anabaena doliolum* kultúrákban a fotoszintetikus aktivitás mellett, megváltozik egyes tápanyagok felvétele és irreverzibilisen megszűnik a nitrogénáz aktivitás is (Dubey és Rai 1987, Rai és Dubey 1988, Mallick és Rai 1990). Klorofill fluoreszcencia vizsgálatok adatai alapján - Cr(VI) kezelés hatására - csökkent a *Lemna gibba* fotoszintetikus hatékonysága (Oláh et al. 2004). Cr(VI) hatására bab levelekben megváltozott mind az elemösszetétel, mind pedig a fotoszintetikus pigmentek összetétele, egyik lehetséges magyarázataként a klorotikus tünetek kialakulásának (Barcelo et al. 1986). A lipokinon és pigment szintézis gátlásáról, csökkent klorofill tartalomról több szerző is beszámol krómkezelés hatására (Krupa et al. 1982, Samantaray et al. 1996). Egymásnak némileg ellentmondó eredmények születtek ^{14}C izotópos kísérletekben. $50\ \mu\text{g dm}^{-3}$ - $10\ \text{mg dm}^{-3}$ koncentrációban adagolt Cr(VI) mellett Guillizoni és munkatársai gátolt fotoszintézisről (1984), ugyanakkor Porter és Franco fotoszintetikus aktivitás növekedéséről számoltak be (1991).

2.1.12. Króm tolerancia növényekben

A növényi nehézfém tolerancia sokat tanulmányozott terület az utóbbi években, de a króm tolerancia vizsgálata a kezdeteknél tart. A legjobb eszközök a toxicitás, illetve a tolerancia fiziológiai tanulmányozására közeli genotípusok. Rout és munkatársai (1997) nyolc mungóbab (*Vigna radiata* L.) tenyészetet vizsgáltak különböző Cr(VI) koncentrációjú tápoldatban. Mérték a csírázás hatékonyságát, a gyökér és a szár megnyúlását és a képződő biomassza tömegét. A króm, bár mind a nyolc tanulmányozott esetben befolyásolta a mért paramétereket, azt tapasztalták, hogy egyes fajtáknál serkentette a gyökér megnyúlást (TARM-22 and K-851) míg más fajtáknál (PDM-54, Sujata, TARM-21, LGG-407, and PDM-116) ellentétes hatást fejtett ki. A króm különböző mértékben befolyásolta pl. a szár megnyúlását is. Számos toleranciamechanizmus vetődött fel magyarázatként, beleértve az intracelluláris fémkötő komponensek mintázatváltozását, valamint a megváltozott sejtfal-, membránszerkezetet és metabolizmust. A tolerancia

pontos biokémiai és élettani magyarázata még várat magára. Valószínűleg növényfajonként és változatonként más-más gének vezérik, különböző biokémiai utakat használva. Króm toleráns növényeknek képesnek kell lenniük megakadályozni a szükséges króm feletti mennyiség felvételét, illetve detoxifikálni azt, az esetleges felvétel után (Verkleij és Schat 1990, Moral et al. 1994, 1996).

3. Anyag és módszer

3.1. Vegyszerek

Az alगतáptalaj készítéséhez a Magyarországon kereskedelmi forgalomban kapható legnagyobb tisztaságú (alt.) vegyszereket használtuk fel. A szilárd táptalajhoz szükséges Bacto-agart a Difco Co.-tól (USA), az enzimaktivitás mérésekhez, HPLC vizsgálatokhoz szükséges finomvegyszereket a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, USA), a Merck Co.-tól (Darmstadt, Németország), a Serva Fine Biochem. GmbH-től (Heidelberg, Németország) szereztük be.

3.2. Algatenyésztet-algatenyésztés

Vizsgálatainkhoz *Chlorella pyrenoidosa* (IAM-128) zöldalgát használtunk a Tokiói Egyetem Mikrobiológiai Tanszékének gyűjteményéből. Az algasejteket szilárd táptalajon tartottuk fenn a sterilitás megőrzésével. Az algasejteket 500 ml-es, speciális alganevelő edényekben tenyésztettük módosított C-30 folyékony, steril táptalajon 25°C-on. A tápoldat összetétele a 2. számú táblázatban található. A mikroelemeket az előre elkészített törzsoldatból adtuk a tápközeghez.

2. táblázat. Az algatenyésztéshez használt C-30 tápoldat összetétele
(Az adatok 1 dm³ oldat elkészítésére vonatkoznak)

KNO ₃	2,02 g
KH ₂ PO ₄	0,113 g
K ₂ HPO ₄	0,087g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,24 g
CaCl ₂ x6H ₂ O	0,037 g
NaHCO ₃	1,0 g
Fe (Fe ²⁺ -EDTA formában)	5 mg
H ₃ BO ₃	1,43 mg
MnCl ₂ x4H ₂ O	0,905 mg
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,111 mg
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,0395 mg
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,0126 mg
NH ₄ VO ₃	0,0115 mg
Co(NO ₃) ₂ x6H ₂ O	0,0245 mg

Az algákat fehér, fluoreszcens fényvel világítottuk meg $50 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ és 5% CO_2 tartalmú, steril levegővel buborékolattuk át, amely egyrészt szénforrásként szolgált, másrészt segített biztosítani az alga szuszpenzió homogenitását. A tápoldat pH-ja 7,2 volt (Simon et al. 2001). A C-30 tápoldatban a különböző foszfátformák egyben pufferként is viselkedtek.

3.3. Algatenyészet Cr(III) és Cr(VI) - ionnal történő kezelése

A Cr(III)-ként $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ -ot, míg Cr(VI) vegyületként Na-dikromátot ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) használtunk. Amikor a növekvő algatenyészetek elérték a 10^5 dm^{-3} sejtszámot a tápoldatban az algákat $0,1\text{-}50 \text{ mg dm}^{-3}$ Cr(III) és Cr(VI)-ionnal kezeltük előre elkészített törzsoldatok segítségével. Minden kísérlethez kezeletlen kontroll tenyészetet neveltünk azonos körülmények között. A kezeléseket követően 48-72 órán neveltük az algákat.

3.4. Az algasejtek szaporodásának vizsgálata

Az algasejtek növekedését több módszerrel vizsgáltuk:

- a./ közvetlen sejtszámlálással citométerrel,
- b./ alacsony sejtszám esetén 600 és 660 nm-en tájékozódó méréseket végeztünk fotometriás úton (Rodrigues és Lopez 1964). Vizsgálatainkhoz a centrifugálással összegyűjtött algákat ($3000\text{g} \times 10$ perc) kétszer mostuk ionmentes vízben (újrászuszpendálás, centrifugálás). A szárazanyag tartalom meghatározását 90°C -on 24 órán keresztül, súlyállandóságig történő szárítás után végeztük.

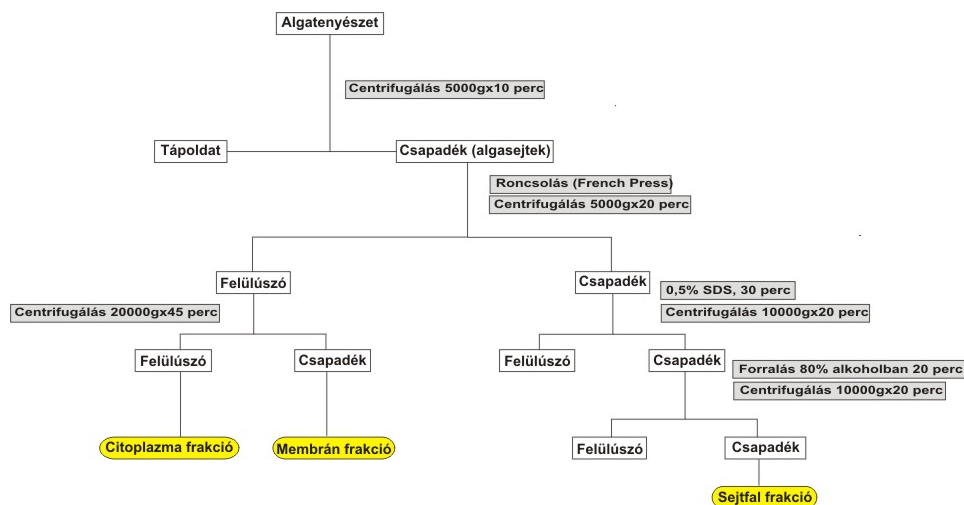
3.5. Algasejtek frakcionálása és elemösszetételének meghatározása

A frakcionálásához az algasejteket centrifugálással összegyűjtöttük ($5000\text{g} \times 10$ perc) ionmentes vízben kétszer mostuk, majd tömegüket megmértük. Ezt a mintát ép, teljes sejtnek tekintettük (1. minta). Az így előkészített minta egy másik részét French Press-szel roncsoltuk (1500 kgf cm^{-2}) háromszor. A French Press a legalkalmasabb eszköz a Chlorella sejtek mennyiségi vizsgálatokhoz történő feltárására (Takeda és Hirokava 1984). Ezután a homogenizátumot centrifugáltuk ($5000\text{g} \times 20$ perc), majd az üledékhez 1 ml 0,5%-os Na-lauril-szulfátot (továbbiakban SDS) adtunk és kevertettük 20 percig. Az SDS-sel kezelt szuszpenziót újra

centrifugáltuk (10 000g x 20 perc), hogy eltávolítsuk a sejtfalhoz kötődő oldható komponenseket. Az így kapott üledéket 20 percig forraltuk 80%-os etil-alkoholban. A sejtfal frakciót a centrifugált (10 000g x 20 perc) etanos oldat csapadékaként kaptuk meg (2. minta). A French Press-szel történő roncsolás utáni felülúszót újra centrifugáltuk (20 000g x 45 perc) és az így kapott üledéket (3. minta) mint membrán-, míg a felülúszót, citoplazmatikus frakciónak (4. minta) tekintettük (Okamura és Aoyama 1994). A sejtfractionálás lépéseit a 6. ábrán láthatjuk.

A felülúszók víztartalmát elpárologtattuk, majd a mintákat 24 órán keresztül kezeltük koncentrált HNO₃ és 30%-os H₂O₂ (6:1 V/V arány) elegyében. Az így kapott mintákat beszárítottuk, majd a maradványokat újraoldottuk 5 ml 2N HNO₃ oldatban.

Az elemösszetételt Spectroflame típusú induktívan kapcsolt plazma atomemissziós spektrofotométerrel (ICP-AES) (Spectro Gmbh Kleve, Németország) mértük a következő paraméterekkel: plazma gáz 1.6 dm³ min⁻¹, nebulizáló gáz 0,6 dm³ min⁻¹, hűtőgáz 15 dm³ min⁻¹, gerjesztés 27 MHz, 1.05 kW keresztáramú nebulizer (Hörscik et al. 2006).



6. ábra. Algasejtek frakcionálásának vázlata elemösszetétel meghatározásához

3.6. Fotoszintetikus pigment vizsgálatok

Az algatenyészetek és az izolált tilakoidok klorofill koncentrációját Arnon (1949.) módszerével határoztuk meg. A klorofillt 80%-os acetonnal vontuk ki a mintákból. A klorofill koncentrációt az acetonos kivonatnak 663 és 644 nm-nél, az oldószerrel szemben mért abszorpciójából számoltuk ki.

A különböző fotoszintetikus pigmenteket és származékaikat HPLC technikával vizsgáltuk. A pigmenteket kloroform-aceton-izopropil alkohol (2:1:1 V/V) elegyével vontuk ki 4°C-on (Simon et al. 1988, 1989). A WATERS HPLC rendszerben C18, 10 µm, 250 x 4,6 mm oszlop (Labor MIM, Magyarország), izopropil alkohol-acetonitril-víz (60:35:5 V/V) mobil fázis, 1 cm³ min⁻¹ áramlási sebesség, 440 nm és 660 nm detektálási hullámhossz paraméterekkel dolgoztunk. A többcsatornás detektor lehetővé tette a klorofilok és karotinoidok egyidejű meghatározást. A karotinoidok és a xantofilok nem adnak jelet 660 nm-en, a klorofilok viszont mind a két hullámhosszon vizsgálhatók, spektrális karakterisztikáikat felhasználva a különböző színanyagok és származékaik könnyen azonosíthatóak voltak.

3.7. Mintaelőkészítés a szabad aminosav analízishez

A szabad aminosavakat a mintákból 7%-os triklór-ecetsavval, rázatással extraháltuk két órán keresztül. 200 mg frissen centrifugált algatömeghez 2 ml extrahálószerrel használtunk. Ezután szűrőpapíron és membránszűrőn átszűrtük (Sartorius 0,45 µm). Az analízist a folyadékfázisból végeztük.

3.7.1. Aminosav analízis

Az aminosav tartalmat ioncserélő folyadékkromatográfiával határoztuk meg BIOTRONIC LC 3000 típusú (Németország) aminosav analizátor segítségével. A kromatográfias paraméterek: BTC 2410 kationcserélő töltet (125 x 4 mm), reaktorhőmérséklet: 135°C, eluens áramlási sebessége: 0,20 ml min⁻¹, ninhidrin áramlási sebessége: 0,20 ml min⁻¹, detektálás: 570 és 440 nm, minta térfogata: 20 µl, Biotronic 4-pufferrendszer (A, B, C, D) (Galiba et al. 1992).

3.8. Fotoszintézis vizsgálatok

Az oxigénfejlődés sebességét Clark-típusú oxigén elektróddal (Hansatech, Kings Lynn, England) mértük a nevelőközegben, 10-20 $\mu\text{g dm}^{-3}$ klorofill koncentrációjú intakt alga sejteken, 25°C-ra termosztált mintatartóban, telítési fényintenzitáson, fehér fényben. A PSII aktivitását 500 μM fenil-p-benzokinon jelenlétében vizsgáltuk.

A fluoreszcencia indukciót szobahőmérsékleten PAM-2000 típusú klorofill-fluorométerrel (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) határoztuk meg. 2 ml 10-20 $\mu\text{g dm}^{-3}$ klorofill koncentrációjú, közvetlenül a tenyésztő edényből kivett mintát pipettáztunk a mintatartóba, amelyet egy optikai vezető kapcsolt össze a fluorométer ED 101 emitterdetektor egységével. Az F_0 értéket 5-30 perc sötétadaptálás után, gyenge 1.6 kHz-cel modulált vörös fényvel mértük. Az F_m értéket 0,4 s hosszú, erős, telítési fehér fényimpulzussal határoztuk meg. A Kautsky görbe felvételéhez és paramétereinek meghatározásához a nevelőfényvel azonos 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aktinikus fényvel világítottuk meg a mintát 5 s hosszan, az F_0 szint meghatározását követően.

Másik módszer esetében a nevelőedényből kivett algasejteket (2 ml 10-20 $\mu\text{g dm}^{-3}$ klorofill koncentrációjú) egy speciális üveghártyára szűrtük (0,45 μm membrán filter), majd 5-30 perc sötétadaptáció után a fent leírtak szerint mértük. A mérőszál és az algával borított üveghártya közötti távolság 5 mm volt.

3.9. Szénhidrát-anyagcsere szabályozással kapcsolatos mérések

Az összegyűjtött *Chlorella pyrenoidosa* sejteket desztillált vízzel mostuk, majd ismételt centrifugálás után azonnal felhasználtuk a kivonatok készítéséhez. Az algaszuszpenziót hűtött dörzsmozsárban az adott enzimnek megfelelő puffer és kvarchomok segítségével feltártuk. A sejtörmelékét centrifugálással távolítottuk el Janeczky K-24 centrifugában (10 000g x 30 perc). Az így kapott felülúszót polietilén-glikollal (továbbiakban PEG) frakcionáltuk, majd az így kapott oldatokat használtuk az enzimaktivitás mérésekhez.

A cukormeghatározáshoz a PEG-gel még nem kezelt kivonatot használtuk, HPLC technika alkalmazásával, Sarasep Polymer H oszlopon, Shodex RI refraktív index detektorral. Eluens 0,01 n H_2SO_4 , 0,6 ml sec^{-1} sebességgel, 50°C-on. Az adatok kiértékelése Chromeleon kromatográfias

szoftverrel történt, a kalibrálást maltóz standardokkal végeztük. A keményítő meghatározást Rose módszerével végeztük (Rose et al. 1991).

Foszfofruktokináz (továbbiakban PFK) és pirofoszfát-fruktóz-6-foszfát-foszfotranszferáz részleges tisztításához (továbbiakban PFP) a lemért algatömeget pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,0; 10 % glicerin; 1 mM EDTA; 28 mM β -merkaptoetanol; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM Pi) 1:1 arányban feltártuk. A centrifugálás után kapott nyers kivonatot polietilénlikollal (PEG 6000) frakcionáltuk. Az részlegesen tisztított enzimeket használtuk az aktivitás mérésekhez (Kiss et al. 1989)

A fruktóz-1,6-biszfoszfátáz (továbbiakban FBP-áz) részleges tisztításához a lemért algatömeget pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10% glicerin; 1 mM EDTA; 28 mM β -merkaptoetanol; 5 mM $MgCl_2$) 1:1 arányban feltártuk. A centrifugálás után kapott nyers kivonatot polietilénlikollal (PEG 6000) frakcionáltuk. A 13–25% PEG 6000 telítés között kicsapódott anyagot centrifugálás után minimális térfogatú pufferben visszaoldottuk. Az így kapott részlegesen tisztított enzimet használtuk az enzimaktivitás mérésekhez.

Az enzim aktivitását kapcsolt enzimreakcióval határoztuk meg. A reakciórendszer a következő anyagokat tartalmazta: 50 mM Tris-HCl pH 7,9; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 0,1 mM $F_{1,6}P_2$; 1 mM NADP; élesztő glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 8,5 nkat, élesztő foszfo-glükóz izomeráz 8,5 nkat. A reakció előrehaladását a 340 nm-en mért abszorpcióváltozás alapján követtük nyomon.

3.10.A kataláz és a peroxidáz aktivitások mérése

0,2 g algatömeget 1 ml izoláló pufferben (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 3 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA) hűtött dörzsözősárban, jégen, kevés kvarchomokkal eldörzsöltünk. Hűtött centrifugában 10 000g x 10 perc centrifugálás után a felülúszót használtuk az enzimaktivitás mérésekhez. A minták Eppendorf-csövekben lefagyasztva hónapokig megtartották aktivitásukat. Az enzimaktivitásokat spektrofotometriás módszerrel mértük.

Guajakol-peroxidáz mérésnél a 3 ml végtérfogatú reakcióelegyek a következő anyagokat tartalmazták: 50 mM Tris HCl pH 7,4; 200 μ l 1%-os guajakol; 200 μ l 15 mM H_2O_2 ; 50 μ l növényi minta. A reakciók előrehaladását 480 nm-en követtük nyomon (Simon et al. 1989).

Kataláz mérésnél a 3 ml végtérfogatú reakcióelegyek a következő anyagokat tartalmazták: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 μ l növényi minta. 240 nm-en történő nullázás után a mintához 300 μ l H_2O_2 oldatot (0,1 M)

mértünk. A reakció előrehaladását 240 nm-en történő méréssel követtük nyomon.

Aszkorbát-peroxidáz mérésnél a 3 ml végtérfogatú reakcióelegyek a következő anyagokat tartalmazták: 50 mM Tris HCl pH 7,4; 0,2 mM aszkorbinsav; 50 µl növényi minta. 290 nm-en történő nullázás után a mintához 100 µl H₂O₂ oldatot (10 mM) mértünk. A reakció előrehaladását 290 nm-en történő méréssel követtük nyomon (Janda et al. 2000).

3.11. Fitokelatin szintáz (PC szintáz) enzimaktivitás mérés

PC szintáz enzimaktivitás méréséhez 0,2 g friss alगतömeget roncsoltunk kvarchomokkal dörzsoszárban, 1 ml kivonópuffer segítségével (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM β-merkaptotanol; 14 V/V% glicerin). Az eldörzsölt mintákat centrifugáltuk 13 000g x 5 percig 4°C-on. Az enzimaktivitás méréséhez 0,2 ml felülűszót használtunk.

A reakcióelegy: 200 mM Tris-HCl puffert (pH 8,5); 0,5 mM CdCl₂; 10 mM β-merkaptotanol; 10 mM glutationt és 0,2 ml növényi kivonatot tartalmazott, 0,3 ml végtérfogatban. A mintákat egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, majd 0,03 ml 50 %-os szulfoszalicilsavval (5-SSA) állítottuk le a reakciót. Kontrollmintánkat 0 időpontban inkubálás nélkül állítottuk le. A proteinek kicsapását jégen végeztük 10 percig. A HPLC-s vizsgálat előtt a kicsapott mintákat lecentrifugáltuk 13 000 rpm 5 percig 4°C-on, méréshez a felülűszót használtuk. A mintákat -20°C-on tárolva több hétig felhasználhattuk, a keletkezett termékek mennyisége nem változott.

3.12. Fitokelatin szintáz termékek HPLC-s analízise

A fitokelatinokat Li Crospher 100 (250 x 4 mm) RP18 (5µm) (Merck, Darmstadt, Németország) oszlopon választottuk el, szobahőmérsékleten. A oldat: 0,1%-os trifluor-ecetsav (TFA), B oldat: 0,1% TFA tartalmú acetonitril/víz 20:80 arányú elegye volt. Az oszlopot az A oldattal equilibráltuk, ezután 2,5 perc alatt a B oldat arányát 25 %-ra emeltük, majd újabb 15 perc alatt 100 %-ra. Az oszlopot 0,5 percig ebben az állapotban tartottuk majd teljesen lecseréltük A oldatra 1 perc alatt.

A következő injektálás előtt az oszlopot A oldattal equilibráltuk 4 percig. Az áramlási sebesség 1,5 ml min⁻¹ volt. Az oszlop után DTNB-vel termékeket képeztünk, amelyeket 410 nm-en detektáltunk UV/VIS detektorral. Az eredményeket glutation egyenértékben adtuk meg nmolban (Chen et al. 1997).

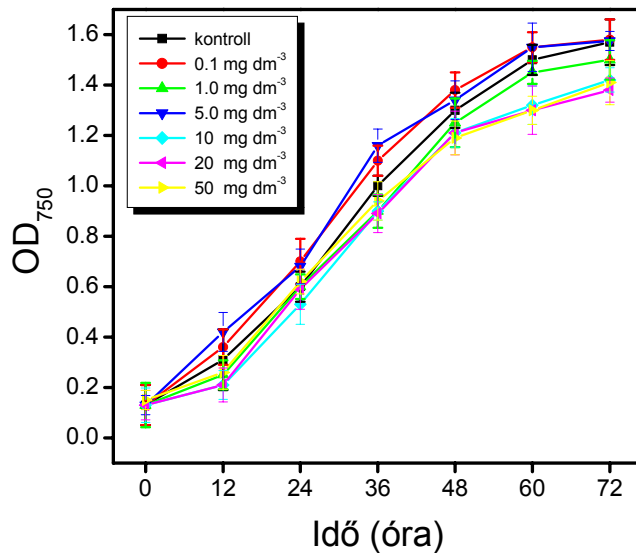
A fehérjemeghatározás Bradford módszerével történt három párhuzamos méréssel (Bradford 1976).

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. A króm hatása a *Chlorella pyrenoidosa* növekedésére

Kísérleteink első részében megvizsgáltuk a növekvő koncentrációjú Cr(III) és Cr(VI) hatását a *Chlorella pyrenoidosa* néhány növekedési paraméterére. Bár irodalmi adatokból tudtuk, hogy a Cr(VI) lényegesen toxikusabb, mint a Cr(III), ennek ellenére a $K_2Cr_2O_7$ mellett méréseket végeztünk $Cr_2(SO_4)_3$ -tal is. Zöldalgák és fotoszintetikus baktériumok növekedési rátája számos módszerrel mérhető, legelfogadottabbak ezek közül a sejtszámlálás, a 750 nm-en mért turbidometria, a 600 és 660 nm-en mért abszorbancia, az összes klorofill mennyiség és a szárazanyag tartalom.

Eredményeink azt mutatják, hogy a Cr(III) 0,1-10 $mg\ dm^{-3}$ koncentrációban nem befolyásolta jelentősen a zöldalgák növekedési paramétereit, illetve nem okozott szignifikáns eltérést a kontrolltól (7. ábra).



7. ábra. A Cr (III) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* növekedésére 72 órás kezelés után

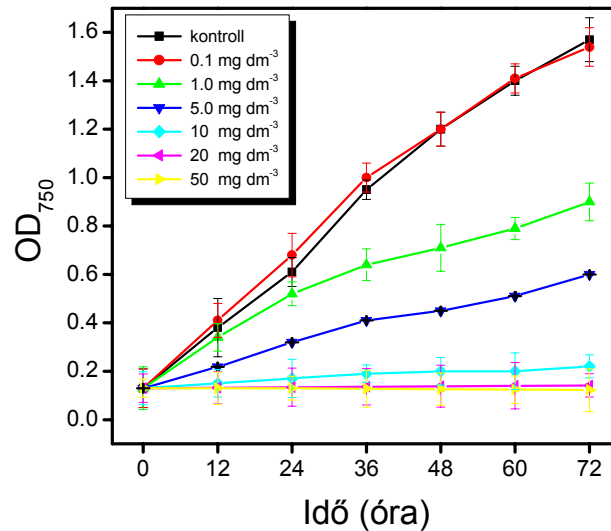
10-50 mg dm⁻³ koncentrációnál a növekedés bár némileg gátolt volt, a tenyészetből kivett sejteket normál táptalajra visszahelyezve azok a normál sejteknek megfelelően továbbszaporodtak. Mivel folyékony táptalajunk egyben pufferrendszerként is működött, a kezelések során nem változott meg lényegesen a tápoldat pH értéke a kezeletlen kultúrák növekedésénél mérhető - egyébként kismértékű - pH változásokhoz képest. Kísérleteink során mértük a szárazanyag tartalom és az összes klorofill mennyiségét is, ahol bár a szárazanyag tartalom változása kismértékű csökkenést, az összklorofill mennyisége pedig a magasabb koncentrációk irányában enyhe növekedést mutat, de a mért különbségek kevesebb, mint 5% eltérést mutatnak a kontrolhoz képest. Így ezt a változást nem tekinthetjük úgy, mintha a Cr(III) serkentené a klorofill szintézist. (3. táblázat).

3. táblázat. Kontroll és 0,1-50 mg dm⁻³ Cr(III) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek növekedési paraméterei
72 óra kezelés után (*) 48 óra kezelés után mért adatok, (): SE.

	Kontroll	0,1 mg dm ⁻³	1 mg dm ⁻³	5 mg dm ⁻³	10 mg dm ⁻³	20 mg dm ⁻³	50 mg dm ⁻³
OD₆₆₀	1,69 (0,08)	1,75 (0,012)	1,8 (0,09)	1,82 (0,06)	1,65 (0,11)	1,48 (0,23)	1,52 (0,21)
OD₆₆₀*	1,72 (0,13)	1,74 (0,09)	1,62 (0,12)	1,78 (0,14)	1,58 (0,17)	1,61 (0,16)	1,56 (0,18)
OD₇₅₀	1,55 (0,09)	1,58 (0,13)	1,5 (0,08)	1,64 (0,11)	1,43 (0,12)	1,37 (0,15)	1,41 (0,24)
Sejtszám	8,8x10 ⁶	9,0x10 ⁶	8,6x10 ⁶	8,8x10 ⁶	8,5x10 ⁶	8,2x10 ⁶	7,8x10 ⁶
Száraz- anyag g dm⁻³	0,92 (0,09)	0,98 (0,05)	1,02 (0,05)	0,86 (0,16)	0,94 (0,07)	0,92 (0,11)	0,88 (0,16)
Klorofill mg g⁻¹	5,21 (0,16)	5,05 (0,24)	5,12 (0,21)	5,25 (0,32)	5,36 (0,28)	5,41 (0,24)	5,44 (0,32)

Mérési eredményeink hasonlóak az irodalmi adatokhoz, ahol kevés kivételtől eltekintve a Cr(III) nem tekinthető toxikusnak növények számára (Samantaray et al. 1998). Ez a Cr(III) kémiai tulajdonságainak köszönhető, mivel a természetben előforduló pH viszonyok között különböző csapadékok formájában van jelen. Szárazföldi növények esetében a talajviszonyoktól és a gyökérszóna környezetétől függően a talaj elektrokémiai, pH és biotikus jellemzői lehetővé tehetik a Cr(III) → Cr(VI) átalakulást is, ahol a Cr(VI) forma már felvehető (Kotás és Stasicka 2000).

Cr(VI) kezelés hatására lényegesen drasztikusabb változások következtek be szinte minden mért paraméter vonatkozásában, de csak az édesvizekben általánosan előforduló Cr(VI) koncentrációt meghaladó kezelés esetén. A sejtszámlálási, az OD 600 nm és 750 nm-es adatokat vizsgálva (8. ábra és 4. táblázat) 0,1 mg dm⁻³ koncentrációjú króm kezelés esetén, szignifikáns eltérést nem tapasztalhatunk a kontroll és a kezelt minták között. Ennél a koncentrációnál nem volt különbség a szárazanyag tartalom, a klorofill és a sejtszám tekintetében. A króm(VI) koncentráció növekedése azonban jelentős csökkenést eredményezett mind a sejtsűrűség, mind a sejtszám vonatkozásában. A kontrollhoz képest, már az 1 mg dm⁻³ koncentráció esetében is szignifikáns változást okozott (p=0,00). A Cr(VI) hatása a sejtsűrűségre és a sejtszámról hasonló változásokat mutat, jelezve, hogy ezek a növekedési paraméterek jól korrelálnak. A Cr(VI)-ra számított EC₅₀ érték a kultúrák növekedésének gátlását figyelembe véve 2 mg dm⁻³-nek adódott (Hörcsik et al. 2006).



8. ábra. A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* növekedésére a kezeléstől számított 72 órában

Az összklorofill és a szárazanyag tartalom változása megerősíti az előző két mért paraméter által kapott adatokat (4. táblázat).

A 20-30-40-50 mg dm⁻³ koncentrációjú Cr(VI)-tal kezelt kultúrák klorotikus szimptomákat mutattak. Az 20-30-40-50 mg dm⁻³ koncentráció Cr(VI)-ot tartalmazó nevelőedényből 3 nap múlva kivett algasejtek nem szaporodtak tovább mikor friss - króm(VI)-ot nem tartalmazó - táptalajra helyeztük át őket. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a Cr(VI) letális koncentrációja 20 mg dm⁻³ *Chlorella pyrenoidosa* esetében.

A Cr(VI) toxikussága növényekre régóta közismert, az ezzel kapcsolatos mérési adatok azonban különböző növényfajok esetében nagy eltéréseket mutatnak és gyakran ellentmondásosak. Bizonyos esetekben 0,1 mg dm⁻³ alatti EC₅₀ értéket kaptak, de ez az érték 5 mg dm⁻³ is lehet (Cary és Kubota 1990). Az összes klorofill koncentrációjának a csökkenése a vizsgált növényfajok és minták többségében megfigyelhető (Oláh et al. 2004).

4. táblázat. Kontroll és 0,1-50 mg dm⁻³ Cr (VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek növekedési paraméterei 72 óra kezelés után (*) 48 óra kezelés után mért adatok, ():SE, nd.: nem detektálható.

	Kontroll	0,1 mg dm ⁻³	1 mg dm ⁻³	5 mg dm ⁻³	10 mg dm ⁻³	20 mg dm ⁻³	50 mg dm ⁻³
OD₆₆₀	1,54 (0,11)	1,48 (0,08)	0,84 (0,11)	0,56 (0,10)	0,19 (0,08)	0,12 (0,07)	0,07 (0,05)
OD₆₆₀[*]	1,68 (0,17)	1,71 (0,24)	0,78 (0,16)	0,41 (0,08)	0,17 (0,06)	0,14 (0,08)	0,08 (0,04)
OD₇₅₀	1,56 (0,10)	1,52 (0,11)	0,92 (0,17)	0,60 (0,14)	0,22 (0,06)	0,14 (0,07)	0,09 (0,05)
Sejtszám	7,8 x 10 ⁶	7,6x10 ⁶	3,8x10 ⁶	1,1x10 ⁶	3,5x10 ⁵	1,2x10 ⁵	1,1x10 ⁵
Szárz- anyag g dm⁻³	0,84 (0,04)	0,87 (0,09)	0,34 (0,11)	0,22 (0,03)	0,10 (0,03)	0,07 (0,01)	nd.
Klorofill mg g⁻¹	5,07 (0,11)	5,14 (0,19)	4,30 (0,17)	3,98 (0,38)	3,68 (0,29)	3,17 (0,27)	nd.

Chlorella pyrenoidosa növekedését vizsgálva már 0,1-0,5 mg dm⁻³ Cr(VI) koncentráció mellett gátló hatásról találunk megfigyeléseket (Wium-Andersen 1974), ugyanakkor Meisch és Schmitt-Beckmann (1979) 0,1-0,5 mg dm⁻³ koncentráció mellett a *Chlorella* tenyészetek gyorsabb növekedését és megnövekedett fotoszintetikus aktivitását mérte. Mérsékelten toxikus nehézfémek közé sorolták a Cr(VI)-ot abban a kísérletsorozatban, amelyben folyóvízi algákat és magasabbrendű növények (*Lemna minor*, *Lemna gibba*) növekedését vizsgálták 0,1-10 mg dm⁻³ Cr(VI) jelenlétében (Mangi et al. 1978, Oláh et al. 2004). *Glaucocystis nostochinearum* zöldalga növekedése 0,1-10 mg dm⁻³ Cr(VI)-ot tartalmazó tápoldatban szintén gátolt volt, a kalkulált EC₅₀ érték 1 mg dm⁻³ értéknek bizonyult (Rai et al. 1992) Hasonló értéket kaptak több

fémion - Cu(II), Ni(II), Cr(VI) - önálló és intermetallikus toxicitásának vizsgálatakor (Wong és Chang 1990).

4.2. Króm és mikroelem eloszlás a különböző sejtfrakciók között

Kísérleteinket folytatva arra voltunk kíváncsiak, milyen módon változtatja meg a Cr(VI) kezelés a zöldalga sejtek mikroelem-összetételét és ezeknek sejten belüli megoszlását.

ICP-AES méréseink során 21 elem (Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, Ti, V, Zn) mennyiségét határoztuk meg. Mértük az ép, roncsolatlan sejtek elemtartalmát, illetve frakcionáltuk azokat sejtfal, membrán, illetve oldható (ezt a komponenst zömében citoplazmatikusnak tekintettük) frakciókra. Kíváncsiak voltunk, hogy a *Chlorella pyrenoidosa* képes-e akkumulálni a krómot, illetve az akkumulált króm melyik sejtfrakciókban halmozódik fel.

Az 5. táblázat a vizsgált elemek mennyiségi megoszlását mutatja az intakt sejtben. A teljes sejtek elemtartalmát vizsgálva számos elem - Cr, Ca, Mg, Fe, Cu, Na, P, S - esetében mutatkoztak trendszerű eltérések a kontroll sejtekhez viszonyítva. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a növekvő koncentrációjú Cr(VI) kezeléssel párhuzamosan a Na és a P mennyisége kisebb, míg a Fe és a Mg mennyisége nagyobb mértékben csökken, ugyanakkor a Ca és a Cr esetében jelentős növekedés volt észlelhető a kontroll minta adataihoz képest. A kén esetében ettől eltérő jellegű változást tapasztaltunk. 5 mg dm⁻³ Cr(VI) koncentráció értékig a S mennyisége növekszik, magasabb kezelési koncentrációk esetében csökkenést tapasztaltunk.

5. táblázat. 0,1-20 mg dm⁻³Cr(VI) kezelés hatása a *Chlorella pyrenoidosa* mikroelem összetételére 72 óra kezelés után

Az adatok µg g⁻¹ értékben friss tömegre vonatkoztatva vannak megadva ():SE, nd.: nem detektálható.

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³	20 mg dm⁻³
Al	2,8 (0,1)	1,7 (0,1)	1,5 (0,2)	2,2 (0,1)	0,9 (0,1)	1,2 (0,1)
B	1,2 (0,2)	1,4 (0,1)	0,8 (0,2)	1,8 (0,2)	1,4 (0,1)	1,6 (0,1)
Ba	nd.	nd.	nd.	nd.	0,2 (0,1)	0,5 (0,1)
Ca	38 (1,0)	43 (4,5)	64 (5,0)	74 (4,2)	79,5 (4,2)	80,5 (7,8)
Cd	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Co	1,8 (0,1)	1,9 (0,1)	1,8 (0,2)	1,3 (0,1)	1,4 (0,2)	1,4 (0,2)
Cr	0,2 (0,1)	5,9 (1,8)	17 (1,8)	28 (3,6)	24 (3,8)	26,8 (3,1)
Cu	7,5 (0,8)	20,3 (0,7)	21,4 (1,9)	19,4 (1,2)	22,6 (1,1)	32,1 (2,4)
Fe	148 (4,0)	143,6 (12)	102 (4,8)	78 (8,1)	62 (5,1)	44 (11,3)
K	2123(117)	1879(213)	2233(188)	2144(55)	1887(244)	2042(187)
Mg	1423 (54)	1402 (35)	1116 (82)	981 (104)	981 (81)	955 (44)
Mn	32,2 (1,5)	24,5 (1,3)	27,5 (3,1)	34,0 (2,4)	41,7 (2,6)	26,4 (1,9)
Na	64,5 (5,2)	74,5 (6,4)	56,8 (4,3)	81,2 (12,5)	51,4 (6,5)	44,5 (7,9)
Ni	nd.	nd.	nd.	nd.	0,9 (0,2)	1,1 (0,1)
P	8325(248)	8666(311)	8023(256)	7222(324)	7008(228)	6775(458)
Pb	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
S	658 (23)	688 (55)	788 (69)	807 (61)	733 (76)	510 (88)
Sr	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Ti	0,31 (0,1)	0,41 (0,1)	0,44 (0,1)	0,27 (0,10)	0,33 (0,2)	0,42 (0,1)
V	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
Zn	48,1 (2,6)	47,5 (3,8)	55,9 (4,6)	68,3 (5,0)	51,3 (4,3)	59,3 (4,7)

Kutatócsoportunk, más mikroszervezetekkel végzett kísérleteiben Cr(VI) kezelés hatására néhány elem koncentrációja karakterisztikusan megváltozott (Vincze et al. 2004). A 6. táblázatban a króm mellett, a kalcium, a magnézium és a vas mennyiségi adatait találjuk. A táblázat adataiból kitűnik, hogy három napos tenyésztés után a közeg krómtartalma felhalmozódik az alga sejtekben. A kontroll és a kezelt sejtek mérési adatait összevetve a felvett króm zöme a sejtfaiban, mintegy 20-25%-a azonban a membrán frakcióban, illetve a sejtplazmában immobilizálódik (Hörsik et al. 2002).

6. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek és különböző sejtfrakciók elemösszetétele (Cr, Ca, Mg és Fe)

Az értékek $\mu\text{g g}^{-1}$ értékben friss tömegre vonatkoztatva vannak megadva.(.):SE, nd.: nem detektálható.

Cr tartalom				
	Kontroll	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
Alga sejt	0,2 (0,1)	17 (1,8)	28 (3,6)	24, (3,8)
Sejtfal fram.	0,2 (0,1)	14 (2,6)	28,8 (1,5)	31 (4,2)
Membrán fram.	nd.	2,5 (0,8)	4,1 (0,9)	2,1 (0,9)
Oldható fram.	nd.	2,1 (0,7)	3,4 (1,2)	2,8 (0,4)

Ca tartalom				
	Kontroll	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
Alga sejt	38 (1,0)	64 (5,0)	74 (4,2)	79, 5 (4,2)
Sejtfal fram.	45 (1,4)	60 (7,5)	77 (4,9)	81,2 (3,7)
Membrán fram.	4,8 (0,4)	1,4 (0,6)	6,4 (1,1)	7,5 (1,1)
Oldható fram.	3,4 (0,4)	1,7 (0,4)	2,8 (1,0)	3,2 (1,2)

Mg tartalom				
	Kontroll	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
Alga sejt	1423 (54)	1116 (82)	981(104)	981 (81)
Sejtfal fram.	1512 (101)	972 (58)	932 (71)	712 (88)
Membrán fram.	111 (14)	98 (21)	144 (22)	94 (7,6)
Oldható fram.	102 (7,0)	68 (19)	49 (11)	51 (4,9)

Fe tartalom				
	Kontroll	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
Alga sejt	148 (4,0)	102 (4,8)	78 (8,0)	62 (5,1)
Sejtfal fram.	114 (7,5)	114 (7,0)	82 (3,8)	79 (4,2)
Membrán fram.	32 (2,6)	26 (3,6)	11 (2,1)	10,2 (1,4)
Oldható fram.	41 (4,9)	10,5 (2,8)	2,5 (0,9)	3,2 (1,3)

A króm abszorpciója és akkumulációja a hajtásos növényekben széles határok között változhat ($0,2\text{-}200 \text{ mg kg}^{-1}$), mely képet erősen árnyalja, hogy a növények különböző részeiben a króm felhalmozódása erős eltéréseket mutathat (Soane és Saunder 1959, Cary és Kubota 1990).

Hajtásos növényekben az akkumulált króm nagy része a gyökérsejtekben található, vakuolumokban kompartmentizálódik, transzportja a hajtás irányába nem számottevő (Moral et al. 1994), még kevésbé jelentős a termés irányába (Ramachandran et al. 1980). Hasonló eredményeket kaptak folyadékkultúrák kísérletek esetében is (Moral et al. 1996).

Mérési eredményeink némileg eltérnek az irodalmi adatoktól (Okamura és Aoyama 1994). Az említett kutatócsoport - egy másik *Chlorella* fajban - háromnapos expozíció után a króm mintegy 25-25%-át találta a sejtfalban, a roncsolt sejtmembrán-, citoplazma- és sejttörmelék frakcióiban. Az eltérés legvalószínűbb magyarázata, hogy bár egy nemzetséghez tartozó, de eltérő fajokról van szó. A *Glaucocystis nostochinearum* Cr(VI) tartalmú táptalajon tenyésztve szintén képes volt króm akkumulációra. Ebben a hosszabb távú kísérletben (7 nap) - bár a sejteket nem fracionálták - a felvett króm mennyisége növekedett az alkalmazott koncentrációval és az idővel, de linearitás nem volt kimutatható (Rai et al. 1992). Több folyóvízi alga és magasabbrendű növényfaj vizsgálatánál szintén extenzív krómfelvételt tapasztaltak mind az élő mind az elpusztult növények esetében (bioszorpció), mely adatok bio-, ill. fitoremediációs szempontból lehetnek fontosak (Mangi et al. 1978).

4.3. Fotoszintetikus pigment összetétel változása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) kezelés hatására

A zöldalgasejtek Cr(VI)-tal történt kezelésének növekedéssel kapcsolatos adatai között már megemlítettük az összes klorofill koncentrációjában történt változásokat. Vizsgálataink során a fotoszintetikus aktivitást is terveztük vizsgálni. Bár a fotoszintetikus aktivitás meghatározása során a színanyagok közül csak klorofill mennyiségét vesszük figyelembe a számításoknál a vizsgált objektum fiziológiai állapotát jól jellemzi a színanyag-összetétel, ezért célszerűnek tartottuk megvizsgálni az algasejtek pigment-összetételét is. A színanyag-összetétel változása önmagában nem indikátora egy adott stresszhatásnak, de utalást adhat a sejt egészében lejátszódó változásokra, mint például a szabadgyök mechanizmusú reakciók propagálására (Panda et al. 2003).

**7. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt algasejtek fotoszintetikus pigmenttartalma
72 óra kezelés után**

Az adatok mg g⁻¹ friss tömegre vonatkoztatva vannak megadva

	Kontroll	1 mg dm ⁻³	5 mg dm ⁻³	10 mg dm ⁻³	20 mg dm ⁻³
Klorofillok					
klorofilid b	0,014	0,012	0,012	0,010	0,009
klorofilid a	0,175	0,125	0,127	0,142	0,063
klorofilid a'	0,061	0,043	0,037	0,039	0,041
OH-klorofil b-1	0,026	0,035	0,082	0,116	0,129
OH-klorofil b-2	0,023	0,041	0,072	0,104	0,110
klorofil b	0,421	0,436	0,439	0,676	0,367
klorofil b'	0,123	0,136	0,110	0,124	0,091
OH-klorofil a-1	0,058	0,079	0,119	0,134	0,138
OH-klorofil a-2	0,042	0,101	0,154	0,158	0,152
klorofil a	2,169	2,287	2,026	1,904	1,702
klorofil a'	0,308	0,378	0,255	0,261	0,290
feofitin	0,018	0,045	0,069	0,085	0,114
Karotinoidok					
violaxantin	0,08	0,096	0,088	0,101	0,069
anteroxantin	0,245	0,270	0,229	0,292	0,210
lutein	0,662	0,686	0,695	0,915	0,980
xantofillok	0,101	0,124	0,172	0,201	0,152
α-kriptoxantin	0,049	0,068	0,065	0,044	0,018
β-kriptoxantin	0,024	0,024	0,017	0,009	0,008
α-karotin	0,099	0,077	0,079	0,075	0,088
β-karotin	0,172	0,137	0,174	0,184	0,231

A 7. táblázat adataiból kitűnik, hogy a legkisebb koncentráció esetében (1 mg dm⁻³) a kontroll és a kezelt minták klorofil *a* és klorofil *b* mennyisége gyakorlatilag nem változik. A legnagyobb Cr(VI) koncentráció (20 mg dm⁻³) alkalmazásakor mind a klorofil *a*, mind a klorofil *b* mennyisége csökken a kontrolhoz képest. A klorofil *a* esetében a csökkenés közel 30%-os, a klorofil *b* esetében mindössze 15% körüli értéket mértünk. Az 1-20 mg dm⁻³ koncentráció Cr(VI)-tal kezelt minták esetében megfigyelhető, hogy a növekvő koncentrációval csökken a klorofil *a/b* arány. A különböző klorofil származékok mennyisége változó képet mutat. A klorofilid *a* és a klorofilid *b* koncentrációja ugyancsak csökkenő értékeket mutat a növekvő Cr(VI) koncentrációval, míg a klorofillok oxidációs és lebomlási termékei - a OH-klorofillok és a feofitin - mennyisége növekszik (Hörcsik et al. 2005). Hasonló tendenciákat figyelhetünk meg a klorofil *a* és *b* mennyiségére vonatkozóan kobalt

hatására cukorrépa levelekben (Lipskaya 1970), illetve más nehézfémek - Cd, Cu - hatására más hajtásos növényekben (Sanità di Toppi és Gabbrielli 1999, Mocquot et al. 1996).

Thalassiosira pseudonatha és króm(VI) kölcsönhatásának vizsgálatok megállapították, hogy krómnak nagy az affinitása a fehérjékhez, ezáltal sok enzimet inaktíválhat. Korrelációt állapítottak meg a pigmenttartalom és a tápanyagfelvétel között, a zavart tápanyagfelvétel és klorotikus tünetek között (Riedel 1985). Jelentős mértékű klorofill csökkenést tapasztaltak a *Glaucocystis nostochinearum* zöldalga krómmal való kezelésekor (Rai et al. 1992). A kezelt minták a kontrollhoz képest mintegy 60%-kal kevesebb klorofillt tartalmaztak. Cirkóniummal, galliummal és titánnal kezelt *Chlorella pyrenoidosa* esetében szintén megfigyelhető mind a klorofillok koncentrációjának, illetve a klorofill *a/b* arányának a csökkenése (Simon et al. 2001). A különböző klorofillszármazékok megjelenése kapcsolatba hozható a megnövekedett membránendezintegrációval és az ezt követő oxidoreduktáz (peroxidáz, kataláz) aktivitások növekedésével (Kato és Shimizu 1985). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a Cr(VI) indirekt módon avatkozik be a klorofill metabolizmusba - membránkárosodások, szabadgyök-reakciók propagálódása, kataláz, peroxidáz aktivitás növekedése - és okozza a különböző klorofill lebomlási termékek magasabb mennyiségben történő megjelenését.

Jelentős változásokat észleltünk a karotinoidok mennyiségében is. Az α -karotin mennyisége a növekvő Cr(VI) koncentrációval jelentéktelen (1 μg) csökkenést, míg a β -karotin mennyisége számottevő (20 μg) növekedést mutat. Figyelemreméltó a β/α karotin arány változása, mely a kontroll sejtekben 1,74; a növekvő (1-5-10-20 mg dm^{-3}) Cr(VI) koncentrációval párhuzamosan közel a duplájára növekszik (1,78; 2,2; 2,45; 2,63). Ez a jelenség egy védekező mechanizmus lehet a nehézfémek által indukált oxidatív stresszek ellen (Salguero et al. 2003). Eltérő jellegű változásokat tapasztaltak *Chlorella vulgaris* Hg és Zn kezelésekor. Itt a pigmentek kontrollhoz viszonyított aránya a

klorofill *b* → klorofill *a* → karotinoidok

hierarchikus rendben csökkent (Rai et al. 1992). Ha a sejteket 1, 5, 10, 20 mg dm^{-3} koncentrációjú krómmal kezeltük a xantofillok mennyisége is megváltozott (123%, 170%, 200%, 151%) a kontrollhoz (100%) képest.

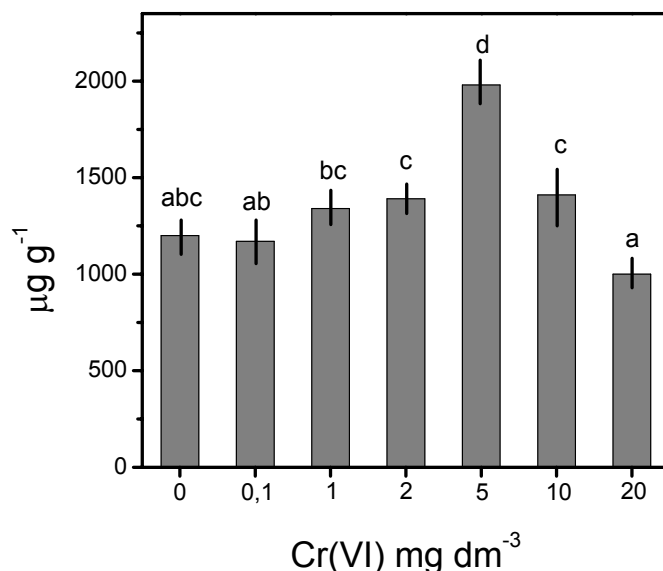
4.4. Szabadaminosav mennyiségének változása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) hatására

8. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek szabadaminosav mennyiségének változása 72 óra kezelés után

Az adatok $\mu\text{g g}^{-1}$ értékben vannak megadva friss tömegre vonatkoztatva vannak megadva, Ser*: Ser, Asn, Gln

	Kontroll	0,1 mg dm ⁻³	1 mg dm ⁻³	5 mg dm ⁻³	10 mg dm ⁻³	20 mg dm ⁻³
Asp	158,64	156,47	168,98	208,78	182,12	152,59
Thr	44,10	44,32	60,78	89,70	42,13	27,23
Ser*	605,23	588,35	604,54	812,12	626,02	506,48
Glu	34,89	17,88	13,00	11,31	6,67	5,02
Pro	23,61	26,88	42,68	86,15	31,66	19,55
Gly	3,16	5,21	5,32	8,12	4,88	4,72
Ala	104,92	93,77	112,32	176,89	63,31	41,77
Cys	2,20	3,28	7,83	6,12	6,87	5,47
Val	61,99	65,12	71,45	116,74	88,22	50,87
Met	1,49	1,15	1,42	1,12	1,53	1,51
Ile	22,87	32,21	40,34	75,23	62,04	24,16
Leu	18,54	23,32	33,88	66,12	47,07	31,07
Tyr	19,32	20,40	21,12	49,44	33,12	25,12
Phe	2,33	2,22	1,88	1,98	2,03	2,34
Lys	48,72	41,68	45,78	86,77	48,72	31,56
His	40,31	43,21	51,21	74,11	43,67	27,54
Arg	53,12	56,12	66,45	117,87	76,09	47,12
Összes	1245,44	1221,59	1348,98	1988,57	1366,15	1008,12

A Cr(VI) minden alkalmazott koncentrációban változást okozott a szabadaminosavak mennyiségében 3 nap kezelés után (8.táblázat). Jelentős változást tapasztaltunk a valin, leucin, izoleucin, lizin, arginin, cisztein és különösen a stresszfiziológiai szempontból fontos prolin mennyiségében (9-10.ábra). Ser* jelölést kapott a szerinnel együtt eluálódó aszparagin (Asn) és glutamin (Gln).



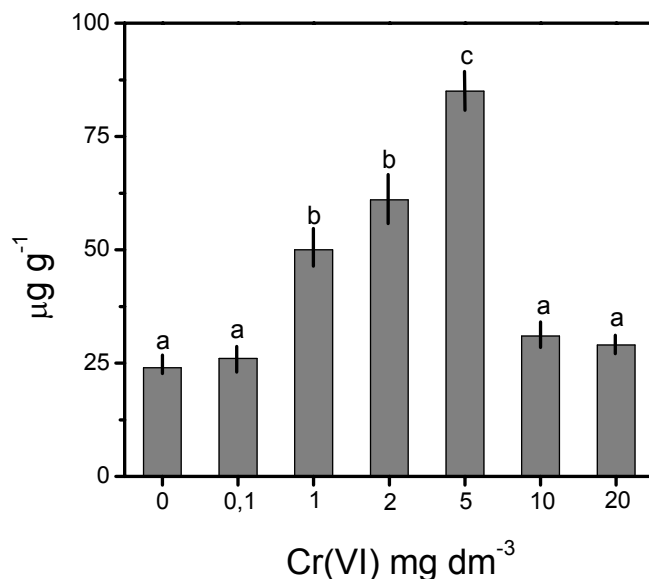
9. ábra. Szabad aminosav tartalom kontroll és Cr(VI) kezelt algasejtekben 72 óra kezelés után Az adatok $\mu\text{g g}^{-1}$ nedves tömeg értékre vonatkoznak

Növekvő Cr(VI) koncentráció hatására 5 mg dm^{-3} koncentrációig a kezelés alatt folyamatosan növekszik az összes szabad aminosav mennyisége, $10\text{-}20 \text{ mg dm}^{-3}$ koncentráció értékeknél már csökkenő tendenciát mutat (9.ábra). A magasabb koncentráció értékeknél látható csökkenés magyarázata valószínűleg a Cr(VI) általános anyagcseregátló hatásával magyarázható.

A valin, lizin és arginin mennyiségében 5 mg dm^{-3} alkalmazott koncentráció közel kétszeres, míg a leucin, izoleucin estében háromszoros növekedést okoz. Szembetűnő változás áll be a kéntartalmú cisztein mennyiségében is. Az emelkedő Cr(VI) koncentrációval mennyisége 1 mg dm^{-3} értékig gyorsan emelkedik, ettől magasabb kezelési értékeknél mennyisége már nem változik számottevően. Bár adataink alapján közvetlen kapcsolatot nem állapítható meg, figyelemreméltó, hogy a mikroelem összetétel vizsgálatakor a S mennyiségi változása hasonló trendet követ (vö. 5. táblázat adataival).

A prolinkoncentráció változása némileg eltérő változásokat mutat (10. ábra). Maximumát 5 mg dm^{-3} koncentrációnál éri el 72 óra kezelés után - mennyisége közel négyszerese a kiindulási értéknek - ezután csökkenő tendenciát mutat, de a $10\text{-}20 \text{ mg dm}^{-3}$ alkalmazott Cr(VI)

koncentrációk esetében csökkenése gyorsabb, mint az összaminosav mennyiségének esetében tapasztaltuk. A glutaminsav mennyiségének változása csökkenő trendet mutat, ami érvényes a 8. táblázatban közölt aminosavak mennyiségi változásaira.



10. ábra. Prolintartalom kontroll és Cr(VI) kezelt algasejtekben 72 óra kezelés után
Az adatok $\mu\text{g g}^{-1}$ friss tömeg értékre vonatkoznak

A többi aminosav mennyiségi eloszlása is karakterisztikus változásokat mutat Cr(VI) stressz hatására, azonban ezek fiziológiai háttere még tisztázásra vár.

A nehézfémek által okozott stresszek számos fiziológiai és biokémiai folyamatra hatással vannak, jelentős metabolikus változásokat okozhatnak (Van Assche és Clijsters 1990, Sanitá di Toppi és Gabbrielli 1999). A bekövetkező stresszfolyamatok jelzésére több szignálmolekula is alkalmas. A legtöbbet vizsgált komponensek a hősokkfehérjék (Wollgiehn és Neumann 1999), stresszenzimek (Weckx és Clijsters 1996), aminosavak, poliaminok, fitoalexinek, kismolekulájú szénhidrátok (Leskó et al. 2002), fitokelatinok (Grill et al. 1989).

Bár a prolin mennyiségének változása nem speciálisan nehézfém kezelések kísérője, szárazság-, hő-, illetve sóstressz hatására is tapasztalható koncentrációjának növekedése (Öncel et al. 2000). A prolinkoncentráció változása hasonló trendet mutat *Chlorella pyrenoidosa*

esetében, mint a fitokelatinok mennyiségének változása (Szalai et al. 2002, Hörcsik et al. 2004). *Scenedesmus armatus* kultúrák nehézfémekkel való kezelésekor - Cd, Ni, Mn - a tápoldathoz adagolt prolin enyhítette a toxikus tüneteket, csökkentette a növekedésgátlást, a klorofill degradációt. A tápoldathoz adagolt prolint a zöldalga sejtek képesek voltak felvenni, a felvett prolin mennyisége korrelált a proteintartalommal. A vizsgálatokban a különböző induktorok között maga a prolin bizonyult a legerősebb indukáló ágensnek a prolinfelvétel szempontjából (El-Enany és Issa 2001).

4.5. Oxidoreduktázok aktivitásának változása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) kezelés hatására

Fotoszintetikus pigment összetétel vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a Cr(VI) kezelés jelentősen csökkentette a klorofill *a* és a klorofill *b* tartalmat, valamint megnövelte a klorofilok oxidációs termékeinek koncentrációját három napos kezelés után. Mikroelem összetétel vizsgálataink alapján tudjuk, hogy a felvett króm egy része a sejt belsejébe is bejutott. Ezen adatok alapján a Cr(VI)-ot erős oxidáló ágensnek gondoltuk, amely szabadgyök reakciók egész sorát indíthatta el. Mindezen ismeretek alapján kíváncsiak voltunk, hogy milyen módon változik meg a lipidperoxidáció, illetve karakterisztikus antioxidatív enzimrendszer néhány tagjának aktivitása.

A lipidperoxidáció mértékének jellemzésére a malondialdehid mennyiségének meghatározása az egyik legelterjedtebb módszer (Chaoui et al. 1997). A meghatározás során a tiobarbitursav reaktív intermedierek (továbbiakban TBRI) meghatározása történik, melynek zöme malondialdehid (továbbiakban MDA), valamint kevés, más típusú aldehid és endoperoxid (Kosugui és Kikugawa 1989). A TBRI mennyisége minden alkalmazott Cr(VI) koncentrációban növekedett (9. táblázat), jelezve, hogy jelentős lipidperoxidációs változások zajlottak le a *Chlorella* sejtekben. A 0,1 és 1 mg dm⁻³ alkalmazott Cr(VI) koncentrációk esetében a 72 órás kezelés után a TBRI mennyisége kontroll értékhez képest (100%) 24%-al, illetve 32%-al emelkedett. Magasabb koncentrációk esetében ez az arány a kontroll érték duplája, míg a kiindulási értéknek több mint a háromszorosa lett (Hörcsik et al. 2005). A stressz hatására megnövekszik a reaktív oxigén intermedierek mennyisége, melyek semlegesítődése a membránlipidek destabilizációjával jár. A lipidperoxidációt több ágens indíthatja, például egy redoxaktív fémion, vagy a vastartalmú lipoxigenáz (Weckx és Clijsters 1996).

9. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek MDA (TBRI) koncentrációjának változására 72 óra kezelés után

Az adatok $\mu\text{g g}^{-1}$ koncentrációban friss tömegre vonatkoztatva vannak megadva, ():SE. Az alsó adatsor a kontrollhoz képest viszonyított %-os adatokat reprezentálja/%/

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³	20 mg dm⁻³
0 óra	311,8 (24) /100%/	311,8 (24) /100%/	311,8 (24) /100%/	311,8 (24) /100%/	311,8 (24) /100%/	311,8 (24) /100%/
24 óra	435,8 (19) /139%/	488,8 (23) /156%/	499,7 (19) /160%/	688,8 (33) /220%/	1260 (34) /404%/	1304 (43) /418%/
48 óra	478,4 (22) /153%/	598,1 (27) /191%/	568,3 (29) /182%/	1012 (38) /324%/	1145 (44) /367%/	1345 (41) /431%/
72 óra	497,4 (21) /159%/	618,2 (27) /198%/	657,0 (26) /210%/	1073 (44) /344%/	955,1 (33) /306%/	1044 (38) /334%/

A növekvő TBRI mennyiség arra utal, hogy Cr(VI) a rézhez és kadmiumhoz hasonlóan lipidperoxidációt indukál. A guajakol-peroxidáz aktivitás változás adatait Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtekben a 10. táblázat mutatja be.

10. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek guajakol peroxidáz aktivitása

Az adatok U g⁻¹ koncentrációban vannak megadva, ():SE. Az alsó adatsor a kontrollhoz képest viszonyított %-os adatokat reprezentálja /%/

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³	20 mg dm⁻³
0 óra	38,52 (6,3) /100%/	38,52 (6,3) /100%/	38,52 (6,3) /100%/	38,52 (6,3) /100%/	38,52 (6,3) /100%/	38,52 (6,3) /100%/
24 óra	45,58 (5,8) /118%/	47,31 (8,7) /122%/	65,77 (8,4) /170%/	89,8 (8,1) /233%/	94,5 (17,4) /245%/	83,9 (16,4) /117%/
48 óra	51,12 (6,2) /132%/	58,27 (9,8) /151%/	74,36 (12) /193%/	111,5 (12) /289%/	57,11 (9,4) /148%/	58,53 (13) /151%/
72 óra	48,23 (21) /125%/	72,42 (7,4) /188%/	79,24 (9,6) /205%/	123,7 (9,2) /321%/	40,15 (7,2) /104%/	36,64 (11) /95%/

A kezelés első napjának végén már növekvő peroxidáz aktivitást észleltünk, mely 0,1-5 mg dm⁻³ koncentráció értékekig folyamatosan emelkedett a harmadik napig. Az enzimaktivitások 0,1-1,0 mg dm⁻³ koncentráció értékek mellett közel azonos nagyságú emelkedést mutattak - a harmadik nap végére mintegy 100 %-os emelkedést a kiindulási kontroll értékhez viszonyítva -, 5 mg dm⁻³ koncentrációnál az emelkedés megközelítette a 220 %-ot. A magasabb koncentrációnál az enzimaktivitás már az első nap végén elérte maximumát, a kontroll értékhez viszonyítva közel 140 %-ot, majd ettől kezdve csökkenő tendenciát mutatott, majd harmadik nap végére a kontroll mintában tapasztalható érték alá csökkent. A nehézfém stresszek által okozott oxidatív károsodások kivédésének két védvonalra létezik. Első a sejtben található redukáló ágensek - aszkorbinsav, glutation, α -tokoferol -, második egy enzimatis rendszer - kataláz, aszkorbinsav-, guajakol- peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz - melynek fontos elemei a peroxidázok (Salin 1988, Scandalios 1993). Számos publikáció számol be a guajakol-peroxidáz aktivitásának emelkedéséről nehézfémekkel való kezelés hatására. Cd-mal kezelt árpa esetében az enzimaktivitás emelkedése háromnapos kezelés után közel a

nyolcszorosára (Hegedűs et al. 2001, Erdei et al. 2002), Cu(II)-vel kezelt *Lemna minor* esetében az enzimaktivitás az első nap végén több mint a háromszorosára emelkedett (Teisseire és Guy 2000). A *Populus x canescens* Cr(VI) és Hg toxicitását külön-külön vizsgálva a gyökérben az aktivitás emelkedése kisebb mértékű, de magasabb, mint a kontroll aktivitás kétszerese (Parmar et al. 2002). Itt kell megjegyezzük, hogy búza Zn és Cr(VI) kezelésénél a guajakol-peroxidáz aktivitásának nagymértékű csökkenését tapasztalták (Panda et al. 2003).

Az aszkorbinsav-peroxidáz a guajakol-peroxidázhoz hasonlóan fontos enzim, mely kulcsszerepet játszik a mérgező H₂O₂ semlegesítésében a növényi sejtekben (Foyer et al. 1994). A 11. táblázat az aszkorbinsav-peroxidáz aktivitásának változását mutatja *Chlorella pyrenoidosa*-ban Cr(VI) kezelés hatására. A 0,1 mg dm⁻³ Cr(VI) koncentráció esetében nem tapasztaltunk lényeges változást a kontroll mintánkhöz képest. Minden magasabb koncentrációjú kezelés esetében megnőtt a kontrollhoz viszonyított enzimaktivitás az első nap végére, azonban a harmadik nap végére csökkenő tendenciát mutattak. A nehézfém kezelésekre hatására bekövetkező enzimaktivitás változások eltérő képet mutattak, az alkalmazott nehézfémtől, illetve a vizsgált növénytől függtek. *Lemna minor* Cu(II) kezelésénél a kezdeti emelkedés után csökkenő tendenciát tapasztaltak (Teisseire és Guy 2000). Árpa-Cd kölcsönhatás esetében a levélből izolált aszkorbinsav-peroxidáz aktivitás nagyobb mértékben növekedett, mint a gyökérből izolált enzim aktivitás (Hegedűs et al. 2001).

A két peroxidáz eltérő viselkedésének magyarázataként az aszkorbinsav-peroxidáz szubsztrátspecifitása, illetve a guajakol-peroxidáz stabilitása szolgálhat (Dignum et al. 2001).

11. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek aszkorbinsav peroxidáz aktivitása

Az adatok U g⁻¹ koncentrációban vannak megadva ():SE, nd.: nem detektálható. Az alsó adatsor a kontrollhoz képest viszonyított %-os adatokat reprezentálja / %/

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³	20 mg dm⁻³
0 óra	5,32 (0,36) /100%/	5,32 (0,36) /100%/	5,32 (0,36) /100%/	5,32 (0,36) /100%/	5,32 (0,36) /100%/	5,32 (0,36) /100%/
24 óra	5,81 (0,44) /109%/	6,23 (0,62) /117%/	12,47 (1,5) /234%/	14,64 (2,6) /275%/	13,72 (2,4) /257%/	9,2 (2,64) /172%/
48 óra	5,90 (0,53) /111%/	5,78 (0,57) /108%/	12,12 (1,7) /227%/	11,76 (2,0) /221%/	7,68 (1,88) /144%/	0,92 (0,52) /17%/
72 óra	5,62 (0,72) /105%/	5,18 (0,74) /97%/	8,52 (1,45) /160%/	9,57 (2,75) /179%/	2,69 (1,42) /50%/	nd.

A kataláz aktivitásában fellépő változások kismértékben eltérőek voltak a peroxidázok esetében tapasztaltaktól. Alacsony Cr(VI) koncentráció esetében – 0,1 mg dm⁻³ - a harmadik nap végére enyhe csökkenést, a magasabb koncentrációk esetében enyhe növekedést, míg a 20 mg dm⁻³ koncentráció minta esetében csökkenést tapasztaltunk (12. táblázat) a kataláz enzim aktivitásában. A nagyobb alkalmazott koncentráció esetében az aktivitás csökkenése a többi metabolikus folyamat gátlásával hozható kapcsolatba. A vizsgált oxidoreduktázok aktivitásának időbeni változását a kontroll minták aktivitásának százalékában is feltüntettük.

A kataláz aktivitásának - mely zömében a peroxisómákban lokalizálódik és a fotorespiratorikus H₂O₂ semlegesítésében vesz részt - ilyen irányú megváltozása némileg váratlan jelenség. *Lemna minor* L. Cu(II)-vel való kezelésekor minden alkalmazott koncentrációban enzimaktivitás növekedés volt tapasztalható (Teisseire és Guy 2000). Cd-mal kezelt árpa növényt vizsgálva szintén enzimaktivitás növekedés észlelhető, mind a gyökérből, mind a levélből izolált enzim esetében (Hegedűs et al. 2001). Ugyanakkor búzanövény Zn- és Cr(VI)-tal történt

kezelésekor a kontroll érték negyedére esett vissza az enzim aktivitása. Ezeknek az eltérő adatoknak a magyarázatára ma még nem áll rendelkezésünkre megfelelő mennyiségű kísérleti adat; vélhetően a növények egyedi, speciális tulajdonságai lapvetően befolyásolják az enzimaktivitási értékeket.

12. táblázat. A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* kataláz aktivitására

Az adatok Ug^{-1} koncentrációban vannak megadva ():SE, nd.: nem detektálható. Az alsó adatsor a kontrollhoz képest viszonyított %-os adatokat reprezentálja / %/

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³	20 mg dm⁻³
0 óra	88,7(10,7) /100%/	88,7(10,7) /100%/	88,7(10,7) /100%/	88,7(10,7) /100%/	88,7(10,7) /100%/	88,7(10,7) /100%/
24 óra	92,6(12,2) /104%/	90,6(14,6) /102%/	122,8(17,8) /138%/	112,2(14,8) /126%/	101,1(15,2) /141%/	41,7(18,4) /47%/
48 óra	95,8(14,3) /108%/	97,6(12,8) /108%/	143,6(22,1) /162%/	134,7(20,5) /151%/	72,8(13,1) /82%/	15,5(9,5) /17%/
72 óra	109,7(15,4) /123%/	79,24(10,4) /89%/	134,56(9,7) /150%/	123,1(18,6) /138%/	59,44(16,6) /67%/	nd.

A fotoszintetikus pigment vizsgálatok és az enzimaktivitás változások együttes eredményei arra utalnak, hogy a Cr(VI) kezelés eredményeként intenzív oxidatív folyamatok - pl. lipidperoxidáció - játszódnak le az algasejteken belül, melyek más membránkapcsolt anyagcsere-folyamatokra is gátló hatást gyakorolhatnak.

4.6. Fitokelatin szintáz aktivitásának változásai *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) kezelés hatására

A nehézfém stresszekre adott növényi válaszok egyik fontos eleme a fitokelatinok megjelenése, amelyeket hajtásos növényekben, algákban, gombákban egyaránt kimutattak. Elsődleges szerepe a nehézfém detoxifikálásban csak a Cd esetében tekinthető bizonyítotttnak.

Mindemellett több esszenciális (koncentrációtól függően esetleg toxikus) és toxikus nehézfém is a fitokelatin szintézis induktorának bizonyult. Mindezzel kapcsolatban nincs bizonyíték arra, hogy a króm indukálhatja a fitokelatin szintézisét. Méréseinkben nem közvetlenül a megjelenő peptidek jellegét (ld. 2. ábra), hanem a fitokelatin szintáz aktivitását vizsgáltuk. Mint az a 13. táblázatból is kitűnik, a fitokelatin szintáz aktivitása már a legalacsonyabb alkalmazott Cr(VI) koncentráció esetében is megnövekedett.

13. táblázat. Fitokelatin szintáz enzimaktivitás időbeli változása Cr(VI) terhelés hatására Az adatok nkat $\mu\text{g prot}^{-1}$ értékben vannak megadva, ():SE.

	Kontroll	0,5 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
0 óra	0,012 (0,001)	0,014 (0,005)	0,013 (0,001)	0,011 (0,001)	0,012 (0,0015)
1 óra	0,013 (0,002)	0,0125 (0,0015)	0,012 (0,001)	0,011 (0,0015)	0,011 (0,002)
6 óra	0,0145 (0,0015)	0,017 (0,004)	0,013 (0,0015)	0,012 (0,0015)	0,009 (0,002)
12 óra	0,011 (0,0015)	0,012 (0,0015)	0,012 (0,002)	0,009 (0,001)	0,010 (0,001)
24 óra	0,0145 (0,001)	0,029 (0,001)	0,022 (0,005)	0,022 (0,002)	0,019 (0,001)
72 óra	0,010 (0,002)	0,013 (0,004)	0,013 (0,0015)	0,014 (0,0005)	0,014 (0,004)

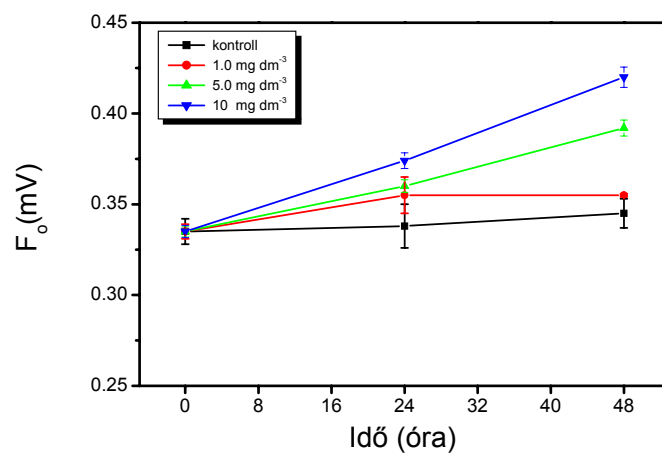
Az enzimaktivitás időbeli változását tekintve az első órában nem észlelhető jelentős eltérés a kontroll mintához képest. A 6 és 12 órás méréseknél 0,5 és 1 mg dm⁻³ koncentrációk esetében már növekedést tapasztalunk, amelyek maximumukat az első nap végére érik el, ahol az aktivitásuk a kontroll érték duplája. Magasabb koncentrációnál szinte semmilyen változást nem tapasztaltunk még a 12 órás mintáknál sem, a 24 órás mintáknál azonban mind az 5 mg dm⁻³, mind a 10 mg dm⁻³ koncentrációjú kezeléseknél is eléri az enzimaktivitás a maximumot. A 24 órás adatokhoz képest minden minta esetében jelentős enzimaktivitásbeli

csökkenést láthatunk a 72 órás mérések adataiban, minden esetben a kiindulási érték közelébe estek vissza (Hörcsik et al. 2004). Hasonló időbeni változás figyelhető meg kukorica gyökérben vizsgált fitokelatin szintáz esetében is Cd stressz hatására (Szalai et al. 2002). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a fitokelatinok gyorsan mobilizálható első védvonalként működnek a növényi sejtekben nehézfém terhelések esetén, mely szerepet addig kell ellátniuk, míg a lassabban reagáló, de a sejteket energetikailag kevésbé igénybe vevő folyamatok átveszik a védekezési feladatokat.

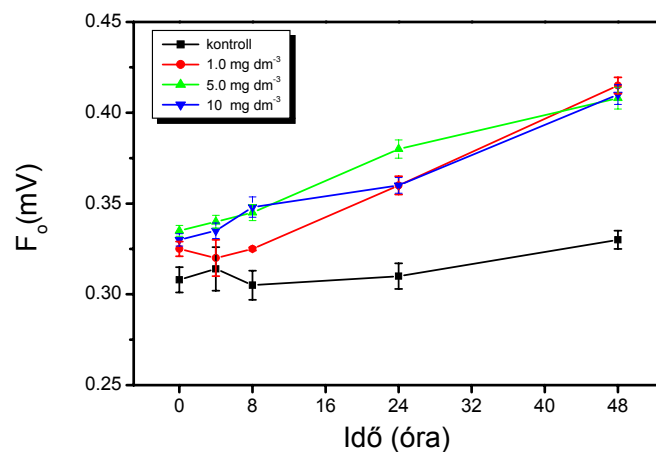
4.7. A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* fotoszintetikus aktivitására

A nehézfémek fotoszintézisre gyakorolt hatását több szempontból vizsgálták *in vivo* és *in vitro* körülmények között is. Szinte minden vizsgálati eredmény a fotoszintézist gátló hatásáról számol be, nincs azonban egységes álláspont azzal kapcsolatban, hogy a gátló hatások közvetlen vagy közvetett okokra vezethetők vissza (Clijsters és Van Assche 1985). Jelentős eltérések mutatkoztak az *in vivo* és *in vitro* mérési eredmények között (Tukendorf és Baszinsky 1991, Krupa et al. 1992).

A különböző növekedési paraméterekben beállt változások - növekedés, szárazanyag és fotoszintetikus pigmentek mennyisége - rávilágítottak a Cr(VI) *in vivo* toxikusságára, ugyanakkor kíváncsiak voltunk, a fotoszintetikus folyamatokban bekövetkező változásokra. A növények fotoszintetizáló képességét jól jellemzi a klorofill fluoreszcencia. Vizsgálatainkat egyrészt egy speciális üvegszál membránra szűrve, másrészt a tenyésztőedényből kivett mintával közvetlenül végeztük.



11. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_0 értékére
A méréseket üvegmembránra szűrt zöldalgasejtekkel végeztük

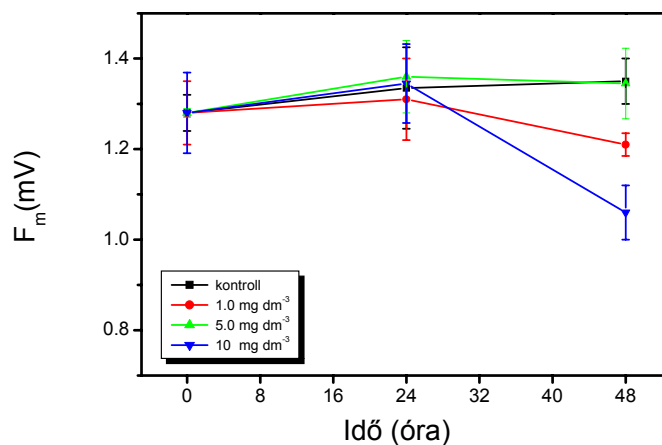


12. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_0 értékére
A méréseket az alganeveléshez használt tápoldatban végeztük

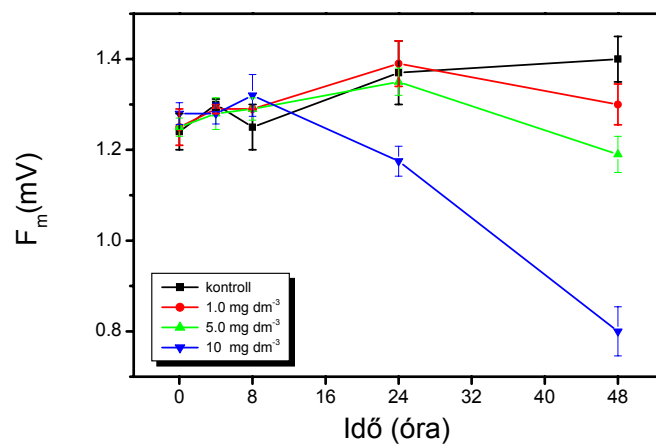
A 11. ábra adataiból láthatjuk, hogy az üvegszál membránra vitt algasejtek F_0 értékei 1 mg dm^{-3} koncentráció Cr(VI) kezelés hatására nem

különböznek lényegesen a kontroll minta F_0 értékeitől, az 5 és 10 mg dm^{-3} koncentrációk esetében azonban ez az érték emelkedik. A folyadékkultúrában végzett mérési adatok értékei (12. ábra) jól korrelálnak az előző adatokkal, itt azonban az 1 mg dm^{-3} koncentráció esetében is emelkedik az F_0 értéke. Az F_0 értékének emelkedése a PSII pigmenttartalmának csökkenésével magyarázható (MacFarlane 2003). Bár pigmentvizsgálataink során nem volt módunk a kloroplasztiszok frakcionálására, a klorofilok mennyiségének a csökkenése megfigyelhető volt a Cr(VI) koncentráció növekedésével.

A 13. ábrán az üvegszál membránra felvitt, míg a 14 ábrán a folyadékkultúrában mért minták F_m értékeit láthatjuk. A két mérés adatai hasonló trendet mutatnak, a kontroll minta F_m értékéhez képest jelentős csökkenést tapasztalhatunk a Cr(VI)-tal kezelt algasejtek maximális fluoreszcencia értékeiben. Különösen nagy a csökkenés mértéke a 10 mg dm^{-3} minta esetében, mindez a PSII aktivitásának gátlásával és vélhetően a tilakoid membránstruktúra megváltozásával hozhatók összefüggésbe (Balázs et al. 1999).

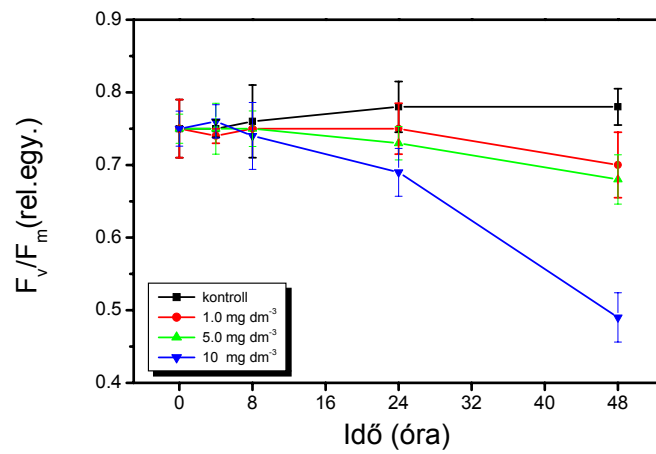


13. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_m értékére
A méréseket üvegszál membránra szűrt zöldalgasejtekkel végeztük

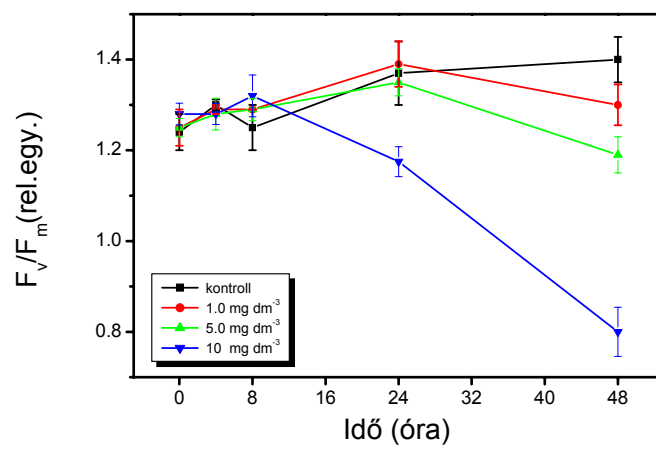


14. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_m értékére
A méréseket az alganeveléshez használt tápoldatban végeztük

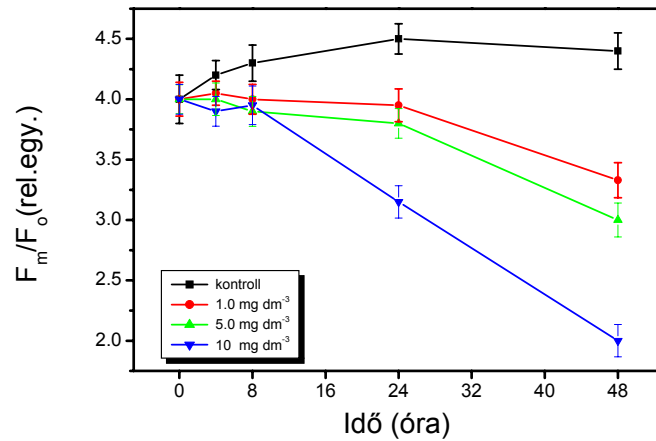
Mindkét mérési módszer szinte azonos eredményeket hozott az F_v/F_m értékek (15-16. ábra), és az F_v/F_o értékek (17-18. ábra), esetében amely fotoszintézis egyik leginformatívabb paraméterei. A kvantumhatásfok a kontroll értékhez képest csökkent a növekvő Cr(VI) koncentrációval. Az F_v/F_m érték csökkenése nem csak nehézfém-, hanem hő-, hideg-, szárazság-, UV-stressz esetében is megfigyelhető, mintegy a stresszfolyamatokat kísérő károsodások eredőjeként (Krupa et al. 1992).



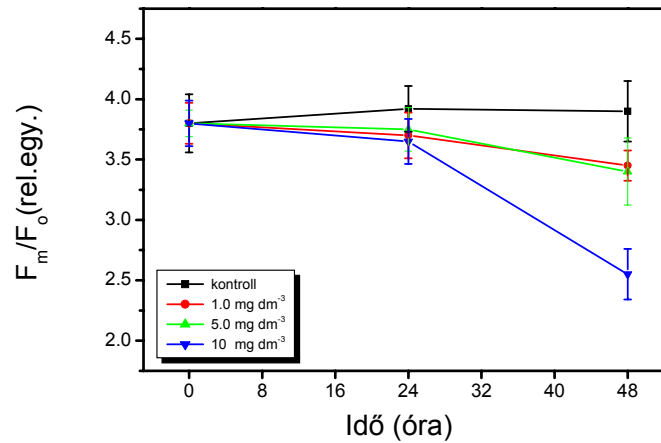
15. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_v/F_m értékére
A méréseket üvegmembránra szűrt zöldalgasejtekkel végeztük



16. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_v/F_m értékére
A méréseket az alganeveléshez használt tápoldatban végeztük



17. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_m/F_0 értékére
A méréseket üvegmembránra szűrt zöldalgasejtekkel végeztük



18. ábra. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga F_m/F_0 értékére
A méréseket az alganeveléshez használt tápoldatban végeztük

Az oxigén fejlődés koncentráció- és időbeli függését a 14. táblázatban láthatjuk. Megfigyelhető, hogy az elektron transzport sebessége gyorsan csökken mind az idő, mind a Cr(VI) koncentráció

függvényében. A legalacsonyabb alkalmazott koncentráció esetében a csökkenés nem számottevő, a növekvő Cr(VI) koncentráció hatására az oxigéntermelés a kontrollérték töredékére esik vissza. PpBQ (fenil-parabenzokinon) jelenlétében a csökkenés lassabban következik be és az alacsony koncentrációk esetében még a 72 órás kezelés végére sem tapasztalunk lényeges csökkenést az oxigén fejlődésében (15. táblázat). A PpBQ a PS II mesterséges elektronakceptora. Ennek jelenlétében az oxigénfejlődés sebessége csak a PS II aktivitásától függ. A +/- PpBQ mérések összevetéséből valószínűnek látszik, hogy a fotoszintézis először a PS II mögött (citokróm $b_{6/f}$ komplex, plasztocianin, PS I) gátolt, a PS II csak később veszi el aktivitását (Hörcsik et al. 2007).

14. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek oxigéntermelése 72 órás kezelés alatt Az adatok a kontroll %-ban vannak megadva, ():SE.

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
0 óra	100%	100%	100%	100%	100%
12 óra	124% (8)	108% (8)	102% (8)	72% (14)	67% (11)
24 óra	182% (22)	149% (11)	130% (18)	64% (23)	47% (28)
48 óra	218% (22)	184% (11)	146% (16)	60% (29)	41% (26)
72 óra	234% (28)	207% (20)	154% (24)	47% (26)	40% (32)

15. táblázat. Kontroll és Cr(VI) kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek oxigéntermelése 72 órás kezelés alatt PpBQ jelenlétében

Az adatok a kontroll %-ban vannak megadva, ():SE.

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
0 óra	100%	100%	100%	100%	100%
12 óra	124% (8)	116% (21)	108% (16)	94% (11)	92% (14)
24 óra	182% (22)	176% (19)	162% (23)	90% (10)	72% (13)
48 óra	218% (22)	230% (19)	188% (19)	78% (32)	61% (19)
72 óra	234% (28)	242% (33)	216% (21)	74% (34)	54% (26)

Mérési adataink valószínűleg nem a Cr(VI) közvetlen fotoszintetikus folyamatokba való beavatkozásával magyarázhatók, hanem inkább a nehézfémek által generált ROS fajták károsító hatásának következményei (Parmar et al. 2002).

4.8. A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* szénhidrát-anyagcsere folyamataira

A 16. tablatzatban a Cr(VI)-kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtekben beálló szénhidrát-tartalom változásokat láthatjuk 72 óra után. A 0,1-1 mg dm⁻³ koncentrációk esetében nem tapasztaltunk lényeges eltérést a mono- és diszaharidok vonatkozásában. Az eddigi vizsgálataink adatai alapján várható csökkenés helyett kismértékű növekedést figyelhettünk meg és csak a magasabb koncentrációk esetében csökkent le a mono- és diszaharidok mennyisége. A keményítő mennyiségében már az 1 mg dm⁻³ kezelési koncentrációnál megindult a csökkenő tendencia ($r = 0,884$), ami a magasabb koncentrációk irányában tovább csökkent ($r = 0,948$).

16. táblázat. Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* szénhidrátösszetételére 72 óra kezelés után. Az adatok a kontroll %-ában vannak megadva, ():SE.

	Kontroll	0,1 mg dm ⁻³	1 mg dm ⁻³	5 mg dm ⁻³	10 mg dm ⁻³
monoszacharidok	100%	104% (12)	109% (10)	94% (10)	87% (9)
diszacharidok	100%	107% (11)	102% (10)	95% (12)	79% (10)
keményítő	100%	104% (9)	91% (7)	81% (7)	67% (8)

Fotoszintetikus fluoreszcencia indukció vizsgálataink alapján a szénhidrátok mennyiségének csökkenése volt várható már 1 mg dm⁻³ koncentráció esetében is, a tényleges csökkenés viszont csak 5 mg dm⁻³ koncentrációnál volt megfigyelhető. Megvizsgáltuk a szénhidrát-anyagcserét szabályozó enzimek működésében beállt változásokat. A 17. táblázat adatai a 72 órás Cr(VI) kezelés hatására bekövetkező enzimaktivitás változásokat mutatják a PFK, PFP és FBP-áz enzimek aktivitásában. 10 mg dm⁻³ koncentrációnál mindegyik enzim aktivitása jelentős mértékben csökkent, ami valószínűleg elsősorban a nehézfém-kezelésre bekövetkező lipidperoxidációra vezethető vissza (Milone et al. 2003). Alacsonyabb koncentrációk esetében a glikolitikus folyamatokat katalizáló enzimek - PFK, PFP - aktivitásában nem tapasztaltunk jelentős aktivitásváltozást, míg az ellentétes irányú glikoneogentikus folyamat szabályozásáért felelős FBP-áz aktivitása enyhe csökkenést mutatott (Hörsik et al. 2005).

A mért enzimaktivitások csak részben magyarázzák a cukormintázatban beállt változásokat. Bár az FBP-áz aktivitása kismértékben csökkent, a glikolitikus enzimek aktivitása a várt hatással ellentétben nem növekedett lényegesen. Az általunk mért változások jellege és tendenciája hasonló a magasabbrendű növények esetében sóstresszre adott válaszokra (Misra és Dwivedi 1995).

17. táblázat. A Cr (VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* szénhidrát-anyagcsere szabályozó enzimeinek aktivitására 72 óra kezelés után

	Kontroll	0,1 mg dm⁻³	1 mg dm⁻³	5 mg dm⁻³	10 mg dm⁻³
PFK	100%	110% (14)	101% (9)	91% (8)	54% (16)
PFP	100%	108% (10)	104% (4)	89% (13)	43% (11)
FBP-áz	100%	88% (16)	79% (12)	61% (17)	40% (12)

5. Összefoglalás

A dolgozatban egy toxikus nehézfém-ion, a Cr(VI) - Cr(III) mellett - hatását vizsgáltuk a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga néhány anyagcsere folyamatára. A *Chlorella pyrenoidosa* kedvelt és gyakori tesztorganizmusa a biokémiai és stresszbiológiai kísérleteknek, mivel fotoszintetikus apparátusa hasonló a hajtásos növényekéhez, szaporodása ugyanakkor gyors. A vele végzett kísérletek emiatt nagy számban és ismétlésben végezhetőek el, jól reprodukálhatók és ellenőrizhetőek.

Az élőlények a szervezetük felépítéséhez, anyagcseréjükhöz szükséges anyagokat - így a különböző fémionokat is - a környezetükből veszik fel. Amikor a környezetben a felvehető toxikus (vagy akár esszenciális) fémionok koncentrációja eléri egy bizonyos küszöbértéket, az élőlények számos anyagcsere-folyamata gátlódik, ami adott esetben az élőlény pusztulásához is vezethet. E nehézfém-stressznek kitett élőlények lehetőségeikhez mérten megpróbálják csökkenteni a toxicitás mértékét.

A króm iránti érdeklődés széleskörű felhasználásából eredeztethető, hiszen a fém-, a festék-, elektrokémiai és a bőrpar nagy mennyiségben bocsát ki krómot, mind folyadék, mind szilárd, mind pedig gázfázisban a környezetbe, jelentős biológiai és ökológiai problémákat okozva. A króm számos oxidációs állapotban fordulhat elő, bár a természetben csak a Cr(III) és a Cr(VI) elég stabilis, a Cr(IV) és a Cr(V) instabil intermedierek a három- és hatértékű forma redoxátmeneteiben.

A két krómforma arányát a környezet fiziko-kémiai paraméterei határozzák meg. Oxigéndús környezetben és $\text{pH} \geq 7$ mellett a CrO_4^{2-} ionok, oxigénszegény környezetben és $\text{pH} \leq 6$ értéknél a Cr(III) ionok jelenléte várható, amit nagymértékben befolyásolnak az esetlegesen előforduló oxidáló és redukáló ágensek, valamint komplexképzésre képes molekulák. A felszíni levegőzött, magasabb oxigéntartalmú vizek kivételével a Cr(VI) csak alacsony pH-n jelenik meg H_2CrO_4 formában. A természetes vizek normális pH-Eh tartományában a Cr(III) akvakomplex/hidroxokomplex, szerves komplexek, és kevésbé mozgékony Cr(OH)₃ csapadék formájában fordul elő, de a komplexképződés itt is csökkenti a csapadékkiválás lehetőségét. A Cr(VI)-nak a környezeti feltételektől függően számos formája ismert, melyek oldhatósága és mobilitása lényegesen magasabb a Cr(III)-nál.

Jelen ismereteink szerint a Cr(III) esszenciális az ember és más emlősök számára is, a lipid- és glükóz-metabolizmus normális működésében játszik fontos szerepet. A Cr(VI) esetében viszont toxikus és teratogén hatásokról vannak ismereteink.

A növények számára a Cr(III) - elsősorban oldhatósági szempontok miatt - nem felvehető, a Cr(VI) pedig - különösen magasabb koncentrációban - toxikus hatású. Jelentősen lecsökkenti a gyökér/hajtás arányt, hátrányosan befolyásolja a vízháztartást, természsökkenéshez vezet. A fotoszintézisre gyakorolt hatások különböző növényfajok esetében jelentősen eltérhetnek egymástól. A növényi króm tolerancia vizsgálata még a kezdeteknél tart, élettani és biokémiai háttere még jórészt feltáratlan.

A dolgozat célkitűzései a következő kérdésköröket ölelték fel:

1. Milyen módon befolyásolja a Cr(VI) a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga szaporodását?
2. Milyen változások következnek be a *Chlorella pyrenoidosa* mikroelem mintázatában, illetve képes-e a krómot megkötni és akkumulálni?
3. Hogyan módosul Cr(VI) hatására a fotoszintetikus pigment összetétel, a prolin és a többi szabad aminosav mennyisége?
4. Hogyan változik a nehézfém terhelések alatt várhatóan fellépő oxidatív stresszt kontrolláló oxidoreduktázok - kataláz, peroxidázok - aktivitása?
5. Jelennek-e meg speciális nehézfémkötő proteinek?
6. Megváltozik-e a fotoszintetikus apparátus hatékonysága? Milyen okokra vezethetők vissza ezek a változások?

5.1. A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* szaporodására

Vizsgálataink során mind a Cr(III), mind a Cr(VI) hatását megvizsgáltuk a *Chlorella* sejtek szaporodására. A Cr(III) nem okozott lényeges változást egyik vizsgált paraméterben sem, ami a Cr(III) oldhatósági tulajdonságait ismerve nem okozott meglepetést. A legmagasabb alkalmazott koncentráció (50 mg dm^{-3}) esetében kismértékű gátlást észlelhettünk, de a kezelt sejteket normál táptalajra visszahelyezve, azok változatlanul tovább szaporodtak.

A Cr(VI) hatására minden vizsgált paraméter esetében jelentős változás következett be. Már 1 mg dm^{-3} koncentráció esetében jelentősen csökkent, mind a sejtsűrűség, mind a sejtszám, jelezve, hogy ezek a paraméterek jól korrelálnak. Az EC_{50} érték 2 mg dm^{-3} -nek adódott, ami fotoszintetizáló szervezetek esetében magas értéknek számít.

5.2. Mikroelem összetétel, króm akkumuláció

A *Chlorella* sejtek mikroelemösszetételét ICP technikával vizsgáltuk. A sejteket French Press-szel történő feltárás után sejtfal, membrán és citoplazma egységekre fracionáltuk. A mérések során 21 elem mennyiségét határoztuk meg a teljes sejtben. Érdeklődésünk központjában az állt, hogy a *Chlorella pyrenoidosa* képes-e megkötni, akkumulálni a krómot és ha igen, akkor ez hol koncentrálnodik.

A teljes sejtek elemtartalmát vizsgálva számos elem - Cr, Ca, Mg, Fe, Cu, Na, P, S - esetében mutatkoztak trendszerű eltérések a kontroll sejtekhez viszonyítva. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a növekvő Cr(VI) kezeléssel párhuzamosan a Na, P, Fe, és Mg mennyisége csökkent, a Ca és Cr mennyisége növekedett, míg a S esetében 5 mg dm^{-3} Cr(VI) koncentrációig növekedést, ettől magasabb kezelési koncentrációk esetében csökkenést tapasztaltunk.

A különböző sejtfrakciók vizsgálatakor a vizsgált elemek mindegyike elsősorban a sejtfal frakcióban lokalizálódott, míg a membrán és oldható frakciók között a megoszlás azonos nagyságrendű volt. A vizsgálataink szempontjából legfontosabb, hogy a felvett króm mennyisége a növekvő kezelési koncentrációval növekedett, bár 5 és 10 mg dm^{-3} koncentrációjú minták esetében a mennyisége már nem változott lényegesen. A felvett króm zöme a sejtfalban lokalizálódott, a membrán és az oldható frakciók lényegesen kisebb mennyiséget tartalmaztak.

5.3. Fotoszintetikus pigmentek és a szabad aminosavak mennyiségének változása

A fotoszintetikus pigmentek vizsgálatát HPLC technikával végeztük, többcsatornás detektorral, amely lehetővé tette a klorofill és karotinoid származékok egyidejű meghatározását. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségi változásai képet adhatnak a növény állapotáról, stresszfolyamatok hatásairól.

A klorofilok mennyisége csökkenést mutatott az emelkedő koncentrációjú Cr(VI) kezelést követően, a klorofill *a*-ban jelentkező csökkenés mértéke nagyobb volt, mint amit a klorofill *b* esetében tapasztalhattunk, csökkent a klorofill *a/b* arány. Szintén csökkent a klorofillidek mennyisége, míg a OH-klorofilok és a feofitin mennyisége emelkedett.

A karotinoidok mennyiségében is jelentős változásokat figyelhattunk meg a növekvő koncentrációjú Cr(VI) kezeléseket követően. Amíg az α -

karotin mennyisége csökkent, a β -karotin mennyisége emelkedett, a Cr(VI) stressz következményeként a β/α - karotin arány a duplájára emelkedett.

A Cr(VI)kezelést követően jelentős változások álltak be a szabad aminosavak mennyiségében is. Az összes szabad aminosav mennyisége 5 mg dm^{-3} Cr(VI) kezelési koncentrációig növekedett, ezután csökkenő tendenciát mutattak. A stresszfiziológiai szempontból fontos prolin mennyisége 5 mg dm^{-3} koncentrációig növekedett a 72 órás kezelés alatt, hasonlóan az összes szabad aminosav mennyiségéhez. A cisztein mennyiségének Cr(VI) kezelés hatására bekövetkező mennyiségi változása hasonló trendet mutatott, mint a S tartalom változása a mikroelem összetétel vizsgálat esetében. Mintegy hét aminosav esetében tapasztalhattunk jelentős eltéréseket a kontroll algákéhoz képest. Többségük fiziológiai háttere még tisztázásra vár.

5.4. Az oxidatív stressz kivédésében fontos szerepet játszó oxidoreduktázok aktivitásának változása

A fotoszintetikus pigmentek vizsgálata során tapasztalt számos oxidációs termék jelenléte arra utalt, hogy az algasejtekben komoly oxidatív, peroxidatív folyamatok mentek végbe Cr(VI) kezelés hatására. Mivel a Cr(VI) erős oxidáló ágens, célszerűnek tartottuk megvizsgálni, a sejtekben lipidperoxidáció hatására keletkező malondialdehid (TBRI) mennyiségét. Az alkalmazott Cr(VI) koncentrációjának növekedésével többszörösére nőtt a lipidperoxidációs végtermékek mennyisége, mind a kiindulási, mind pedig a mindenkori kontroll mintához viszonyítva.

A guajakol-peroxidázzal végzett előzetes kísérleteink alapján a kezelés koncentrációjának és időtartamának előrehaladásával növekedett az enzim aktivitása, magasabb koncentrációknál már az első nap végén elérte a maximumot, majd onnan csökkenést mutatott.

Az aszkorbinsav-peroxidáz aktivitása $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ Cr(VI) koncentrációnál nem mutatott eltérést a kontrollhoz képest, a többi mintánál az enzimaktivitások, már az első nap végére elérték maximumukat, majd csökkenni kezdtek.

A kataláz aktivitásában beálló változások némileg eltérő képet mutattak. Az alacsonyabb és a legmagasabb koncentrációk esetében csökkent, $1-10 \text{ mg dm}^{-3}$ értékeknél pedig nőtt az enzim aktivitása.

Vizsgálataink egyértelműen alátámasztják azokat az elképzeléseket, hogy nehézfém stresszek során jelentős oxidatív, peroxidatív jelenségek zajlanak le a növényi sejtekben, melyek számos fiziológias folyamat hatékonyságát is meghatározhatják, befolyásolhatják.

5.5. Fitokelatin szintáz aktivitásának változásai

Nehézfémmel terhelések során gyakran jelennek meg a növényekben speciális nehézfémkötő proteinek, a fitokelatinok. A nehézfémmel detoxikálásban játszhatnak fontos szerepet, bár ez nem minden fém esetében tűnik bizonyítottnak. Cr(VI) kezelés hatására, még nem álltak rendelkezésre mérési adatok. Vizsgálataink során először mi mutattunk ki fitokelatin szintáz aktivitást növényben Cr(VI) kezelés hatására. Az enzim aktivitása már a legalacsonyabb koncentrációban is megemelkedett, aktivitásának maximumát az első nap végére érte el, ezután csökkenő tendenciát tapasztalhattunk.

5.6. Fotoszintetikus aktivitásban beálló változások

A fotoszintetikus fluoreszcencia indukció vizsgálata elfogadott módszer egy növény fotoszintetikus hatékonyságának vizsgálatára. A mért paraméterek adatai arra is alkalmasak lehetnek, hogy megmondják, a fotoszintetikus apparátus melyik komponense sérült. Vizsgálatainkat üvegmembránra szűrt, valamint tápoldatban levő algákon is elvégeztük. Mérési eredményeink arra utalnak, hogy a két különböző módszerrel mért adatok összevethetőek, a mért változások trendje hasonló.

Alacsony (1 mg dm^{-3}) koncentrációjú Cr(VI) kezeléseket esetében nem volt lényeges eltérés a minták F_0 és F_m értékei között, magasabb koncentrációk irányában az F_0 értéke emelkedett. Ez a hatás a sejtek PSII pigmenttartalmának csökkenésével hozható kapcsolatba. Ezzel ellentétes irányban változtak meg a kezelt sejtek F_m értékei, melyek a magasabb koncentrációjú minták esetében csökkentek. Ezek a változások a PSII és tilakoidstruktúra megváltozására utalhatnak.

A fotoszintetikus hatékonyság egyik legelfogadottabb paramétere az F_v/F_m mindkét vizsgálati módszer esetében hasonló eredményt hozott. A növekvő kezelési koncentrációval értéke folyamatosan csökkent. Az F_m/F_0 értékekben beállt változások is a fotoszintézis hatékonyságának csökkenését mutatták.

A fejlődött oxigén mennyisége csökkent az idő és a Cr(VI) koncentráció függvényében. PpBQ jelenlétében - ami a PSII mesterséges elektronakceptora - a csökkenés lassabban következett be, ami arra utal, hogy a fotoszintézis elsődlegesen a PSII mögött gátolt.

5.7. Szénhidrát-anyagcserében beálló változások

A szénhidrátok közül elsősorban a keményítő mennyisége csökkent a növekvő Cr(VI) koncentrációval, a mono és diszaharidok esetében a csökkenés csak a magasabb koncentrációknál következett be.

A szénhidrát-anyagcsere szabályozó enzimek aktivitásában beállt változások jellemzőjeként megállapíthatjuk, hogy a glikolitikus irányú folyamatok katalíziséért felelős PFK és PFP enzimek aktivitásában nem tapasztaltunk jelentős változást, addig a glikoneogenetikus folyamatot katalizáló FBP-áz aktivitása csökkent. 10 mg dm⁻³ koncentráció Cr(VI) esetében mindegyik enzim aktivitása csökkent, ami valószínűleg már egy összetettebb, általános anyagcsere gátló hatással magyarázható.

Összegzésként megállapíthatjuk, a *Chlorella pyrenoidosa* képes felvenni a Cr(VI)-ot és akkumulálni, bár a növekedési paramétereket csökkenti. Ugyan a *Chlorella* sejtek nem tekinthetők króm hiperakkumulátornak, további kísérleteink célja annak vizsgálata, hogy milyen szerepet játszhatnak nehézfémek által szennyezett vizek fitoremediációjában. Mintegy 10 mg dm⁻³ koncentrációig a sejtek hatékonyan alkalmazzák a nehézfém stresszek elleni védekezőmechanizmusokat, valamint képesek megkötni a krómot. Ettől magasabb koncentrációk azonban a sejtanyagcsere összeomlásához vezetnek.

Fontosnak tartjuk, más fotoszintetizáló vízi szervezetek (pl. *Lemna* fajok) esetében is megvizsgálni a Cr(VI) toxicitását, különös tekintettel a redoxválaszokra és a fitokelatin szintézisre. Tervezzük a Cr(VI) más nehézfém-ionokkal való intermetallikus toxicitásának vizsgálatát is.

6. Summary

6.1. Introduction and objectives

In our environment, living organisms are exposed to various burdens, which limit their activity, development processes and other possibilities. These burdens are produced partly by abiotic and biotic factors and partly by antropogenous sources such as heavy metal contamination. The aforementioned effects are known as stressors. In the organisms, stressors produce short-term and long-term responses which promote acclimation and acclimatization as well as adaptation and resistance. Acclimation and acclimatization ensure the survival for the individuals, while adaptation is a permanent capability of resistance, which develops for generations and leads to the evolvement of resistance.

Different stressors result in stress responses, which can be specific or general as well. Considering the relatively long lifetime of a plant generation and the fixed life form of most plant species, role of acclimation seems to be remarkably important.

Soluble heavy metal ions and their complex compounds with various inorganic components cause serious problems through the contamination of both the soil and the surface and subsurface waters. Macro- and micro-ecological analyses of industrial heavy metal contaminants have been carried out particularly, however, their molecular effects are not widely known. In waters, contaminating agents primarily influence the life processes of algae and other microorganisms, while mostly the environmental damages can be well detected in case of more complicated organisms.

In photosynthetic organisms, heavy metal stresses result in characteristic modifications (plasma membrane damages, formation of oxygen radicals, appearance of free metal ions in cytosol, disorders of nutrient uptake, water balance and photosynthesis, limited growth, reduced production of flowers and seeds), which attribute to both direct and indirect effects.

As chromium is a toxic heavy metal, which often gets to the environment in large quantities, the aim of our researches was the determine its effects on certain metabolic processes of a well known species of green algae (*Chlorella pyrenoidosa*). Chromium was selected for analysis because molecular mechanisms of its effects on living organisms are not widely known, however these mechanisms are under investigation presently as well. Use of algae provides new opportunities to reveal the

processes of indication, accumulation, and elimination. Various species of algae are often able to accumulate large amount of heavy metals. In algae, the uptake and fixation of these heavy metals usually lead to redox processes, which transform a given heavy metal ion into a less soluble form. Additionally, this heavy metal form is less effective for living organisms. Indirectly, our study examines the possibilities of using of green algae in the restoration of a heavy metal contaminated wetland.

During our researches, we examined the effects of Cr (VI) on the reproduction of *Chlorella pyrenoidosa* green algae species. Main metabolic processes which mostly characterize heavy metal stresses were also investigated.

- How does Cr(VI) influence the reproduction, growth and biomass changes of *Chlorella pyrenoidosa* green algae species?
- Are green algae cells able to accumulate chromium? What distribution of Cr(VI) can be observed within a cell? What are the tendencies of changes in the micro-element composition of cells under the influence of Cr(VI) treatments?
- What changes can be observed in the composition and pattern of photosynthetic pigments and total amino acid content (with especial regard to stress-physiologically important prolin) of cells under the influence of Cr (VI) treatments?
- What changes occur in the extent of photosynthetic effectiveness? Are these modifications caused by direct or indirect effects? What changes occur in carbohydrate metabolism? What are the metabolic and enzymatic consequences?
- What changes can be observed in the activities of oxidoreductases (ctalases, peroxidases), which control the prospective oxidative stress after heavy metal treatments?
- Under the influence of Cr(VI) treatment, can we find special heavy metal fixing proteins (phytochelatins) or can we experience the induction of enzymes which are necessary to their synthesis?

6.2. Materials and Methods

6.2.1. Algal cultures

The algae used in this study were *Chlorella pyrenoidosa* (strain IAM-C128) obtained from the collection of the Institute of Applied

Microbiology, University of Tokyo (Japan). Chemicals were purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA), and Serva Fine Biochem. GmbH. (Heidelberg, Germany).

Algae were maintained on agar. Cells were grown in sterile tubes containing synthetic media modified C-30. Cultures were aerated by filtered air bubbled with 5% CO₂ which served as a carbon source and stabilized the algal suspension homogeneity and pH at 7.2. Cells were permanently illuminated with white fluorescent light (18 Wm⁻²) and were kept at 25 °C during the growing period.

6.2.2. Treatment of algae with chromium compounds

Potassium dichromate was used as hexavalent chromium. The cultures were grown for 3 in some case 4 days. When cultures reached approximately 1x10⁵ cells ml⁻¹ in the nutrient medium, algae were treated with 0.1 - 50 mg dm⁻³ of chromium (VI). We used K₂Cr₂O₇ as hexavalent and Cr₂(SO₄)₃ as trivalent chromium. For each experiment a control was also prepared of untreated *Chlorella pyrenoidosa* cells kept at the same conditions. Algae were autotrophically propagated for 72 hours after chromium treatments.

6.2.3. Analysis of growth rate

The growth rate of algae cultures was followed by 1.) indirect turbidometric assay, and 2.) direct count using hemocytometer.

6.2.4. Fractionation of algal cells and elemental analysis

For fractionation algal cells were harvested by centrifugation at 5000g × 10 min, were washed twice with deionized water, centrifuged, and the weight of the cells was determined. This type of sample was considered as whole cells (sample 1). These prepared cells were disrupted using French press at 1500 kgf/cm² three times. The homogenate was centrifuged at 3000g × 20 min and the pellet was allowed to stand in 1 ml of 0.5 % sodium n-dodecyl sulphate (SDS) for 30 min. The homogenate with SDS was centrifuged at 10000g × 20 min to remove the soluble component, and the pellet was boiled in 80% ethanol for 20 min. The cell wall fraction was prepared by centrifuging the ethanol boiled pellet at 10000g × 20 min

(sample 2). The miscellaneous fraction was prepared as the mixed supernatant after the treatment with SDS and ethanol (sample 3). The homogenate was centrifuged $15000g \times 45 \text{ min}$ after disruption of cells. The pellet was the membrane fraction (sample 4) and the supernatant was the soluble fraction (cytoplasmic) (Okamura and Aoyama 1994).

The water of the supernatants was evaporated before digestion. Samples were digested for a day in concentrated HNO_3 and 30% H_2O_2 mixture (6:1 v/v rate), and dried. The mineralized residue was redissolved in 5 ml of 2N HNO_3 solution. The elemental composition was measured by a Spectroflame-type inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer (ICP-AES) (Spectro GmbH Kleve, Germany) with the following parameters: plasma gas $1.6 \text{ dm}^3\text{min}^{-1}$, nebulizer gas $0.6 \text{ dm}^3\text{min}^{-1}$, coolant gas $15 \text{ dm}^3\text{min}^{-1}$, excitation 27 MHz, 1.05 kW cross flow nebulizer.

6.2.5. Extraction of photosynthetic pigments of algae and their separation by HPLC

When individual photosynthetic pigments were separated by HPLC technique algae pigments were extracted with a mixture of chloroform – acetone – isopropyl alcohol (2:1:1 v/v) at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, the analytical procedure was detailed formerly (Simon 1989).

6.2.6. Amino acid analysis

To determine free amino acid and proline content 200 mg fresh algae were shaken in 2 ml of 7% trichloroacetic acid for two hours, then they were filtered through paper filter and membrane filter ($0.45 \text{ }\mu\text{m}$). The analysis was carried out using Biotronik LC 3000 amino acid analyzer (Galiba 1992).

6.2.7. Photosynthetic measurements

The rate of oxygen evolution of intact algal cells was measured by using a Clark-type oxygen electrode (Hansatech, Kings Lynn, UK) at a chlorophyll concentration of $10\text{-}20 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ in a temperature controlled cell at a constant $25 \text{ }^\circ\text{C}$ in cultivation medium at saturating light intensity. The

PS II electron transport rate was measured in the presence of 500 μM phenyl-p-benzoquinone.

The fluorescence induction was recorded and calculated at room temperature by using PAM-2000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) chlorophyll fluorometer. Prior to measurement the intact algal cells were dark adapted for 5-30 minutes. The initial fluorescence level (F_0) was measured with a weak read measuring light at a modulation frequency of 1.6 kHz. The maximal fluorescence (F_m) was obtained by a saturating white light pulse with 0.4 s duration. After F_0 determination, Kautsky effect was determined upon 5 s long actinic illumination at a photon flux density of $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ equal to the cultivation light intensity. We investigated the F_0 , F_m , F_v/F_m és F_m/F_0 parameters.

6.2.8. Assay of carbohydrate-metabolism

All procedures were carried out at 4 °C. Collected *Chlorella pyrenoidosa* cells were suspended in isolation buffer and ground in mortar with sand. The extract was centrifuged and fractionated by PEG 6000 (13-25%) and the resulting pellet were redissolved and used in all enzyme activity examination.

For sugar determination the crude extract were used, without PEG fractionation, by HPLC technique on Sarasep Polymer H column, by Shodex RI refractive detector.

Starch determination were carried out as described earlier (Rose et al. 1991).

Phosphofructokinase és pyrophosphate dependent phosphofructokinase were partially purified by PEG 6000 fractionation and measured by photometrically in a coupling enzyme reaction (Kiss et al. 1989)

Fructose-1,6-bisphosphatase activity was also partially purified and assayed spectrophotometrically by coupling the reaction to the reduction of NADP with phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and measuring the change in 340 nm.

6.2.9. Assay of peroxidase and catalase activity

All procedures were carried out at 4 °C. Collected alga cells were suspended, in isolation buffer and ground in a mortar with sand. The

extract was centrifuged and the resulting supernatant was used in all enzyme activity examination.

Guajacol peroxidase activity was measured, by recording changes in absorbance at 480 nm. The brown colour developed due to the oxidation of guajacol as hydrogen donor in the presence of H₂O₂ was spectrophotometrically measured (Simon et al. 1989).

Ascorbate peroxidase activity was measured by recording changes in absorbance at 290 nm, while catalase activity was measured at 240 nm (Janda et al 2000).

6.2.10. Phytochelatin synthase assay

All procedures were carried out at 4 °C. Collected alga cells were suspended, in isolation buffer and ground in mortar with sand. The extract was centrifuged and the resulting supernatant was used in all enzyme activity examination.

The reaction mixture (200 mM Tris-HCl buffer (pH 8,5), 0.5 mM CdCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM glutathion and 0.2 ml extract in 0.3 ml final volume) were incubated for an hour at 37 °C, and were terminated by 0.03 ml 50% sulphosalicylic acid. Control samples were terminated without incubation at 0 min. Proteins were precipitated on ice, for 10 minutes. After centrifugation, the supernatants were assayed by HPLC technique.

Phytochelatin were separated on Li Chromospher 100 (250 × 4 mm) RP18 (5µm) (Merck Darmstadt, Germany). Thiol containing peptides were determined using postcolumn derivatization with DTNB (Chen et al. 1997).

Protein amount was analysed according to Bradford (Bradford 1976.).

The results are the means of 3-5 replications for each treatment. Three independent repetitions were performed for each experiment. The data were statistically evaluated calculating the standard deviation, and by statistical analysis using Tukey's b-test.

6.3. New scientific results

The dissertation examines the effects of toxic heavy metal ions Cr(VI) and Cr(III) on certain metabolic processes of *Chlorella pyrenoidosa* green algae species. Since its photosynthetic apparatus is similar to that of vascular plants, *Chlorella pyrenoidosa* is a popular and common test

organism of biochemical and stress-biological experiments; however it can be described by a rapid reproduction. Consequently, it allows to perform a large number of tests and repetitions. These test are easy to reproduce and control.

6.3.1. Effects of Cr(VI) on the reproduction of *Chlorella pyrenoidosa*

Cr(III) treatment did not result in important changes in neither parameters, while in case of Cr(VI) treatments, there was significant modifications in all parameters. Value of EC_{50} was 2 mg dm^{-3} , which is considered to be high in case of photosynthetic organisms.

6.3.2. The composition of micro-elements and the accumulation of chromium

Our measurements determined the amounts of 21 elements in the whole cell. The results suggest that increasing of Cr(VI) treatment lead to the decrease of Na, P, Fe and Mg concentrations and the increase of Ca and Cr content. Less than 5 mg dm^{-3} Cr(VI) concentrations resulted increasing S content, while higher Cr(VI) concentrations caused decreasing S content. All of the examined elements were localized primarily in cell wall, while distribution was the same between the membrane and the soluble fractions.

6.3.3. Changes in the amounts of photosynthetic pigments and free amino acids

Increasing concentrations of Cr(VI) treatments lead to decreasing chlorophyll content. Amount of α -carotin decreases, while β -carotin content increases. As a consequence of Cr(VI)-stress, rate of β/α -carotin doubles. Less than 5 mg dm^{-3} Cr(VI) concentrations lead to increasing amounts of total free amino acids, which show decreasing tendency when Cr(VI) concentrations exceed 5 mg dm^{-3} . During 72 hours-long treatments, amount of stress-physiologically important prolin increases to 5 mg dm^{-3} Cr(VI) concentrations, similarly to the total amount of free amino acids.

6.3.4. Changing activities of oxidoreductases as important factors of the protection against oxidative stress

On the basis of our preliminary examinations with guajakol peroxidase, increasing concentrations and periods of treatment lead to increasing enzyme activities. In case of higher concentrations, enzyme activity reaches its maximum for the end of the first day, while later it decreases. In case of 0.1 mg dm^{-3} Cr(VI) concentrations, ascorbic acid peroxidase activity did not differ from the control. In case of the other samples, enzyme activities reached their maximum for the end of the first day, and later they began to decrease. Activity of catalase shows slightly different alterations. The lower and the highest concentrations decreased this enzyme activity, while $1-10 \text{ mg dm}^{-3}$ concentration increased it.

6.3.5. Alterations in the activity of phytochelatine synthase

Phytochelatine synthase activity in photosynthetic organism under the influence of Cr(VI) was firstly proved by our measurements. The lowest concentrations were enough to increase the enzyme activity, which reached its maximum for the end of the day and then it showed declining tendency.

6.3.6. Changes in the photosynthetic activity

In case of low (1 mg dm^{-3}) Cr(VI) concentrations, F_0 and F_m values of samples did not show significant differences, but increasing concentrations led to increasing F_0 values. This can be explained by the declining amount of PS II pigments in cells. Oppositely, F_m values of treated cells decreased with the increasing concentrations. These changes may suggest the modifications of PSII and the thylacoid structure. F_v/F_m values decreases as treatment concentrations increases. Changes of F_m/F_0 values also point to the declining photosynthetic effectiveness. Amount of developed oxygen decreases as a function of time and Cr(VI) concentration. In the presence of PpBQ, which is an artificial electron acceptor of PSII, this declining process is slower suggesting that photosynthesis is primarily limited behind the PS II.

6.3.7. Carbohydrate metabolism

Increasing Cr(VI) concentrations lead to decreasing amount of starch. Decreasing concentrations of mono- and disaccharides were found only at higher Cr(VI) concentrations. We did not find significant differences in the activities of PFK and PFP enzymes, which are responsible for the glycolytic processes, while decreasing activity was measured by FBP-ase, which catalyses the gluconeogenic process.

In conclusion, we can establish that *Chlorella pyrenoidosa* is able to uptake and accumulate the Cr(VI), however it changes growth parameters. In spite of the fact that *Chlorella* cells can not be regarded as hyperaccumulators, we examine their possible role in the phytoremediation of heavy metal contaminated waters. Cells have a protecting mechanism against heavy metal stress, which is effective only when concentration is below 10 mg dm^{-3} . Additionally, cells are also able to fix the chromium, but higher concentrations lead to the collapse of cell metabolism.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek: Dr. Mészáros Ilonának, aki a kísérletek minden szakaszában segítségemre volt hasznos tanácsaival, szigorával, Dr. Lakatos Gyulának a dolgozat többszöri átolvasásáért és nem utolsósorban Dr. Balogh Árpádnak, akinek laboratóriumában elkezdtem a kutatómunkát, valamint szellemileg és anyagilag is támogatta ennek a dolgozatnak a létrejöttét.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kiss Ferencnek, aki megismertetett az „algázás” és az enzimológia alapjaival. Dr. Simon Lászlónak aki mikroelemek-nehézfémek és mikroszervezetek közötti kölcsönhatások fontosságára hívta fel figyelmemet.

Köszönöm Dr. Csintalan Zsoltnak és Dr. Vincze Györgynek a dolgozat kritikai átolvasását, bírázataikat, ötleteiket és hasznos tanácsaikat.

Szeretném megköszönni Dr. Láposi Rékának és Dr. Kovács Lászlónak a fotoszintetikus paraméterek méréséhez nyújtott segítségüket, valamint Dr. Garab Győzőnek, hogy lehetővé tette, hogy laboratóriumának eszközeit korlátlanul felhasználhassam.

Ugyancsak köszönettel tartozom Dr. Szalai Gabriellának, aki a fitokelatin szintázzal kapcsolatos vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében is a segítségemre volt.

Hálával tartozom a módszertani segítségért, ötletekért Dr. Leskó Kornéliának, Dr. Daood Hussein-nek és Dr. Kovács Bélának.

Köszönöm a kollégáim lelkesítő támogatását, amivel sokszor átlendítettek a kutatási holtponatokon.

A kísérletek elvégzéséhez és a dolgozat elkészítéséhez a Nyíregyházi Főiskola Tudományos Bizottsága is anyagi segítséget nyújtott, amelyet ezúton is köszönök.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani édesanyámnak és családomnak a türelmükért és a biztatásukért.

8. Irodalomjegyzék

- Adriano, D.C. Trace elements in the terrestrial environment. Springer Verlag, New York, 1986, 156-180.
- Ahluwalia, A.S., Kaur, M. Effect of some heavy metal compounds on growth and differentiation in blue-green algae. *Microbios*. 1988, 53: 37-46.
- Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 1949, 24: 1-15.
- Ayoub, G.M., Sayigh, B.A. The effects of removal of chromium in *Chlamydomonas* sp. *Tox. Asses*. 1987, 2: 253-264.
- Baker, A.J.M., Brooks R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1989, 1: 81-126.
- Balázs, Sz., Horváth, L.I., Debreczeny, M., Droppa m., Horváth, G. Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photos. Res*. 1999, 61: 241-252.
- Barcelo, J., Paschenrieder, Ch., Gunse, B. Effect of Cr(VI) on mineral element composition of bush beans. *J. Plant Nutrition*. 1985, 8: 211-217.
- Barcelo, J., Paschenrieder, Ch., Gunse, B. Water relations of chromium treated bushbean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) under both normal and water stress conditions. *J. Exp. Bot*. 1986, 37: 178-187.
- Bartlett, R.J. Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods. *Environ. Health Persp*. 1991, 92: 17-24.
- Bartlett, R.J., Kimble J.M. Behavior of chromium in soils I. Trivalent forms. *J. Environ. Qual*. 1976(a), 5: 379-383.
- Bartlett, R.J., Kimble, J.M. Behavior of chromium in soils II. Hexavalent forms. *J. Environ. Qual*. 1976(b), 5: 383-386.
- Bassi, M., Corradi, G., M., Realini, M. Effects of chromium (VI) on two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*. *Citobios*. 1990, 62: 27-38.
- Baszynski, T., Wajda, L., Krol, M., Walinska, D., Drupa Z., Tukendorf, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant*. 1980, 48: 365-370.
- Bishnoi, N.R., Dua, A., Gupta, V.K., Sawhney, S.K. Effect of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. *Agricult. Ecosyst. Environ*. 1993, 47: 47-57.
- Bopp, L.H., Ehrlich H.L. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Arch. Microbiol*. 1988, 150: 426-431.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976, 72: 248-256.
- Broadhurst, C.L., Chaney, R.L., Angle, J.S. Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant and Soil*. 2004, 265: 225-242.

- Bopp, L.H., Ehrlich H.L. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Arch. Microbiol.* 1988, 150: 426-431.
- Cary, E.E., Kubota, J. Chromium concentration in plants: Effects of soil chromium concentration and tissue contamination by soil. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38: 108-114.
- Chaney, R., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8: 279-284.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., Ferjani, E.E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 1997, 127: 139-147.
- Chen, J., Zhou, J., Goldsbrough, P.B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* 1997, 101: 165-172.
- Chen, J., Goldsbrough, P.B. Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant Physiol.* 1994, 106: 233-239.
- Clarke, N.D., Berg J.M. Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. *Science* 1998, 282: 2018-2022.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* 1998, 18: 3325-3333.
- Clemens, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 2001, 212: 475-486.
- Clemens, S., Schroeder, J.I., Degenkolb, T. *Caenorhabditis elegans* expresses functional phytochelatin synthase. *Eur. Journal of Biochem.* 2001, 268: 3640-3643.
- Clijsters, H., Van Assche F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.* 1985, 7: 31-40
- De Vos, C.H.R., Vooijs, R., Schat, H., Ernst, W.H.O. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J. Plant Physiol.* 1989, 135: 165-169.
- DeFilippi, L.J., Lupton, F.S. Bioremediation of soluble Cr(VI) using sulfate reducing bacteria. *Allied Signal Research: National RD Conference on the Control of Hazardous Materials* 1992, 138-141.
- DeFilippis, L.F., Hampp, R., Ziegler, H. The effects of zinc and mercury on *Euglena*. Growth and pigments. *Z. Pflanzenphysiol* 1981, 101: 37-47
- Demeter, S., Droppa, M., Vass, I., Horváth, G. The termoluminescence of chloroplasts in the presence of photosystem II herbicides. *Photobiochem. Photobiophys.* 1982, 4: 163-168.
- Dubey, S.K., Rai, L.C. Effect of chromium and titanium non survival, growth, carbon fixation, heterocyst differentiation, nitrogenase, nitrate reductase and glutamine synthase activities of *Anabaena doliolum*. *J. Plant Physiol.* 1987, 130: 165-172.
- Eary, L.E., Rai, D. Kinetics of chromium (III) oxidation to chromium (VI) by reaction with manganese dioxide. *Environ. Sci. Technol.* 1987, 21: 1187-1193.
- El-Enany A.E., Issa, A.A. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. *Folia Microbiol.* 2001, 46: 227-230.

- Eliseeva, G.S., Klyushnikova, T.M., Kasatkina, T.P., Serpokyrov, N.S. Reduction of Cr(VI) by microorganisms in media with inedible plant raw material. *Khimia i Tekhnologiya Vody* 1991, 13: 72-75.
- Erdei, S., Hegedűs, A., Hauptmann, G., Szala, J., Horváth, G. Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system. *Acta Biol. Szegediensis* 2002, 46: 89-90.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, J.K. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plantarum* 1994, 92: 696-717.
- Gaines, R.W. West San Joaquin Valley agricultural setting. Prepared for US. Bureau of Reclamation. Contract No. 7-CS-20-05230. 1988,
- Galiba, G., Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Salgo, A., Sutka, J. Possible chromosomal location of genes determining the osmoregulation of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1992, 85: 415-418.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E-L., Zenk, M.H. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, 230: 674-676.
- Guillizzoni, P., Adams, MS., Mac-Gaffey, N. The effect of chromium on growth photosynthesis of a submerged macrophyte, *M. spicatum*. In *Ecotoxicology* ed. Rasmussen Okikos Conf. *Ecol. Bull.* 1984, 36: 90-96.
- Hegedűs, A., Erdei, S., Horváth, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 2001, 160: 1085-1093.
- Hervey, R. Effects of chromium on the growth of unicellular Chlorophyceae and diatoms. *Bot. Gaz.* 1949, 111: 1-11.
- Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S., Kawai, K. Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51: 2417-2420.
- Hochman, Y., Lanir, A., Werber, M.M., Carmeli, C. The effect of binding of cobalt(III) - nucleotide complexes on the kinetic properties of adenosine triphosphatase activity in coupling factor I from chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979, 192: 138-147.
- Howden, R., Goldsborough, P.B., Andersen, C.R., Cobbet. C.S. Cadmium sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* 1995, 107: 1059-1066.
- Hörsik, T. Zs., Balogh, Á. Intracellular distribution of chromium and toxicity on growth in *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biologica Szegediensis* 2002, 46 (3-4): 57-58.
- Hörsik T.ZS., Szalay G., Pál M., Oláh V., Mészáros I., Lakatos Gy., Balogh Á. Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására. *Hidrológiai Közlöny* 2004, 84: 50-52.
- Hörsik, T.Zs., Szalay, G., Pál, M., Oláh, V., Mészáros, I., Lakatos, G., Balogh, Á. Szénhidrát-anyagcsere változása *Chlorella pyrenoidosa*-ban Cr(VI) és Cd stressz hatására. *Hidrológiai közlöny.* 2005, 85 (6): 47-49).
- Hörsik, T. Zs., Mészáros, I., Balogh, Á., Lakatos, G. Effect of chromium(VI) and cadmium on growth, photosynthetic pigment composition and oxidoreductases

- activity of *Chlorella pyrenoidosa*. 2005, Book of abstracts, Shallow Lakes, Dalhsen. 81.
- Hörcsik T.ZS., Láposi R., Mészáros I., Simon L., Balogh Á., Lakatos Gy. Effect of Chromium (VI) on growth, elemental and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biol. Szegediensis* 2006, 50(1-2) 19-24.
- Hörcsik, T. Zs., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Lakatos, G., Garab, G. Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Photosynthetica* 2007. 45 (1): 65-69.
- Hua, B.G., Mercier, R.W., Leng, Q. Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel. *Plant Physiol.* 2003, 132: 1353-1361.
- Hunter, J.G., Vergnano, O. Trace element toxicities in oat plants. *Ann. Appl. Biol.* 1953, 40: 761-777.
- Janda, T., Szalai, G., Antunovics, Zs., Horváth, E., Páldi, E. Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 2000, 45:29-33
- Kato, M., Smimizu, S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol.* 1985, 26: 1291-1301.
- Kinraide, T.B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil.* 1991, 134: 167-178.
- Kiss. F., Johnson, T.C., Klecan, A.L., Vincze, Gy., Buchanan, B.B., Balogh, Á. Identification of two forms of PFK and fructose-2,6-bisphosphate independent form of PFP in a green alga. *Photosynthesis Res.* 1989, 21: 123-128.
- Klapheck, S., Fliegner, W., Zimmer, I. Hydroxymethyl phytochelatins (γ -glutamylcysteine)n-serine are metal induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol.* 1994, 104: 1325-1332.
- Koeppen, A.H., Dickson, A.C. Tin protoporphyrin prevents experimental superficial siderosis in rabbits. *J. Neuropath. Exp. Neur.* 2002, 61: 689-701.
- Kosugui, H., Kikugawa, K. Potential thiobarbituric acid reactive substances in peroxidized lipids. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1989, 7: 205-207.
- Kotás, J., Stasicka, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Poll.* 2000, 107: 263-283.
- Kovács Á., Simon-Sarkadi L., Mincsovics E. Stepwise gradient separation and qualification of dansylated biogenic amines in vegetables using personal OPLC instrument. *J. Planar Chromatography* 1998, 11: 43-46.
- Kőrös, E. *Bioszervetlen kémia*, Gondolat kiadó, 1980, 100-101.
- Knauer, K., Behra, R., Sigg, L. Effects of free Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Env. Toxicol. Chem.* 1997, 16: 220-229.
- Krause, G.H., Weiss, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photos. Res.* 1984, 5: 139-157.
- Krause, G.H., Weiss, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1991, 42: 313-349.
- Krauskopf, K.B. *Introduction to geochemistry*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1979.

- Krupa, Z., Ruszkowski, M., Gilowska-Jung, E. The effect of chromate of the synthesis of plastid pigments and lipoquinones in *Zea mays* L. seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1982, 51: 275-281.
- Krupa, Z., Öquist, G., Huner, N.P.A. The influence of cadmium on primary photosystem II photochemistry in bean as revealed by chlorophyll a fluorescence. *Acta Physiol. Plant.* 1992, 14: 71-76.
- Kvasnikov, E.I., Serpokrylov, N.S., Klyushnikova, T.M., Kasatkina, T.P., Zukov, I.M., Tokareva, L.L. Optimatization of a nutrient medium for *Aeromonas dechromatica* reducing Cr(VI). *Khimia i Tekhnologiya Vody* 1986, 8: 64-66.
- Lakatos G. Phytoremediation: theory and practice. Proceedings of International Environment School. Impact of hazardous compounds on water resources. Risk assessment and remediation strategies. DAAD and Prague Institute of Technology, Prague 2000, 1-25.
- Lakatos G., Mészáros I., Simon L., Tóth A., Kiss M. Phytoremediation and phytoextraction as new methods in environmental protection. *Acta Pericomonologia Debrecina* 2001, 1: 100-107.
- Lane, B., Kajioka, R., Kennedy, T. The wheat germ Ec protein is a zinc - containing metallothionein. *Biochem. Cell Biol.* 1987, 65: 1001-1005.
- Langard, S. In: Waldron, H.A. (ed.) *Metals in the environment*. Academic Press, New York, 1980, 111-132.
- Laskay G., Lehoczy E. A növényeket érő környezeti hatások kimutatásának gyors és érzékeny módszere: A fluoreszcencia indukció I. A fluoreszcencia indukció és a fotoszintézis kapcsolata. *Bot. Közl.* 1989, 76: 193-213.
- Lawrence, Q. *Physical methods in Bioinorganic chemistry*, University of Science Books, 2000.
- Lee, H.L., Lustigman, B., Schwinge, V., Chiu, I.Y., Hsu, S. Effect of mercury and cadmium on the growth of *Anacystis nidulans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1992, 49: 272-278.
- Leroux, D. The influence of various trace elements on the fixation of atmospheric nitrogen in the course of the growth of the legume. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 1941, 212: 504-507.
- Leskó, K., Stefanovits-Bányai, É., Simon-Sarkadi L. Effect of cadmium and magnesium on free amino apolyamines and peroxidase enzyme activity in wheat seedlings. *Cereal Res. Comm.* 2002, 30: 103-110.
- Lindsey, P.A., Lineberger, R.D. Toxicity, cadmium accumulation, ultrastructural alteration induced by exposure of *Phaseolus* seedlings to cadmium. *Hort. Sci.* 1981, 17: 70.
- Lipskaya, G.A. Accumulation of chlorophyll in the chloroplast of sugar beets to which cobalt is applied separately and in combination with boron, manganese, copper, zinc and molybdenum. *Agrokimiya* 1970, 2: 105-110.
- Losi, M.E., Amrhein, C., Frankenberger, W.T.Jr. Environmental biochemistry of chromium. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1994, 136: 91-121.
- Lustigman, B., Lee, L.H., Khalil, A. Effects of nickel and pH on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1995, 55: 73-80.

- MacFarlane G.R. Chlorophyll a fluorescence as a potential biomarker of zinc stress in the grey mangrove. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2003, 70: 90-96
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* 1996, 110: 1145-1150.
- Makino, T., Kamewada, K., Hatta, T., Takahashi, Y., Sakurai, Y. Determination of optimal chromium oxidation conditions and evaluation of soil oxidative activity in soils. *J. Geochem. Explor.* 1998, 64: 435-441.
- Mangi, J., Schmidt, J.K., Pawkow, L., Gains, L. and Turner, P. Effect of the chromium on some aquatic plants. *Environ. Poll.* 1978, 16: 285-291.
- Mallick, N., Rai, L.C. Effects of heavy metals on the biology of a N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Toxic. Asses.* 1990, 5: 207-219.
- Mathews, N.A., Morning, J.L. In: US Bureau of mines, minerals yearbook 1978-79. Vol 1. Metals and Minerals, US Dept. of Interior, Washington DC. 1980, 193-205.
- Mathys, W. The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants. *Physiol. Plant.* 1977, 40: 130-136.
- Meisch, H.U. and Schmitt-Beckmann, I. Influence of tri- and hexavalent chromium on two *Chlorella strians*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 1979, 94: 231-239.
- Mertz, W. Chromium occurrence and functions in biological systems. *Physiol Rev.* 1969, 49: 165-239.
- Miensch, J., Tschimedbashir, M., Barlocher, F., Grams, Y., Pierau, B., Schierhorn, A., Kraus, G.J. Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. *Mycol. Res.* 2001, 105: 883-889.
- Milone, M.T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ. Experiment. Bot.* 2003, 50: 265-276.
- Misra, N., Dwiedi, U.N. Carbohydrate-metabolism during seed germination and seedling growth in green gram under saline stress. *Plant Phys. Biochem.* 1995, 33: 33-38.
- Mocquot, B., Vangrosveld, J., Clijsters, H. Mench, M. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: Effect on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities *Plant and Soil.* 1996, 182: 287-300.
- Moral, R., Palacios, G., Gomez, I., Navaro-Pedreno, J., Mataix, J. Distribution and accumulation of heavy metals (Cd, Ni, Cr) in tomato plant. *Fresenius Environ Bull.* 1994, 3: 395-399.
- Moral, R., Palacios, G., Navaro-Pedreno, J., Gomez, I., Mataix, J. Absorption of chromium and effects of micronutrient content in tomato plant (*Lycopersicon esculentum* M.). *Agrochimica* 1996, 11: 138-145.
- Murphy, A., Zhou, J., Goldsbrough, P.B., Taiz, L. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Aabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1997, 113: 1293-1301.
- Myers, C.R., Carstens, B.P., Antholine, W.E., Myers, J.M. Chromium (VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88: 98-106.
- National Academy of Sciences (NAS) In: Chromium NAS, Washington DC, 1974.

- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. The physiology of plants under stress. John Wiley and Sons, Inc., 1996.
- Ohtake, H., Cervantes, C., Silver, S. Decreased uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 1987, 169: 3853-3856.
- Okamura, H., Aoyama, I. Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. *Env. Toxic. and Water Qual.* 1994, 9: 7-15.
- Oláh V., Hörcsik Zs., Cseke G., Láposi R., Veres Sz., Gáspár A., Lakatos G., Mészáros I. A Cr(VI) hatása a *Chlorella pyrenoidosa* és a *Lemna gibba* növekedésére és fotoszintetikus aktivitására. *Hidrol. Köz.* 2004, 84: 112-114.
- Ovesen, J., Moller-Madsen, B., Thomsen, J.S. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. *Bone* 2001, 29: 565-570.
- Öncel, Y., Keles, A.S., Üstün, A.S. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollution* 2000, 107: 315-320.
- Pacyna, J.M. and Nriagu, J.O. Atmospheric emission of chromium from natural and anthropogenic sources. In Nriagu J.O., Nieboer E. (eds) *Chromium in natural and human environments*. John Wiley and Sons, New York, 1988, 105-125.
- Panda, S.K., Chaudhury, I., Khan, M.H. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biol. Plant.* 2003, 46: 289-294.
- Park, C.H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., Matin, A. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66: 1788-1795.
- Parmar, N.G., Vithalani, S.D., Chanda, S.V. Alteration in growth and peroxidase activity by heavy metals in *Phaseolus* seedlings. *Acta Phys. Plantarum* 2002, 24: 89-95
- Patra, M., Sharma, A. Mercury toxicity in plants. *Botanical Rev.* 2000, 66: 379-422.
- Pettine, M., Dottone, L., Campanella, L., Millero, F.J., Passino, R. The reduction of chromium (VI) by iron (II) in aqueous solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 1998, 62: 1509-1519.
- Prasad, M.N.V., Strzalka, K. Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad, M.N.V., Hegemeyer, J. (eds) *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, 1999, 117-138.
- Proter, M.R., Francko, D.A. Effect of heavy metals on short-term photosynthetic rates of *Potamogeton amplifolius*. *J. Aquat Plant Manage.* 1991, 29: 51-53.
- Rai, D., Eary, L.E., Zachara, J.M. Environmental chemistry of chromium. *Sci. Tot. Environ.* 1989, 86: 15-23.
- Rai, L.C., Dubey, S.K. Chromium toxicity to a cyanobacterium: possible role of carbon sources in toxicity amelioration. *Microbios.* 1988, 55: 193-203.
- Rai, L.C., Singh, A.K., Mallick, N. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 1991, 137: 419-424.
- Rai, U.N., Tripathi, R.D., Kumar, N. Bioaccumulation of chromium and toxicity on growth, photosynthetic pigments, photosynthesis, in vivo nitrate reductase activity and protein content in chlorococcalean green alga *Glaucozystis nostochinearum*. *Chemosphere* 1992, 25: 1721-1732.

- Ramachandran, V., D,Souza, T.J., Mistry, K.B. Uptake and transport of chromium in plants. *J. Nucl. Agric. Biol.* 1980, 9: 126-128.
- Randhawa, K.V., Zhou, F., Jin, X., Nalewajko, C., Kushner, D.J. Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus* f. *alternans*. *Can. J. Microbiol.* 2001, 7: 987-993.
- Rausser, W.E. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 1999, 31: 19-48.
- Rengel, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 1992, 121: 499-513.
- Riedel G.F. The relationship between chromium(VI) uptake, sulphate uptake and chromium(VI) toxicity in the estuarine diatom, *Thalassiosira pseudonana*. *Aquatic Toxicol.* 1985, 7: 191-204
- Rogstad, S.H., Keane, B., Collier, M.H. Minisatellite DNA mutation rate in dandelions increases with leaf tissue concentrations of Cr, Fe, Mn and Ni. *Environ. Toxicol. Chem.* 2003, 22: 2093-2099.
- Rodrigues, M., Lopez, M. Influence of the inoculum and the medium on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Nature* 1964, 203: 66-67.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. Differential chromium tolerance among eight mung bean cultivars grown in nutrient culture. *J. Plant Nutr.* 1997, 20: 341-347.
- Rose, R., Rose, L.C., Omi, S.K., Forry, R.K., Durrel, M.D., Bigg, W.L. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food. Chem.* 1991, 39: 2-11.
- Ryan, P.R., DiTomaso, J.M., Kochian, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 1993, 44: 437-446.
- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J.P., Deus Neumann, B., Zenk M.H. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 1998, 47: 339-347.
- Saleh, F.Y., Parkerton, T.F., Lewis, R.V., Huang, J.H., Dickson, K.L. Kinetics of chromium transformation in the environment. *Sci. Tot. Environ.* 1989, 86: 25-41.
- Salin, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of chloroplast. *Physiol. Plantarum* 1988, 72: 681-728.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigarra, J. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol. Eng.* 2003, 20: 249-253.
- Samantaray, S., Das, P. Effect of chromite minewaste on seed germination, growth, biomass yield of *Oryza sativa* L. cv. *Panthara*. *Orissa J. Agric. Res.* 1991, 4: 1-6.
- Samantaray, S., Rout, G.R., Das, P. A study of soil plant and root-shoot relationship in rice (*Oryza sativa* L. cv. *Panthara*) grown on chromiferous mine spoil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 66: 349-357.
- Samantaray, S., Das, P. Accumulation and distribution of chromium, nickel, and iron in the mungbean plant. *Fresen. Environ. Bull.* 1997, 6: 633-641.
- Samantaray, S., Rout, G.R., Das, P. Role of chromium on plant growth and metabolism. *Acta Phys. Plant.* 1998, 20: 201-212.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 1999, 41: 105-130.
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 1993, 101: 7-12.

- Schat, H., Vooijs, R., Bookum, W.M. Genetics of adaptive heavy metal tolerance in *Silene vulgaris*: few genes and little intergenic variation. *J. Exp. Bot.* 1997, 48: 101-102.
- Schroeder, D.C., Lee, G.F. Potential transformation of chromium in natural waters. *Water Air Soil Pollut.* 1975, 4: 355-365.
- Schmöger, M.E., Oven, M., Grill, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* 2000, 122: 793-801.
- Shimazaki, Y., Furuya, M. Effects of divalent cations and EDTA on special properties of phytochrome in particulate fractions from etiolated pea (*Pisum sativum*) Cultivar Alaska. *Plant Cell Phys.* 1980, 21:855-863.
- Simon-Sarkady, L., Galiba, G. Determination of putrescine and cadaverine in wheat callus by overpressured layer chromatography (OPLC). *J. Planar Chromatography* 1988, 1: 362-364.
- Simon, L., Hajdu, F., Biacs, P.A. Separation and determination of *Chlorella* photosynthetic pigments by HPLC. *Proceedings of the 2nd International Conference on Biochemical Separations, Keszthely, 1988, 305-311.*
- Simon L., Fodor M., Pais I. Effects of zirconium on the growth and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa* green algae. *J. Plant Nutrition* 2001, 24: 159-174.
- Simon L., Kiss F., Bakó A., Hajdú F., Hörcsik T.Zs., Balogh A., Pais I. Effect of gallium on photosynthetic pigments and peroxidase activity of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Plant Nutrition* 1989, 12: 1123-1140.
- Slavejkova, V.I., Wilkinson, K.J. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ Sci. Technol.* 2002, 36: 259-262.
- Soane, B.D., Saunder, D.H. Nickel and chromium toxicity of serpentine soil in Southern Rhodesia. *Soil Sci.* 1959, 88: 322-329.
- Stein, K., Schwedt, G. Chromium speciation in the wastewater from a tannery. *Fresenius J. Analyt. Chem.* 1994, 350: 38-41.
- Szalai, G., Janda, T., Golan-Goldhirsh, A., Páldi, E. Effect of Cd treatment in phytochelatin synthesis in maize. *Acta Biol. Szegediensis* 2002, 46: 121-122.
- Takeda, H., Hirokava, T. Studies on the cell wall on *Chlorella* 5. Comparison of the cell wall chemical composition in the strains of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Cell Physiol.* 1984, 25: 287-295.
- Tandon, R.K., Crisp, P.T., Ellis, J. Effect of pH on chromium (VI) species in solution. *Talanta* 1984, 31: 227-228.
- Taylor, N.J., Cowan, A.K. Xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase impact plant hormone homeostasis and affect fruit size in „Hass” avocado. *J. Plant Res.* 2004, 117: 121-130.
- Teisserie, H., Guy, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci.* 2000, 153: 65-72.
- Thomas, W.H., Hollibaugh, J.T., Seibert, D.L.R. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia* 1980, 19: 202-209.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E-L., Zenk, M.H. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Letters* 1991, 284: 66-69.

- Toda, N., Takahashi, T., Mizobuchi, S. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit. Care Med.* 2002, 30: 1512-1522.
- Tukendorf, A., Baszinsky, T. The in vivo effect of cadmium on photochemical activities on chloroplasts of runner bean plants. *Acta Biol. Plant.* 1991, 13: 51-57.
- Turner, M.A., Rust, R.H. Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci. Soc. American Proc.* 1971, 35: 755-758.
- Uribe, E.G., Stark, B. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion. Evidence for Cu²⁺-coupling factor I interaction. *Plant Physiol* 1982, 69: 1040-1045.
- Van Assche, F., Clijsters, H., Marcelle, R. Photosynthesis in *L.*, as influenced supra optimal zinc nutrition. *Photosynthesis and plant development.* (eds.) Marcelle R. The Hague: Junk 1979, 175-184.
- Van Assche, F., Clijsters, H. Induction of enzyme capacity on plants as a result of heavy metal toxicity, dose-response relation on *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. *Environ. Poll.* 1988,52: 103-115.
- Van Assche, F., Clijsters, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environ.* 1990, 13: 195-206.
- Verkleij, J.A.C., Schat, H. Mechanism of metal tolerance in higher plants: Evolutionary aspects (eds.) Shaw. A.J. CRC Press, Boca Raton, Fla. 1990, 179-194.
- Vincze, G., Vallner, J., Balogh, Á., Kiss, F. Altered elemental composition of the cell wall of a *Pseudomonas* strain having inducible tolerance mechanism to chromium(VI). *Env. Contam. and Toxic.* 2000, 65: 772-779.
- Vögeli-Lange, R., Wagner, G.J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of transport function for cadmium binding peptides. *Plant Physiol.* 1990, 92: 1086-1093.
- Watanabe, H. Accumulation of chromium from fertilizer in cultivated soils. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 1984, 4: 543-554.
- Weckx, E.J., Clijsters, H.M.M. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plantarum* 1996, 96: 506-512.
- Wetterhahn, K.E., Hamilton, J.W. Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: effect on gene expression. *Sci. Total Env.* 1989, 86: 113-129.
- Williams, R.J.P., Da Silva, J.J.R. (eds.) *New trends in bioorganic chemistry.* Academic press, New York, 1978.
- Wium-Andersen, S. The effect of chromium on the photosynthesis and growth of diatoms and green algae. *Phys. Plant.* 1974, 32: 308-310.
- Wydrzynski, T.J. Early indications for manganese oxidation state changes during photosynthetic oxygen production: a personal account. *Photos. Res.* 2004, 80: 125-135.
- Wollgiehn, R., Neumann, D. Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lecopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins. *J. Plant Physiol.* 1999, 154: 767-771.

- Wong, P.K. and Chang, L. Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. *Env. Poll.* 1991, 72: 127-139.
- Wu, J-T., Ming, T., Kow, L-C. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells. *J. Phycol.* 1998, 34: 113-117.
- Zhu, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opin. in Plant Biol.* 2003, 6: 441-445.

9. Hörcsik Zsolt tudományos tevékenységének jegyzéke

9.1. Az értekezés témakörében megjelent előadások és poszterek

- Hörcsik, T. Zs., Vincze, Gy., Kiss, F., Nádas, E., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) on some oxidoreductase of *Chlorella pyrenoidosa*. Book of abstracts Stress of Life, Budapest 1997. pp.162.
- Hörcsik, T. Zs., Kiss, F., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) carbohydrate-metabolism of *Chlorella pyrenoidosa*. Book of abstracts XI. International Congress on Photosynthesis. 1998. pp.180.
- Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) on carbohydrate-metabolism of *Chlorella pyrenoidosa* Plant Physiology and Biochemistry 2000. vol 38. pp.186. IF: 1,414
- Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) on growth and elemental composition of *Chlorella pyrenoidosa* Book of abstracts, 10th International Trace Elements Conference, Budapest pp.2000. pp.21.
- Hörcsik, T. Zs., Mészáros, I., Balogh, Á., Lakatos, G. Effect of chromium(VI) and cadmium on growth, photosynthetic pigment composition and oxidoreductases activity of *Chlorella pyrenoidosa*. Book of abstracts, Shallow Lakes, Dalfsen. 2005. pp.81.

9.2. Az értekezés témakörében megjelent szakcikkek

- Simon, L., Kiss, F., Bakó, A., Hajdú, F., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á., Pais, I. Effect of gallium on photosynthetic pigments and peroxidase activity of *Chlorella pyrenoidosa* Journal of Plant Nutrition 1989. 12 (10). 1123-1140.
- Bakó, A., Simon, L., Kiss, F., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. A gallium hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgára 2. A gallium hatása a *Chlorella* peroxidáz enzimére. Acta Academiae Pedagogicae Nyíregyháziensis 1991. TOM. 12/B
- Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Intracellular distribution of chromium and toxicity on growth in *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biologica Szegediensis 2002. 46 (3-4). 57-58.
- Hörcsik, T. Zs., Szalay, G., Pál, M., Oláh, V., Mészáros, I., Lakatos, G., Balogh, Á. Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására. Hidrológiai közlöny. 2004. 84 (5-6). 50-52.
- Hörcsik, T. Zs., Szalay, G., Pál, M., Oláh, V., Mészáros, I., Lakatos, G., Balogh, Á. Szénhidrát-anyagcsere változása *Chlorella pyrenoidosa*-ban Cr(VI) és Cd stressz hatására. Hidrológiai közlöny. 2005. 86.
- Hörcsik, T. Zs., Oláh, V., Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., Lakatos, G. Effect of chromium (VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biologica Szegediensis 2006. 50 (1-2). 19-25.

Hörcsik, T. Zs., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Lakatos, G., Garab, G. Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Photosynthetica* 2007. 45 (1). 65-69.

9.3. Egyéb előadások, poszterek

Kiss, F., Hörcsik, T. Zs., Vincze, Gy., Nádas, E., Balogh, Á. Inhibition of *Chlorella* cytosolic FBP-ase by Fru-2,6-P. Book of abstracts, 14th International Congress of Biochemistry, Prague. 1988

Hörcsik, T. Zs., Kiss, F., Vincze, Gy., Nádas, E., Balogh, Á. Properties of FBP-ase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* Book of abstracts, 20th Meeting of the FEBS, Budapest. 1990. pp.330.

Vincze, Gy., Nádas, E., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Changes in kinetic properties of PFP during stress conditions. Book of abstracts, 20th Meeting of the FEBS, Budapest. 1990. pp.337.

Nádas, E., Vincze, Gy., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. The effect of stress on PFK and PFP in barley seedlings. Book of abstracts, 20th Meeting of the FEBS, Budapest. 1990. pp.337.

Hörcsik, T. Zs., Vincze, Gy., Kiss, F., Nádas, E., Balogh, Á. *Chlorella pyrenoidosa* nitrát redukáz tisztítása és karakterizálása. IV. Magyar Növényélettani Kongresszus, Szeged 1991. pp.13.

Kiss, F., Wong, J., Vincze, Gy., Hörcsik, T. Zs., Buchanan, B. B., Balogh, Á. A paradicsom PFP molekulaformái. Book of abstracts IV. Magyar Növényélettani Kongresszus, Szeged 1991. pp.17.

Vincze, Gy., Nádas, E., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Kukoricacsíra PFP enzimformái és tulajdonságai. Book of abstracts IV. Magyar Növényélettani Kongresszus, Szeged 1991. pp.41.

Gerse, J., Csicsor, J., Pintér, L., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Application of humic acids and horseradish peroxidase in waste water treatment. Book of abstracts International Symposium on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe, Budapest 1992. pp. 84.

9.4. Egyéb szakcikkek

Kiss, F., Hörcsik, T. Zs., Vincze, Gy., Nádas, E., Balogh, Á. *Chlorella* FBP-ázok tisztítása és tulajdonságaik. *Botanikai közlemények* 1989. pp.96.

Vincze, Gy., Nádas, E., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. The effect of light on carbohydrate-metabolism of corn seedlings. *Acta Academiae Pedagogicae Nyíregyháziensis* 1990. TOM. 12/B pp. 181-186.

Nádas, E., Vincze, Gy., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Fény-, hő- és sóstressz hatása árpa csíranövény PPI-függő foszfofruktokináz aktivitására. *Acta Academiae Pedagogicae Nyíregyháziensis* 1990. TOM. 12/B pp. 155-163.

A króm hatása a *Chlorella pyrenoidosa* néhány anyagcsere-
folyamatára

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

Írta: *Hörcsik Tibor Zsolt* biológia tanár

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája
(Környezettudomány programja) keretében.

Témavezető: Dr. Mészáros Ilona, Dr. Lakatos Gyula, Dr. Balogh Árpád

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: ...Dr. Kátai János.....
tagok: ...Dr. Nagy Miklós.....
...Dr. Nagy Zoltán.....

A doktori szigorlat időpontja: 2009. május 8.

Az értekezés bírálói:

.....
.....
.....

A bírálóbizottság:

elnök:.....
.....
tagok:.....
.....
.....
.....

Az értekezés védésének időpontja: 2009.