



**ZÖLDALGÁK LEHETSÉGES SZEREPE FÉMSZENNYEZŐK
BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL TÖRTÉNŐ
ELTÁVOLÍTÁSÁBAN**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

NOVÁK ZOLTÁN

Témavezető:
Dr. Bácsi István
egyetemi adjunktus

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2017

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács a **Juhász Nagy Pál Doktori Iskola Alkalmazott Ökológia doktori** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2017.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Novák Zoltán** doktorjelölt **2012-2015** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Alkalmazott Ökológia** doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2017.

.....
a témavezető aláírása

A doktori értekezés betétlapja

**ZÖLDALGÁK LEHETSÉGES SZEREPE FÉMSZENNYEZŐK
BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL TÖRTÉNŐ
ELTÁVOLÍTÁSÁBAN**

**THE POSSIBLE ROLE OF GREEN ALGAE IN THE
BIOLOGICAL REMOVAL OF METAL CONTAMINANTS**

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

Írta: **Novák Zoltán** okleveles hidrobiológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**
(**Alkalmazott Ökológia** doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Bácsi István

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Csorba Péter

tagok: Dr. Fleit Ernő

Dr. M-Hamvas Márta

.....

.....

.....

A doktori szigorlat időpontja:

Az értekezés bírálói:

.....

.....

.....

.....

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja:

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Nehézfémek.....	3
2.1.1. A nehézfém fogalma	3
2.1.2. A nehézfémek természetes és antropogén forrásai	4
2.1.3. A nehézfémek körforgalma.....	6
2.1.4. A réz és a cink élettani hatásai	9
2.2. A biológiai alapú nehézfém eltávolítás (bioremediáció, bioszorpció, bioakkumuláció)	10
2.3. Az algák sejtfala	13
2.3.1. Az extracelluláris fémmegkötés	14
2.3.2. Az intracelluláris fémmegkötés.....	15
2.4. Az algák szerepe a nehézfémek eltávolításában.....	17
2.5. Az alkalmazott zöldalgák jellemzése	20
2.5.1. A <i>Monoraphidium pusillum</i> (Printz) Komárková-Legnerová és a <i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová	20
2.5.2. A <i>Desmodesmus</i> nemzetség és a <i>Desmodesmus communis</i> (E.Hegewald) E.Hegewald.....	21
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	23
3.1. Tenyésztési és kísérleti körülmények.....	23
3.2. A tenyészetek növekedésének nyomon követése.....	23
3.2.1. A sejtszám/cönóbiumszám változások nyomon követése.....	23
3.2.2. A száraz tömeg és a klorofill-tartalom meghatározása	24
3.3. Morfológiai változások	24
3.4. A lipidperoxidáció mértékének meghatározása	24
3.5. A fémek mennyiségi meghatározása.....	25
3.5.1. Az eltávolított cink mennyiségi meghatározása (4.1. és 4.2. fejezetek)	25
3.5.2. Az eltávolított cink, illetve réz mennyiségi meghatározása (4.3. fejezet).....	26
3.6. Statisztikai elemzés	26
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	27

4.1. <i>Monoraphidium</i> fajok cink toleranciája és cink-eltávolító	
képessége.....	27
4.1.1. A tenyészetek növekedése.....	27
4.1.2. A sejtek morfológiai változásai.....	30
4.1.3. Oxidatív stressz - A lipidperoxidáció mértékének változása	34
4.1.4. <i>Monoraphidium</i> fajok cink-eltávolítása	36
4.2. A <i>Desmodesmus communis</i> élő és holt biomasszájának cink-	
eltávolító sajátosságai	41
4.2.1. A <i>Desmodesmus communis</i> tenyészetek növekedése.....	41
4.2.2. A cönóbiumok morfológiai változásai	44
4.2.3. Oxidatív stressz - A lipidperoxidáció mértékének változása	47
4.2.4. A <i>Desmodesmus communis</i> cink-eltávolítása	49
4.2.5. A holt <i>Desmodesmus communis</i> biomassza cink megkötése	52
4.3. Az alkalmazott algafaj, a nehézfémek minősége és mennyisége,	
valamint az eltávolítás mechanizmusa közötti összefüggések	55
4.3.1. A <i>Monoraphidium pusillum</i> és <i>Desmodesmus communis</i>	
tenyészetek növekedése a különböző cink és réz koncentrációk mellett	55
4.3.1.1. Növekedés a sejt- illetve cönóbiumszám alapján.....	55
4.3.1.2. Növekedés a klorofill-tartalom alapján	59
4.3.2. A <i>M. pusillum</i> és <i>D. communis</i> tenyészetek cink- és réz-	
eltávolítása.....	64
4.3.2.1. A cink-eltávolítás jellemzése	64
4.3.2.2. A réz-eltávolítás jellemzése	68
4.4. Új tudományos eredmények.....	76
5. ÖSSZEFOGLALÁS	78
6. SUMMARY	82
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	86
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	87
9. MELLÉKLETEK	103
10. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE	106

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évszázadokban az ipari forradalomnak és az ezzel együtt járó demográfiai robbanásoknak, valamint a globalizációs-urbanizációs folyamatoknak köszönhetően a környezetszennyezés a XXI. század egyik legfőbb gazdasági-társadalmi problémája lett. Az egyre fokozódó mértékű antropogén tevékenységek következtében jelentősen megnövekedett a környezetünket terhelő vegyi anyagok mennyisége. A szennyezőanyagok közül a nehézfémek biológiailag nem bontható tulajdonságuk révén komoly környezeti és ökológiai kockázatot jelentenek a bioszféra élőlényközösségeire, valamint az emberi egészségre is (Kotrba et al., 2011).

A nehézfémek a Föld biogeokémiai körfolyamatának természetes alkotóelemei, fizikai és kémiai tulajdonságaik határozzák meg mennyiségi eloszlásukat és biológiai hozzáférhetőségüket az egyes környezeti elemekben (talaj, víz, levegő, élővilág). Széleskörű felhasználásuk következtében a természetes körülmények között előforduló nehézfém-koncentrációk drasztikusan növekednek. A nehézfém-szennyezések elsődleges, antropogén forrásai az ipar (elsősorban a fémbányászat és -kohászat), a mezőgazdaság (peszticidek, műtrágyák), valamint a nem megfelelően kezelt települési- és ipari szennyvizek, szennyvíziszapok (Szabó, 2000; Papp, 2011).

A nehézfémek eltávolítását hagyományosan fizikai, kémiai és fizikai-kémiai módszereken alapuló eljárásokkal végzik. Az alkalmazott módszerek közül ipari méretekben elterjedt eljárások a kicsapás, derítés, flotálás, adszorpció és a különböző membrános eljárások. Az elmúlt évtizedekben a biotechnológia térhódításával egyre inkább előtérbe került a biológiai rendszerek különböző alkalmazása. A folyamatot elsősorban mikroorganizmusokkal (baktériumok, gombák, algák) és anyagszertermékeikkel végzik. A mikroorganizmusok közül az eukarióta zöldalgák jól alkalmazhatók fémszennyezők vizes oldatból történő eltávolítására, mivel több képviselőjük jó adaptív képességgel és nagy fémmegkötő kapacitással rendelkezik (Romera et al., 2006; Perei et al., 2012).

Munkánk célja, hogy különböző zöldalga taxonok nehézfém bioszorpciós és/vagy bioakkumulációs sajátosságait jellemezzük. Kiválasszunk olyan törzseket, amelyekkel a víz- és szennyvízkezelési technológiai alkalmazás megvalósítható, vagy érzékenységük révén a

szennyezők korai detektálására alkalmasak. Munkánkhoz olyan zöldalga taxonokat (*Monoraphidium pusillum*, *Monoraphidium griffithii*, *Desmodesmus communis*) választottunk, amelyek hazai felszíni vizeinkben széles körben elterjedtek, viszonylag könnyen izolálhatók és olcsón fenntarthatók laboratóriumi körülmények között. Kísérleteink során az élő szervezetek számára esszenciális, azonban nagyobb koncentrációkban toxikussá válható nehézfémek (cink, réz) hatásait vizsgáltuk, amelyek gyakran előforduló szennyezőanyagok felszíni vizekben és a szennyvizek állandó összetevői.

Munkánk során viszonylag nagyobb ($5\text{--}40\text{ mg l}^{-1}$) cink koncentráció mellett vizsgáltuk a cink hatásait a három zöldalga faj növekedésére, morfológiájára, és tanulmányoztuk a fém által kiváltott oxidatív stressz mértékét, illetve az eltávolított fém mennyiségét és az eltávolítás módját (4.1. és 4.2. fejezetek). A következő kérdésekre kerestük a választ:

- A különböző koncentrációk hogyan hatnak a kezelt tenyészetek növekedésére?
- Specifikus morfológiai változások megjelennek-e az algasejteken a fémek hatására?
- Milyen koncentrációk mellett alakul ki oxidatív stressz a sejtekben?
- A vizsgált tenyészetek mekkora mennyiségű fém eltávolítására képesek?
- A fémmegkötés szempontjából az extracelluláris szorpciónak vagy az intracelluláris akkumulációnak van nagyobb szerepe?

Kisebb fém koncentrációk ($0,2\text{--}5,0\text{ mg l}^{-1}$) mellett a *M. pusillum* és a *D. communis* esetén azt is tanulmányoztuk, hogy a fém minősége, a koncentráció illetve az algafaj hogyan befolyásolja a megkötés mértékét és módját (4.3. fejezet). Ebben a megközelítésben a következők voltak a megválaszolandó kérdések:

- A vizsgált tartományban hogyan befolyásolják a fémek az algák növekedését?
- Befolyásolja-e, és ha igen, hogyan a fém minősége, koncentrációja és az algafaj a fémtávolítás mértékét és módját?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Nehézfémek

2.1.1. A nehézfém fogalma

A nehézfémek fizikai-kémia (fajsúly, sűrűség, relatív atomtömeg, rendszám) és biológiai (toxicitás) tulajdonságai alapján többen is próbálkoztak a fogalom definiálásával, azonban a mai napig nem született egységes és konzekvens meghatározás a különböző tudományágak között (Duffus, 2002). Általában az 5 g/cm^3 -nél nagyobb sűrűségű (Brewer és Scott, 1983), fémes tulajdonságokkal rendelkező kémiai elemek csoportját nevezzük nehézfémeknek. Beletartoznak a fémek (átmeneti fémek, másodfajú fémek), a félfémek és a lantanoidák, aktinoidák egyes elemei, amelyek sűrűségük alapján nem feltétlenül sorolhatók a nehézfémek közé, de toxicitásuk alapján mégis közéjük sorolják őket, pl. alumínium, arzén (Atkins és Jones, 2000; Tchounwou et al., 2012). Több irodalomban az elemek konkrét megnevezésével hivatkoznak a nehézfémekre. Scanlon (1975) a Ti, V, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Nb, Ag, Cd, Sn, Hg és Pb elemeket sorolja a nehézfémek csoportjába, Leeper (1978) a Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb és Zn elemeket. Neumüller (1983) szerint a Cd, Cr, Cu, Co, Pb, Hg, Ni, Zn elemek tartoznak a nehézfémek közé. Scott és Smith (1981) szerint az ipari gyártási folyamatok során gyakran alkalmazott, az élőlényekre toxikus hatást kifejtő elemeket tekinti nehézfémnek (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se és Zn), míg Tver (1981) az olyan fémes elemek ionjait tekinti nehézfémeknek, mint a Cu, Zn, Fe, Cr és Al. Ezekből az irodalmi adatokból is látszik, hogy nagy az átfedés az elemek tekintetében, még sincs teljes konszenzus.

A toxikológiában használt nehézfém fogalom definíciója sem egyértelmű és következetes. Elsősorban azokra a toxikus elemekre használják, amelyeknek eddig nem találtak biológiai funkcióját (ólom, kadmium, higany), de ide sorolnak olyan elemeket is, amelyek vagy nem a fémek közé tartoznak, vagy sűrűségük alapján nem tekinthetők nehézfémeknek. A nehézfémek között is találhatunk olyan elemeket (kobalt, réz, króm, vas, magnézium, mangán, molibdén, nikkel, szelén, cink), amelyek kis koncentrációban szükségesek az élő szervezetek számára és csak bizonyos koncentráció felett válnak toxikussá, ezért a

toxikus elem és a nehézfém fogalma nem minden esetben egyenértékű (Hodgson et al., 1988; Friedland, 1989). A 76/464 EEC direktíva II. listás anyagai olyan veszélyes anyagok, amelyek káros hatásúak a vízi környezetre. A lista a következő félfémeket és fémeket, valamint azok vegyületeit tartalmazza: cink, réz, nikkel, króm, ólom, szelén, arzén, antimon, molibdén, titán, ón, bárium, berillium, bór, urán, vanádium, kobalt, tallium, tellúr, ezüst. Az 1. táblázat foglalja össze a fent említett, különböző nehézfém fogalmakat definiáló tanulmányokat (1. táblázat).

1. táblázat A nehézfém fogalmának definiálása különböző szerzők alapján

A nehézfém fogalom alapja	Nhézfémek	Szerző(k)
5 g cm ⁻³ -nél nagyobb sűrűség	Minden fémes elem ezzel a tulajdonsággal	Brewer és Scott (1983)
Elemek konkrét megnevezése	Ti, V, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Nb, Ag, Cd, Sn, Hg, Pb Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn	Scanlon (1975) Leeper (1978)
Gyakran alkalmazott fémek, melyek toxikusak az élőlényekre	Cd, Cr, Cu, Co, Pb, Hg, Ni, Zn	Neumüller (1983)
Fémes elemek ionjai	As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Zn	Scott és Smith (1981)
Toxicitás	Cu, Zn, Fe, Cr és Al Pb, Cd, Hg Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Zn Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Se, As, Sb, Mo, Ti, Sn, Ba, Be, B, U, V, Co, Tl, Te, Ag	Tver (1981) Hodgson et al., 1988; Friedland, 1989 76/464 EEC direktíva II. listás anyagai

2.1.2. A nehézfémek természetes és antropogén forrásai

A litoszféra természetes állapotban is tartalmaz nehézfémeket ásványok és ásványtársulások formájában, melyek az alapkőzet mállása során kerülnek a talajba (geokémiai szennyeződés), így mobilizálódhatnak és bekerülhetnek a földi anyagforgalomba (Wood, 1974). A vulkáni tevékenység és természetes erdőtüzek is számottevően hozzájárulnak a légkörben előforduló természetes nehézfém-koncentrációk növeléséhez (Bradl, 2005).

Az egyes területek természetes nehézfém-összetétele általában nem állandó érték, ahogyan az egyes fémek egymáshoz viszonyított aránya sem egyenletes eloszlású adott területen (dinamikus egyensúlyban van), azonban természetes körülmények között ugrásszerű, hirtelen változások igen ritkán következnek be. Antropogén hatásra viszont bekövetkezhet jelentős lokális, regionális és globális koncentrációnövekedés is, amely komoly problémákat okozhat a biológiai rendszerekben, szélsőséges esetben akár környezeti katasztrófákat is előidézhethet (Minamata-kór, itai-itai-betegség; Alloway, 2013; Papp, 2011). Az 2. táblázat a Freedman (1995) által becsült természetes és antropogén forrásból származó nehézfém-emissziókat és egymáshoz viszonyított arányukat mutatja be (2. táblázat).

2. táblázat Globális nehézfém-emisszió (10^8 g/év; Freedman, 1995).

Elem	Természetes	Antropogén	Antropogén/Természetes
Arzén	28,0	780,0	28,0
Kadmium	2,9	55,0	19,0
Króm	580,0	940,0	1,6
Kobalt	70,0	44,0	0,6
Réz	190,0	2600,0	14,0
Ólom	59,0	20000,0	340,0
Mangán	6100,0	3200,0	0,5
Higany	0,4	110,0	275,0
Molibdén	11,0	510,0	46,0
Nikkel	280,0	980,0	2,5
Szelén	4,1	140,0	34,0
Ón	52,0	430,0	8,3
Vanádium	650,0	2100,0	3,2
Cink	360,0	8400,0	23,0

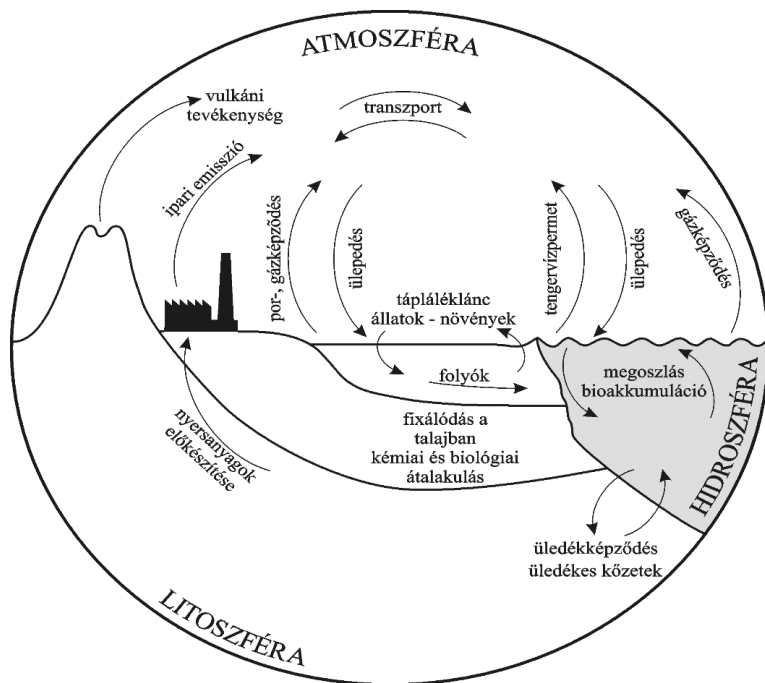
A táblázatból látható, hogy az antropogén tevékenységekből származó emisszió több esetben is jelentősen meghaladja a természetes emisszió mértékét (2. táblázat), azonban azt meg kell jegyezni, hogy a különböző irodalmi becslések eltérnek egymástól (Alloway, 2013; Tercier-Waeber és Taillefert, 2008; Holdren, 1990; Nriagu és Pacyna, 1988).

Mivel nehézfémek alatt viszonylag sok elemet értünk és az ipari termelési folyamataik és felhasználásuk is igen szerteágazó, ezért a következőkben csak a dolgozat szempontjából releváns elemekről (cink, réz) esik szó. A réz az egyik legrégebben használt és jelenleg a harmadik

legnagyobb mennyiségben előállított fém, a cink pedig a legszélesebb körben felhasznált. A két fémszennyező forrásai között átfedések vannak. A környezetbe nagyobb mennyiségük kerülhet bányászatuk és -kitermelésük során, valamint a különböző ötvözetek előállításakor. A sárgaréz a réz és cink ötvözete, az iparban és háztartásokban is sokoldalúan használják. Az energia előállításánál és átalakításánál (hőtermelés, üzemanyaggyártás) melléktermékként is nagymértékű emisszióval számolhatunk. A mezőgazdasági termelés során kibocsátott műtrágyák, peszticidek is jelentősen hozzájárulnak az ember által okozott fémszennyezésekhez. A vegyipar a gyártási technológiák során és egyes termékeikhez szintén használnak nehézfémeket (pl. cinket tartalmazó pigmentek, festékek; rezet és/vagy cinket tartalmazó gyógyászati termékek). Potenciális veszélyt hordozhat az ipari és a háztartási szennyvizek kibocsátása, illetve a szennyvíziszapok deponálása. Ezeken kívül a rezet nagyon jó hő- és elektromos vezetőképességének köszönhetően nagy mennyiségben alkalmazzák az elektronikai iparban, pl. elektromos vezetékek gyártására, villanymotorok tekercseléséhez. A cink-szennyezéshez a fémipar (galvanizálás, fröccsöntés) járulhat hozzá nagyobb mértékben (Chopra et al., 2009; Meij és te Winkel, 2007; Tóth et al., 2011, <http://www.rsc.org/periodic-table>, Papp, 2011).

2.1.3. A nehézfémek körforgalma

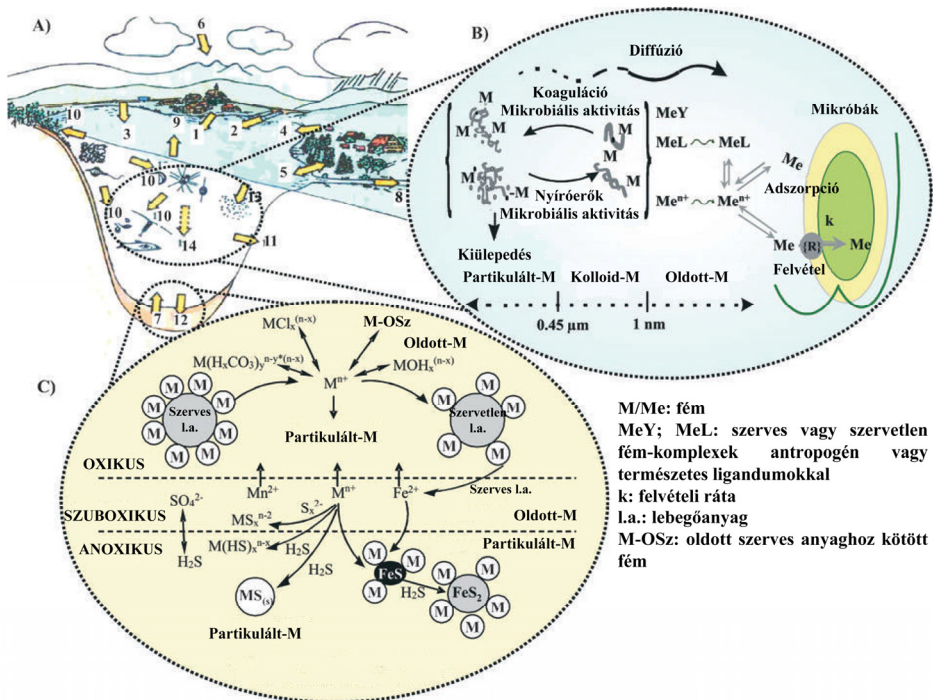
A nehézfémek biogeokémiai körforgása összetett folyamat, a rendszerek között (pl. levegő-talaj) és adott rendszeren belül (pl. víz-üledék) lejátszódó folyamatok igen komplexek, abiotikus és biotikus tényezők egyaránt befolyásolják. A nehézfémek ezeken a határfelületeken felhalmozódhatnak és a környezeti tényezők megváltozásával mobilizálódhatnak/immobilizálódhatnak/remobilizálódhatnak (Papp, 2011; 1. ábra). Az 1. ábra a fémek biogeokémiai körforgásában szerepet játszó legfontosabb anyagáramlási mechanizmusokat foglalja össze (Papp, 2011; 1. ábra).



1. ábra A globális fémkörforgás fő anyagáramai (Papp, 2011).

A nehézfémek fizikai és kémiai tulajdonságai befolyásolják az adott elemek mennyiségi eloszlását, a különböző fázisok közötti transzport- és átalakulási folyamatokat, valamint a biológiai rendszerekre kifejtett hatásukat egyaránt (Templeton, 2000). A legfontosabb sajátságok közé tartozik többek között az oldhatóság, komplexképző tulajdonságok, biológiai hozzáférhetőség, valamint az adott közeg pH viszonyai, adszorpciós kapacitása, és a redoxpotenciál (Violante et al., 2010; Hamelink et al., 1994; Papp, 2010).

Az alábbiakban a vízi és vizes élőhelyeken lejátszódó fontosabb fémkörforgalmi folyamatok kerülnek bemutatásra Tercier-Waeber és Taillefert (2008) ábrája alapján (2. ábra).



2. ábra A nyomelemek körforgalmának sematikus ábrázolása vízi ökoszisztémákban (A), kiemelve a vízoszlopban (B) és az üledékben (C) lejátszódó folyamatokat (Tercier-Waeber és Taillefert, 2008).

A nehézfémek elsősorban felszíni (utak, mezőgazdasági területek; 3-4) és felszín alatti hozzáfolyás útján (5), a légkörből kiülepedve (6) és szennyvizek kibocsátásával (1) kerülhetnek a felszíni vizekbe (2). Felszíni (8) és felszín alatti elfolyás (11) valamint párolgás (9) útján távoznak. A vizekbe kerülve a lebegőanyagokhoz (szervetlen és szerves egyaránt) adszorbeálódhatnak (13), kisebb hányaduk oldott állapotban maradhat. Az üledék-víz határfelületen kiülepedhetnek (üledésképes anyagok; 14) vagy reakcióba léphetnek az üledék felső rétegeivel (12). A vízmozgásoknak (tőlengés, hullámozás, tavak rétegződése) és az élőlények által történő felkeverésnek (bioturbáció) köszönhetően újra oldatba kerülhetnek (7). Az élő szervezetek felvehetik, akumulálhatják és a táplálékhálózat mentén fel is dúsulhat (10) a nehézfémek mennyisége (2. ábra; Tercier-Waeber és Taillefert, 2008; Weiner, 2012; Schaller, 2014; Men et al., 2016).

2.1.4. A réz és a cink élettani hatásai

A réz (Cu) egy esszenciális redox-aktív átmenetifém, amely részt vesz számos fiziológiai és biokémiai folyamatban többféle oxidációs állapotának (Cu^+ , Cu^{2+}) köszönhetően. Közreműködik a fotoszintetikus elektrontranszportban, mitokondriális légzésben, az oxidatív stressz okozta válaszreakciókban, a sejtfal metabolizmusban és a hormonjelzésekben (Yruela, 2005). Szabályozó fehérjékben szerkezeti elem, és mint kofaktor szerepet játszik a Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz (SOD), citokróm-c-oxidáz (COX), amin-oxidáz (AOC), lakkáz, plasztocianin és polifenol-oxidáz (PPO) enzimek működésében. Kulcsfontosságú szerepet tölt be a fehérjék transzkripciója és transzportja során, az oxidatív foszforilációban és a vas mobilizációjában (Gratão et al. 2005; Pilon et al. 2006; Markus és Martinoia, 2006). Ezekből következik, hogy az élő szervezetekben, a sejtekben nélkülözhetetlen a normális növekedéshez és fejlődéshez, hiánya komoly fiziológiai problémákat okozhat az élőlényeknek. Csökken a PSI és a PSII fotokémiai rendszerek aktivitása, valamint a fotoszintetikus pigment-tartalom (klorofilok, karotinoidok). Mérséklődik a plasztokinon szintézis és kisebb a telítetlen C18 zsírsavak aránya. A kloroplasztisz tilakoid membránjai széteshetnek (Yruela, 2005). Nagyobb koncentrációkban azonban toxikussá válhat a sejtek számára, a $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ redoxfolyamatok katalizálhatják a hidroxilgyök-képződést, ami károsíthatja a nukleinsavakat, a lipideket, a fehérjéket és egyéb biomolekulákat. A sejteken belül hozzákapcsolódhatnak a fehérjék szulfhidril-csoportjához (SH), gátolva az enzimaktivitást és a fehérjefunkciókat. Más esszenciális nyomelem hiányát okozhatják, károsíthatják a sejtek transzportfolyamatait, oxidatív stresszt válthatnak ki az élőlényekben (Halliwell and Gutteridge, 1984; van Assche and Clijsters, 1990).

Az élő szervezetekben a cink a második leggyakrabban előforduló fém a vas után. Az egyetlen olyan fém, amely minden enzimosztályban megjelenik (EC-szám, 1-6; oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok, ligázok; Webb, 1992). Enzimatis funkciójukat és reakcióképességüket a Zn^{2+} -ligand komplexek geometriai szerkezete és kötési tulajdonsága határozza meg. Ez alapján három (szerkezeti, katalitikus és kokatalitikus) alapvető Zn^{2+} -ligand kötési helyet különítenek el. Szerkezeti elemként biztosítja a

fehérjék megfelelő térszerkezetének kialakulását, a feltekeredés folyamatában játszik szerepet (pl. alkohol-dehidrogenáz, protein kináz). A katalitikus helyeken a cink közvetlenül befolyásolja az enzimek katalitikus szabályozását (pl. szénsav-anhidráz). A kokatalitikus helyeken a Zn^{2+} katalitikus, szabályozó és szerkezeti funkciókat is egyaránt elláthat (pl. szuperoxid dizmutázok, lila savas foszfatázok, metallo- β -laktamázok). A cink egy viszonylag újabban felfedezett tulajdonsága, hogy olyan fehérjékhez kapcsolódik, amelyek a DNS bázisszekvenciájának a felismerésében játszanak szerepet és a genetikai információ átadását szabályozzák (Klug, 1999; Auld, 2001; Maret, 2005). A cink hiány gátolja a ribulóz-1,5-biszfoszfát aktivitását, így csökken a megkötött CO_2 mennyisége. A kloroplasztisz szerkezetében abnormális változások figyelhetők meg, drasztikusan csökkenhet a klorofill-tartalom. Ezen folyamatok következményeként csökken a fotoszintetikus aktivitás. Az aldoláz enzim nem megfelelő működéséből adódóan nem játszódik le megfelelően a hatszénatomos fruktóz-1,6-difoszfát bontása, amelynek a glikolízis (glükóz katabolizmus) során van jelentős szerepe (Broadley et al., 2007; Blaby-Haas és Merchant, 2012).

A cink az élőlényekben felhalmozódva toxikus hatásokat válthat ki. Csökkenti a sejtekben a klorofill-a és -b mennyiségét és befolyásolja azok arányát. Gátolja a fotoszintetikus elektrontranszport működését, a vas és a foszfor felvételét a sejtekbe, valamint a vas transzportját sejten belül. A Hill-reakció során a mangán helyére beépülve csökkenti a fotolízis mértékét és a közben keletkező oxigén mennyiségét. A cink a sejtekben szintén okozhat oxidatív stresszt, amely során reaktív oxigén gyökök keletkezhetnek. A cink többlet növeli a lipidperoxidáció mértékét, megváltoztatja a membránlipidek szerkezetét, megszakíthatja a lipid kettős réteg folytonosságát így befolyásolja a membrán fluiditását és permeabilitását (Broadley et al., 2007; Robson, 1993; Tsonev és Lidon, 2012).

2.2. A biológiai alapú nehézfém eltávolítás (bioremediáció, bioszorpció, bioakkumuláció)

A szennyezőanyagok, köztük a fémszennyezők eltávolítását hagyományosan fizikai, kémia és a napjainkban egyre jobban a figyelem középpontjába kerülő biológiai módszerekkel végzik. A biológiai módszerek célja, hogy egy hatékony, gazdaságos és környezetbarát

technológiát biztosítanak a nehézfémek eltávolításához (Kotrba et al., 2011). A széles körben elterjedt fizikai-kémiai alapon nyugvó eljárások közül számos módszert alkalmaznak a szennyvizek/felszíni vizek nehézfém-mentesítésére, hátrányuk lehet azonban, hogy 100 mg l⁻¹ oldott fémkoncentráció alatt túl költségesek és kevésbé hatékonyak a biológiai módszerekkel szemben (Mehta és Gaur, 2005; Lodeiro et al., 2006; Naja és Volesky, 2010).

A bioremediáció alatt olyan technológiai eljárást értünk, amely a szennyezőanyagok mennyiségének részleges vagy teljes eliminációját, koncentrációjuk és/vagy káros hatásaik elfogadható szintre csökkentését élő szervezetek végzik. Elsősorban mikroorganizmusokat és/vagy növényeket, azok sejtalkotóit, anyagcseretermékeit használják a bioremediáció során. A remediálás helyszíne szerint megkülönböztetünk ex situ és in situ módszereket, az alapján, hogy a tisztítani kívánt közeg eltávolításával vagy eltávolítás nélkül, helyben végzik a szennyezőktől való mentesítést. A folyamat alkalmas a talaj, felszíni és felszín alatti víz, üledék szennyezőanyagainak ártalmatlanítására. A remediáció hatékonyságát befolyásolja a szennyezőanyag mennyisége, minősége, valamint függ az eltávolítást végző élőlények biológiai aktivitásától és számos fizikai és kémiai tényezőtől. A bioremediáció hatékonyságának növeléséhez a bontáshoz/eltávolításhoz szükséges optimális feltételeket folyamatosan biztosítani kell a mikroorganizmusok számára. Megfelelő tápanyag és nyomelem utánpótlás elősegíti a szaporodást és anyagcsere folyamatokat a szennyezőanyagok eltávolításhoz. Hozzájárul a hatékonyság növeléséhez az optimális fizikai és kémiai körülmények megléte, az adott közeg megfelelő hőmérséklete, kémhatása, redox-viszonyai stb. (Perei et al., 2012; Vidali, 2001).

Az 1970-es években felfedezték, hogy a bioszorpció és bioakkumulációs folyamatok a szennyvíztisztításban is alkalmazhatók. Felfigyeltek arra, hogy cink-, és ólombányák közelében található lagúnákban fonalas, sűrű hálószerű masszát képező algák élnek, amelyek nagy mennyiségben akumulálják a fémionokat. Ez a képességük pedig kompetíciós előnyhöz juttatta őket más fajokkal szemben (Naja és Volesky, 2010).

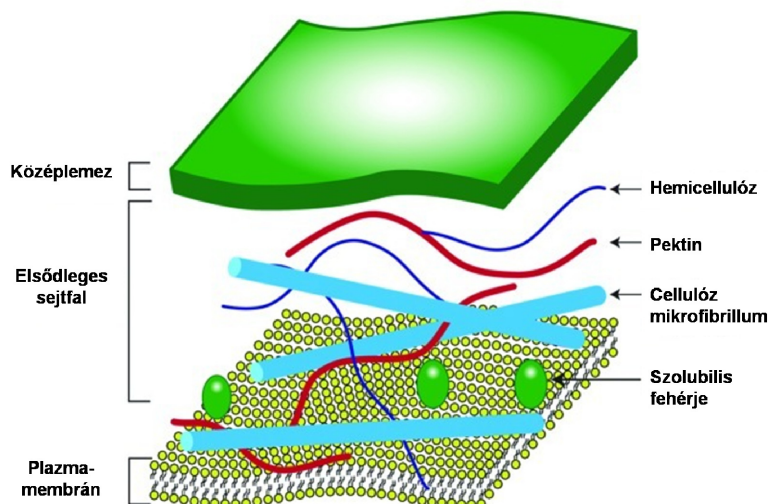
A mikroorganizmusok a fémszennyezők eltávolítását szorpció és/vagy akkumuláció útján valósíthatják meg. Az anyagcsere szempontjából kétféle módon játszódhat le a fémfelvétel. Bioszorpció során a nehézfémek a sejt felszínén (mikroorganizmusok élő és/vagy

holt biomasszája) kötődnek meg fiziko-kémiai folyamat során. Ebben az esetben a fémion-megkötés passzív, nem anyagcsere által közvetített folyamat. A bioakkumuláció során a nehézfémek szintén a sejtfelszínen kötődnek meg, ezután a megkötött anyag többnyire energiaigényes aktív transzporttal a sejt belsejébe kerül, így a nehézfémek sejten belüli koncentrációja növekszik (Chojnacka, 2010). Fontos kiemelni, hogy a bioszorpció metabolikusan passzív folyamat, ahol a szorbensek megkötése biológiai eredetű, de nem feltétlenül élő biomassza alkalmazásával történik, azonban a bioakkumuláció egy olyan aktív folyamat, ahol a szorbensek eltávolításához élő sejteket használnak. A biomassza szempontjából (élő vagy holt) is csoportosítható a két folyamat. Ebben az esetben a bioszorpció egy passzív, reverzibilis folyamat, ahol az eltávolítást holt biomassza végzi. A fémek adszorpcióval kötődnek a szorbenshez és nincs szükség a tápanyagok utánpótlására. A bioakkumuláció aktív, csak részben reverzibilis folyamat. A nehézfémek eltávolítása élő biomassza segítségével történik, a fémek adszorbeálódhatnak a sejtek felszínén és/vagy abszorbeálódhatnak a sejteken belül. A tenyészetek növekedéséhez és metabolizmusukhoz szükség van a tápanyagok utánpótlására (Chojnacka, 2010). A nehézfémek bioszorpcióját befolyásolja a pH, a hőmérséklet, egyéb kationok és anionok jelenléte, ionerőssége, valamint a biomassza típusa, szorpciós kapacitása és mennyisége, a szennyezőanyag koncentrációja (Naja és Volesky, 2010). A bioakkumulációt a bioszorpciónál említett tényezőkön kívül a sejteken belül lejátszódó folyamatok is befolyásolják, pl. a detoxifikációs mechanizmusok (szekvesztráció/kirekesztés, kompartmentalizáció, fémeket keláló fehérjék termelődése, kiválasztás; Perales-Vela, 2006).

A mikroorganizmusok közül a heterotróf szervezetek (baktériumok és gombák) alkalmazásának hátránya lehet, hogy a szerves szénforrást pótolni kell. Ez egy igen komoly korlátozó tényező, mivel a bioakkumulációval tisztított szennyvíz ritkán tartalmaz szerves szénforrásokat, emellett szerves források dúsítása a szennyvíztisztítás során nem előnyös. A fotoszintetizáló organizmusok (algák vagy vízi növények) használata előnyösebb a szennyező anyag eltávolítására, mivel viszonylag alacsony a tápanyagigényük, és szerves szénforrásra van szükségük, amely akár a füstgázok szén-dioxid tartalma is lehet (Rose et al., 1996; Prasanna et al., 2008).

2.3. Az algák sejtfala

Az algák sejtfala kiemelt szerepet tölt be a fémek megkötésének szempontjából. A sejteket általában egy vékony, merev sejtfal veszi körül, amelyet egy külső mátrix is boríthat, hasonlóan a baktériumok külső poliszaharid rétegéhez. Az algák széleskörű elterjedésének és diverzitásának köszönhetően sejtfaluk szerkezeti és kémiai felépítését nagymértékű változatosság jellemzi. A sejtfal összetett szénhidrátokból épül fel, legtöbb esetben cellulóz fibrillum hálózat alkotja, amelyhez különböző poliszacharidok, elsősorban hemicellulóz polimerek (pl.: pektin, xilán, mannán, alginsav, fuzidinsav) és glikoproteinek kapcsolódhatnak (3. ábra; Wang és Chen, 2009). Néhány taxon (Chlorophyta, Chrysophyta) sejtfalában vas és mangán vegyületek ($\text{Fe}(\text{OH})_2$, $\text{Mn}(\text{OH})_2$) lerakódásait figyeltek meg (Hammer, 1989). A Rhodophyta (vörösmoszatok) divízió Corallinales rend tagjaira jellemző, hogy kalcium-karbonátot (CaCO_3) választanak ki a sejtfalukban, néha stroncium- és mangán-karbonáttal együtt (Kaiser, 2012). A kovaalgák sejtfalát szilárd kovahéj (nagyon tiszta szilícium-dioxid) alkotja, melyet N-acetil-glükózamin egységekből felépülő kitin polimerek is szilárdíthatnak (Brown Jr., 1982). Néhány algacsoportnál (Cryptophyta, Euglenophyta) a sejtfal hiányzik (Wang és Chen, 2009).



3. ábra A cellulóz alapú sejtfal általános szerkezete (Flint et al., 2012).

2.3.1. Az extracelluláris fémmegkötés

Az extracelluláris fémmegkötésben a sejtfal, a sejtfalat felépítő biomolekulák és a sejtek által az extracelluláris térbe kiválasztott anyagok játszanak szerepet (4. ábra). A sejtfal exopolimerjein található különböző funkciós csoportok a fémek alapvető kötési helyeit képezik. Ezek a potenciális kötőhelyek a következők: hidroxil- ($-\text{OH}$), karboxil- ($-\text{COOH}$), amino- ($-\text{NH}_2$), karbonil- ($-\text{C}=\text{O}$), észter- ($-\text{CO}-\text{O}-$), szulfhidril- ($-\text{SH}$), szulfát (SO_4^{2-}) és foszfát (PO_4^{3-}) csoportok (Crist et al., 1981; Wang és Chen, 2009). Az erős és gyenge sav-bázis szabálynak megfelelően, az erős ionok, mint a Na^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} , stabil kötések kialakítására képesek az OH^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , $\text{R}-\text{COO}^-$ és $=\text{C}=\text{O}$ csoportokkal, azaz oxigéntartalmú ligandumokkal. Ezzel szemben a gyenge ionok, mint amilyen a legtöbb nehézfém (pl. Hg^{2+} , Pb^{2+}) erősen kötődnek az olyan csoportokhoz, mint a CN^- , $\text{R}-\text{S}^-$, $-\text{SH}^-$, NH_2^- és imidazol, azaz a kén vagy nitrogén tartalmú ligandumokhoz. Az átmeneti ionok, mint a Zn^{2+} vagy a Co^{2+} eltérő preferenciával kötődhetnek mindkét típusú ligandumhoz (Nieboer és Richardson, 1980; Pearson, 1963; Remacle, 1990).

Az anyagok felületén lejátszódó fizikai vagy fizikai-kémiai kölcsönhatást adszorpciónak nevezzük. A nehézfémek van der Waals-kötéssel kapcsolódhatnak az adszorbens felületéhez, vagy elektrosztatikus kölcsönhatás léphet fel a sejtfal és a fémek között, amely folyamatokat fiziszorpciónak nevezzük. Az adszorpció másik formája a kemiszorpció, amely során a fémek kémiai (ionos- és kovalens) kötéssel kapcsolódnak az adszorbeáló felülethez. Ioncsere során a sejtfal-poliszacharidokhoz kapcsolódó ionok és az azonos töltésű fémionok helyet cserélhetnek egymással (SenGupta, 2001).

A mikroorganizmusok által kiválasztott különböző szerves savak és a sejtfalat felépítő polimerek (4. ábra) funkciós csoportjai a különböző fémkomplexek kialakulását és a fémek precipitációját teszik lehetővé. A sziderofórok alacsony molekula tömegű, Fe^{3+} koordinációra képes vegyületek, amelyet a mikroorganizmusok vashiányos környezeti feltételek mellett választanak ki és a Fe^{3+} vegyületekkel analógiát mutató ionokat is képesek megkötni (pl. Ga^{3+} , Cr^{3+} , Sc ; White et al., 1995). A sziderofór vegyületek három kelátképző csoportjuk révén igen nagy stabilitású fémkomplexek kialakításában játszhatnak szerepet. A cianobaktériumok és az algák is termelhetnek sziderofór vegyületeket,

amelyek a vas mellett például a réz ionok megkötésére is képesek (Jardim és Pearson, 1984; Clarke et al., 1987). Az élesztőgombák, gombák és az algák által kiválasztott szulfid, foszfát és oxalát vegyületek képesek a fémek kicsapására (Gadd, 1988; Rathoure és Dhatwalia, 2015). Az oxálsavon kívül az algák további szerves savak (glikolsav, borkősav) kiválasztására képesek (Chang és Tolbert, 1970), amelyek fontos szerepet tölthetnek be a fémek megkötésében. A poliszacharidokon kívül a sejtfalba beépülő fehérjék, és/vagy a sejtfalat körülvevő nyálkaanyagok is szerepet játszanak a fémek megkötésében. Az algák sejtfala általában szabadon átjárható a víz, kisméretű (főleg szerves) ionok és gázok számára. A fémek nagy része a sejtfalon/ban adszorbeálódik, bejutásukat a sejtbe már a membrán transzportfolyamatai szabályozzák (Wang és Chen, 2009).

2.3.2. Az intracelluláris fémmegkötés

Az intracelluláris térben lezajló folyamatok szintén kiemelt szerepet tölthetnek be a nehézfémek megkötésében (4. ábra). A különböző kationok diffúzió útján kerülhetnek a sejt belüli térbe, a sejtmembrán permeabilitása befolyásolhatja ezeknek a kationoknak a felvételét (Mane, 2011). A transzport rendszer működését megzavarhatják az esszenciális elemekhez hasonló töltésű és ionsugarú nehézfémek, ezért az anyagcsere szempontjából passzívan is bekerülhetnek a sejtekbe (Ahalya et al., 2003).

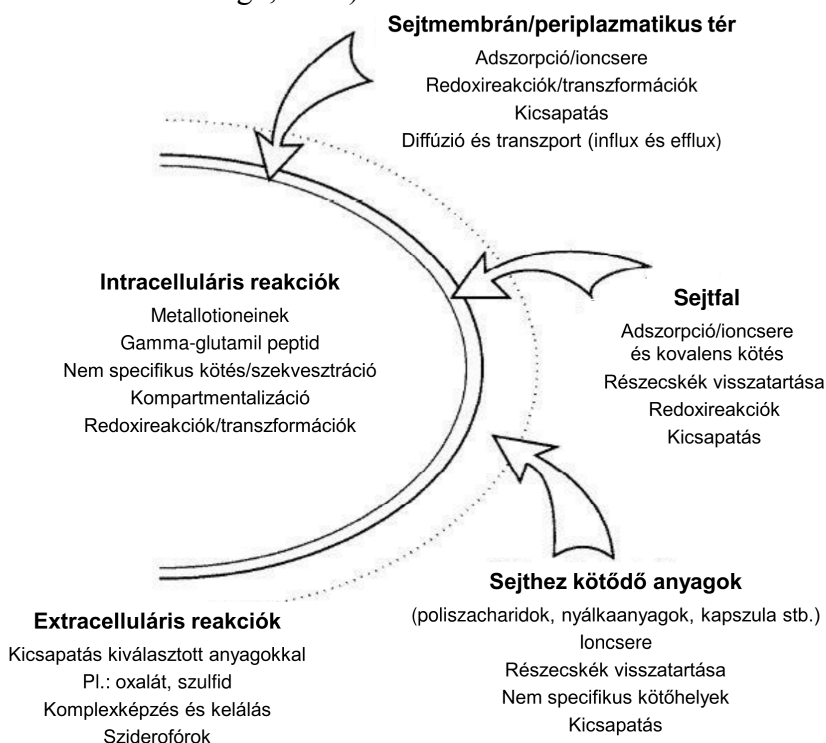
A mikroorganizmusok átalakíthatják a fémeket és a fémszerű anyagokat különböző oxidáció-redukciós, metilációs és dealkilációs folyamatok révén, mint például az oxoanionok redukciója vagy metilációja. Mind tengeri, mind édesvízi taxonok esetében is bizonyították, hogy képesek az arzénvegyületek metilációjára (Cullen et al., 1994; Granchinho et al., 2001; Zhang et al., 2013; Baker et al., 1983; Levy et al., 2005).

Kompartmentalizáció során a fémek az intracelluláris térben, vakuólumokban raktározódnak. A mikroalgák és a gombák körében találunk olyan mikroorganizmusokat, amelyek fémek megkötésére alkalmas proteineket termelnek (metallotioneinek). Ezek a molekulák az esetek többségében, mint szerves fémkomplexek a vakuólumokban, vagy zárványokban raktározódnak, segítik a citoplazma

nehézfém tartalmának szabályozását, meggátolják, vagy semlegesítik a nehézfémek toxikus hatásait (Perales-Vela et al., 2006).

A metallotioneinek tehát kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag fehérjék, amelyek alkalmasak a fémionok koordinálására. A fitokelatin polipeptidek kelálják a toxikus nehézfémeket. E proteinek termelése fokozódik fémionok hatására. A mérgező fémek detoxifikálásban és az esszenciális fémek homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet. Az ilyen típusú fehérjék alapvetően két csoportba sorolhatók:

- Az enzimek által szintetizált rövid láncú fehérjék, a fitokelatinok (III. típusú metallotioneinek), amelyeket hajtásos növényekből, algákból és bizonyos gombákból izoláltak.
- A genetikailag kódolt fehérjék, a II. típusú metallotioneinek, amelyeket cianobaktériumokból, algákból és hajtásos növényekből izoláltak (Cobbett és Goldsbrough, 2002).



4. ábra A mikroorganizmus fémkötési mechanizmusai a sejten kívüli és belüli térben (Gadd és White, 1993).

2.4. Az algák szerepe a nehézfémek eltávolításában

A bioszorpció és a bioakkumulációs folyamatok vizsgálata az 1960-as években kezdődött, ekkor jöttek rá, hogy a biomassza ugyan nem képes megsemmisíteni a fémionokat, de meg tudja változtatni azok tulajdonságait, ezért kitűnően alkalmazható a biohidrometallurgiai (vizes közegű fémkinyerési folyamatoknál egyes mikroorganizmusok katalizátorként funkcionálhatnak) és biogeokémiai folyamatok során (Chojnacka, 2010). Tíz évvel később felfedezték, hogy a bioakkumuláció folyamata a szennyvizek kezelésre is alkalmas módszer. A bioszorpció tanulmányozása az 1990-es években vált a tudomány fontos ágazatává. Bohumil Volesky (McGill Egyetem, Kanada) nemcsak a folyamat elméleti alapjait fektette le, hanem a mikroorganizmusok gyakorlati és kereskedelmi használatát is igyekezett megvalósítani: mivel a folyamat szelektívnek bizonyult, ezért a fémek újrahasznosításának gondolata már ekkor felmerült (Chojnacka, 2010).

Az elmúlt években is nagyszámú eredmény látott napvilágot a témában, azonban a baktériumokkal és gombákkal végzett kutatásokhoz képest az algákkal foglalkozó munkák száma még így is kevésnek mondható, valamint az eddig leírt fajok számához mérten a különböző taxonok fémkötési tulajdonságairól viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk. Fontos feladat, hogy kiszűrjük azokat a taxonokat, amelyek a gyakorlatban alkalmazhatók nagyobb mennyiségű fém eltávolítására, viszonylag könnyű izolálni őket és olcsó a fenntartási költségük (Romera, 2006). A kevésbé toleráns fajok érzékenységük révén a vizekben megjelenő toxikus mennyiségű és/vagy minőségű fémek kimutatására lehetnek alkalmasak. Monitorozásukkal lehetővé válhat a toxikus vegyületek gyors detektálása, így egyre nagyobb szerepet kapnak a vizek biomonitorozásában (Gold et al., 2003; Morin és Coste, 2006).

A bioszorpció/bioakkumuláció szempontjából vizsgált elemek viszonylag nagy számának és az alga taxonok rendkívüli diverzitásának köszönhetően, valamint a különböző irodalmak változatosságára (egy- és többfémes rendszerek, különböző előkezelések, a közeg pH változtatása stb.) és a terjedelmi korlátokra való tekintettel az alábbiakban csak az elmúlt bő egy évtizedben született fontosabb összefoglaló irodalmak kerülnek felsorolásra.

Mehta és Gaur (2005) munkája a szennyvizek nehézfém eltávolítására használható taxonokat, és a szennyvizekben megjelenő fontosabb nehézfémeket foglalja össze. A különböző édesvízi és tengeri mikro- és makroalga, valamint néhány cianobaktérium szorpciós kapacitását gyűjtötték össze. Romera és munkatársai (2006) összefoglalója megkülönbözteti az előkezelt és előkezelés nélküli egy fémrel végzett, valamint a több fémrel végzett bioszorpciós vizsgálatokat. Tanulmányukban szerepelnek zöld, barna és vörösmoszatok egyaránt, valamint ezen belül egysejtű és többsejtű szerveződésű fajok is. Naja és Volesky 2010-es tanulmánya a tengeri makroalgák Ag, As, Au, Cd, Cr, Cu, Eu, La, Ni, Pb, Pd, Pt, Se, V, Yb és Zn elemekre vizsgált bioszorpciós kapacitását foglalja össze. He és Chen (2014) munkájukban tengeri Phaeophyta, Chlorophyta és Rhodophyta divízió képviselőinek nehézfém szorpciós kapacitásait hasonlítja össze. A nehézfémek közül a Pb, Cu, Cd, Zn, Ni, Cr, Au és Co elemek eltávolításának kapacitását vizsgálták. Ezekből is látható, hogy a különböző irodalmakban találkozhatunk édesvízi és tengeri mikro- és makroalga taxonokkal egyaránt, valamint a vizsgált elemek tekintetében is igen szerteágazó a különböző bioszorpciós és/vagy bioakkumulációs tanulmányok száma.

Az általunk vizsgált fajok közül a *Monoraphidium* fajok napjainkban a biotechnológiai szempontból legígéretesebb algacsoportok közé kerültek. Bár más fajok, mint például a *Spirulina* vagy *Chlorella* nemzetségek különböző izolátumai évtizedekkel megelőzték a *Monoraphidium* fajok ipari alkalmazását, napjainkban egyre több reményteljes eredmény születik velük kapcsolatban. A *Monoraphidium* sp., *Scenedesmus* sp. és *Chlorella* sp. taxonokat gyakran nevelik biomasszájuk, lipid-, és klorofill-tartalmuk miatt (Ilavarasi et al., 2011; Zhao et al., 2016).

Viszonylag kevés irodalmi adat található a *Monoraphidium* fajokkal végzett bioszorpciós/bioakkumulációs tulajdonságainak vizsgálatairól. Az eddigi tanulmányok alapján a fémekkel szembeni érzékenységük révén a bioindikációban játszanak szerepet. *M. dybowskii* és *M. griffithii* fajoknál megfigyelték, hogy a víz alumínium-szennyezettségét már 0,1-0,2 mg l⁻¹ Al koncentrációnál jelzik (Hörnström et al., 1995), a *M. convolutum* esetében pedig azt figyelték meg, hogy a megszokottól eltérő módon reagál a toxikus Cr⁶⁺ jelenlétére (Takami et al., 2012). Egy *M. arcuatum* törzsnél kimutatták, hogy képes

arzént felvenni a környezetéből a vegyület típusától és mennyiségétől, illetve a tápanyagviszonyoktól függően (Levy et al., 2005).

A *Monoraphidium* fajokhoz képest a *Scenedesmus* nemzetséget biomassza termelő képességük, anyagcseretermékeik, valamint különböző biotechnológiai felhasználási lehetőségeik miatt szélesebb körben kutatták. Szennyvízben történő nevelésük és lipid termelő képességük miatt a bioüzemanyag-gyártás potenciális jelöltjei (Álvarez-Díaz et al., 2015; Zhang et al., 2014).

A *Scenedesmus* mikroalga genus általánosan alkalmazható nehézfémek eltávolítására, amelyet U^{6+} (Zhang et al., 1997), Cu^{2+} , Cd^{2+} (Terry és Stone, 2002) és Zn^{2+} (Aksu et al., 1998; Travieso et al., 1999; Cañizares-Villanueva et al., 2001) eltávolító képességük is bizonyít (Perales-Vela et al., 2006). Ma és munkatársai (2003) a *S. subspicatus* rézakkumuláló, Monteiro és munkatársai (2011b) szennyezett területről izolált élő és inaktivált *S. obliquus* törzs cinkeltávolító képességét vizsgálták (Ma et al., 2003; Monteiro et al., 2011b). A 3. táblázat a dolgozat szempontjából jelentős, a mikroalgák nehézfém szorpcióját tanulmányozó irodalmakat foglalja össze (3. táblázat).

3. táblázat Mikroalga taxonok fémeltávolítását vizsgáló tanulmányok

Vizsgált fajok	Vizsgált fémek	Szerző(k)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}	Adhiya et al., 2002; Arica et al., 2005; Bayramoğlu et al., 2006
<i>Chlorella miniata</i>	Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}	Lau et al., 1999; Chong et al., 2000; Han et al., 2014
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella sorokiniana</i>	Cu^{2+} Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} ,	Yan & Pan, 2002 Akhtar et al., 2004; Akhtar et al., 2008; Chong et al., 2000
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} , Cd^{2+}	Fraile et al., 2005; Aksu et al., 1997; El-Naas et al., 2007
<i>Desmodesmus pleiomorphus</i> <i>Dunaliella sp.</i>	Cd^{2+} Cu^{2+} , Cr^{6+}	Monteiro et al., 2010
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	As^{3+} , As^{5+}	Dönmez & Aksu, 2002; Gonzalez-Davila et al., 1995 Levy et al., 2005

<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Ni ²⁺ , Zn ²⁺	Chong et. al, 2000; Omar 2002a
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Cr ⁶⁺ , U ⁶⁺	Chong et. al, 2000; Dönmez et al., 1999; Monteiro et al., 2011b; Zhang et al., 1997; Zhang et al., 2016
<i>Scenedesmus abundans</i>	Cd ²⁺ , Cu ²⁺	Terry & Stone, 2002
<i>Scenedesmus acutus</i>	Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Cr ²⁺	Travieso et al., 1999

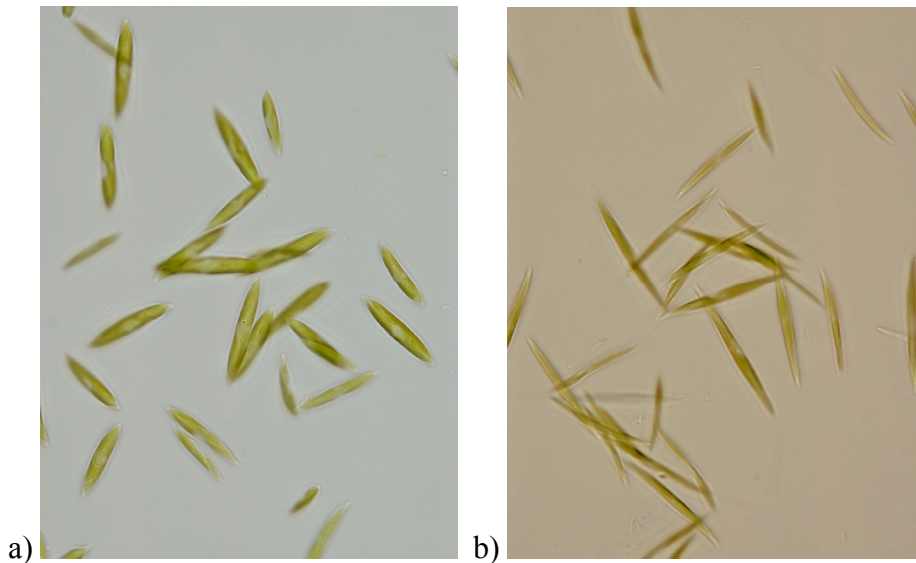
2.5. Az alkalmazott zöldalgák jellemzése

Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen) fenntartott *Monoraphidium pusillum* (Printz) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD0911), *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD1008), *Desmodesmus communis* (E.Hegewald) E.Hegewald (ACCDH-UD1004) zöldalga fajokkal végeztük. Ezek a mikroalgák felszíni vizekben kozmopolita/ubiquista élőlények, viszonylag könnyen elérhető és nagy mennyiségben tenyészthető fajoknak számítanak.

2.5.1. A *Monoraphidium pusillum* (Printz) Komárková-Legnerová és a *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová

A *Monoraphidium* nemzetség a Chlorophyta törzsön belül a Chlorophyceae osztályba, azon túl pedig a Sphaeropleales rend Selenastraceae családba sorolható (Guiry, 2017). A *M. pusillum* sejteknek falmenti szintestje van, mely szintestek a fiatal sejteknél a sejtet teljes hosszában kitöltik. A szintestekben pirenoid nem látható. Szaporodásuk 2-8 autospórával történik. A sejtek mérete 12-26×1,4-7,6 µm. A sejtek megjelenése mind a természetben, mind pedig tiszta tenyészetekben igen változatos (Schmidt és Fehér 1999; 5a. ábra).

A *M. griffithii* (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales, Selenastraceae) sejteknek falmenti szintestje van, úgy, mint az előzőekben már bemutatott *M. pusillum*-nak. A szintestek a sejteket teljes hosszúságukban kitöltik, de bennük a pirenoid nem látható. Szaporodásuk 2-16 autospórával történik. A sejtek mérete (28-) 50-72 (-110?) × 1,5-4 µm. (Schmidt és Fehér 1999; 5b. ábra).



5. ábra A kísérletek során alkalmazott *Monoraphidium pusillum* (a) és *M. griffithii* (b) izolátumok (1000× nagyítás; fotó: Dr. Bácsi István).

2.5.2. A *Desmodesmus* nemzetség és a *Desmodesmus communis* (E.Hegewald) E.Hegewald

Az elmúlt években a *Scenedesmus* nemzetséget morfológiai és/vagy genetikai alapon több genuszra osztották fel. A régebben *Scenedesmus quadricauda* fajként ismert taxont Krienitz és Brock (2012) *Desmodesmus communis*-ként tárgyalja. A *Desmodesmus* nemzetség a Chlorophyta törzsön belül a Chlorophyceae osztályba, azon túl pedig a Sphaeropleales rend Scenedesmaceae családba sorolható (Guiry, 2017). A nemzetségre jellemző, hogy határozott alakú soksejtes kolóniát, cönóbiumokat képeznek. A cönóbiumok 2-4-8-16 vagy ritkán 32 sejtből állnak, ahol a sejtek hossztengelyükkel párhuzamosan kapcsolódnak össze egymással. Szaporodásuk általában ostor nélküli autospórával történik. Egy teknő formájú, fálnak fekvő színtesttel rendelkeznek, a színtestbe ágyazva található az egyetlen pirenoid szemcséjük (Uherkovich, 1995).

A *D. communis* zöldalga fajt a 2-4-8 szorosan záródó, lineáris egysoros cönóbium-formával jellemezhetjük. A cönóbium 4 sarkán, a szélső sejtek pólusain egy-egy ívesen görbült túske (cauda) található. A

Desmodesmus nemzetség legismertebb és leggyakoribb képviselője, valódi kozmopolita, ubiquista élőlény. Világszerte minden olyan kontinentális és brakk vízből kimutatták, amelyet eddig vizsgáltak (Uherkovich, 1995; 6. ábra).



6. ábra A kísérletek során alkalmazott *Desmodesmus communis* izolátum (1000× nagyítás; fotó: Dr. Bácsi István).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Tenyésztési és kísérleti körülmények

Kísérleteinkhez a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének alga-törzsgyűjteményben fenntartott, a 2.5. fejezetben részletesen bemutatott *Monoraphidium pusillum* (Printz) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD0911), *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD1008), és *Desmodesmus communis* (E.Hegewald) E.Hegewald (ACCDH-UD1004) laboratóriumi törzseket használtuk. A tenyészeteket Jaworski tápoldatban (pH: 7–7,5; Melléklet 1. táblázat) 500 ml Erlenmeyer-lombikokban, 400 ml végtérfogatban (350 ml tápoldat + 50 ml inokulum) állandó hőmérsékleten (24°C), állandó fényintenzitáson (45-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 3330-3700 Lux), steril levegővel buborékoltatva tartottuk fent.

A kísérletek során a fent említett tenyésztési körülményeket alkalmaztuk. A szükséges koncentrációk (0,2; 0,8; 1,0; 1,4; 2,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0; 80,0; 120,0; 160,0 mg l^{-1}) eléréséhez a médiumhoz cink-szulfát ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), illetve réz-szulfát ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) törzsoldatot adtunk. A kísérletek során minden esetben kontroll, hozzáadott fémeket nem tartalmazó tenyészeteket is alkalmaztunk. A pontos kiindulási koncentrációkat a kísérletek kezdete előtt (Jaworski médium + fém, alga inokulum nélkül) minden esetben ellenőriztük.

3.2. A tenyészetek növekedésének nyomon követése

A tenyészetek növekedésének nyomon követéséhez a sejtszám/cönóbiumszám, a szárazanyag-tartalom, valamint a klorofill-tartalom változásait mértük.

3.2.1. A sejtszám/cönóbiumszám változások nyomon követése

A sejt- és cönóbiumszám meghatározásához naponta 200 μl mintát vettünk, a mintákat 10 μl Lugol oldat hozzáadásával tartósítottuk. A sejtek és cönóbiumok számlálását Olympus BX50 fluoreszcens mikroszkóppal, 400 $\times$ -os nagyításon, Bürker kamrában végeztük az MSZ EN 15204:2006 szabvány szerint.

3.2.2. A száraz tömeg és a klorofill-tartalom meghatározása

A tenyészetekből minden nap 6-6 ml mintát vettünk, a mintákat centrifugáltuk (Micro-centrifuge Type-320a, 5 perc, 10 000 rpm), majd liofilezés (fagyasztva szárítás) után visszamértük a tömegüket analitikai mérlegen, ezeket az adatokat felhasználtuk az egységnyi száraz tömegre vonatkoztatott fémmegkötés kiszámításához is (ld. 3.4. fejezet). A minták liofilizálásához Christ Alpha 1-2 LDplus készüléket, a tömegméréshez Ohaus Adventurer™ Pro analitikai mérleget használtunk.

A száraz tömeg méréséhez vett mintákat használtuk fel a klorofill-tartalom meghatározásához. A tömegmérés után a liofilizált mintákhoz első lépésben 500 µl metanolt adtunk, majd vízfürdőn első forrásig melegítettük. Ezután hozzáadtunk még 500 µl metanolt, majd a mintákat centrifugáltuk és a felülúszót 666, 653 és 750 nm-en fotometráltuk (Spectroquant Pharo 300 egy utas UV-VIS spektrofotométer). A minták klorofill-tartalmát Felföldy (1987) alapján számítottuk ki.

3.3. Morfológiai változások

A morfológiai változásokat a 10-40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. pusillum* és *M. griffithii*, valamint a 2,5-15 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *D. communis* tenyészetekben vizsgáltuk (ld. 4.1. és 4.2. fejezetek). A sejtek illetve cönóbiumok morfológiájában bekövetkező változásokat a 3.2.1. fejezetben említett mikroszkóppal 1000× nagyításon követtük nyomon.

3.4. A lipidperoxidáció mértékének meghatározása

A lipidperoxidáció mértékét a 10-40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. pusillum* és *M. griffithii*, valamint a 2,5-15 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *D. communis* tenyészetekben vizsgáltuk (ld. 4.1. és 4.2. fejezetek). A nehézfémek okozta oxidatív stressz kimutatásának egyik módja a tiobarbitursav reaktív anyagcseretermékek (TBARS) mennyiségének meghatározása (Verma és Dubey, 2003). A méréshez a kísérletek 0., 3. és 7. napján 5-5 ml mintát centrifugáltunk, a felülúszó eltávolítása után a sejteket 1 ml 0,25% 2-tiobarbitursavat (TBA) tartalmazó 10%-os triklórecetsavban (TCA) vettük fel és 30 percig 95 °C-on szárítószekrényben (Memmert Model 400) inkubáltuk. Lehűlés után a

felülúszót 532 és 600 nm-en (nem specifikus turbiditás értékek) fotométerlünk. A fotométert 0,25% TBA tartalmú 10%-os TCA oldatra nulláztuk, a lipidperoxidáció mértékét a 0. napon a kontrollban mért értékhez (100%) viszonyítva %-ban adtuk meg.

3.5. A fémek mennyiségi meghatározása

A fémek mennyiségi meghatározásához összesen 6-6 ml mintát centrifugáltunk a kísérletek 0., 3. és 7. napján. A sejteket feldolgozásig - 20°C-on tároltuk. A felülúszó mintákból 500 µl mennyiséget használtunk fel a nehézfémek mennyiségi meghatározáshoz, amelyet 4,5 ml 0,1 M HNO₃ oldattal savanyítottuk (10× hígítás) és feldolgozásig 4°C-on tároltuk. A felülúszók fémtartalmának csökkenéséből számítottuk ki az összes megkötött fém mennyiségét, illetve a száraz tömeg adatokat felhasználva kiszámoltuk az egységnyi száraz tömegre vonatkoztatott fémmegkötést is.

Az extracellulárisan megkötött fém mennyiségi meghatározásához a centrifugálással összegyűjtött biomasszát használtuk fel. A mintákhoz 6-6 ml 2 mM EDTA oldatot adtunk, majd az elegyeket tíz percig mágneses keverőn kevertettük (Tripathi és Gaur, 2006). A kevertetés után az EDTA-val kezelt mintáinkat centrifugáltuk és a felülúszókból újabb méréssel meghatároztuk a sejtek felszínéről lemosott/kicsapódott fémek mennyiségét. Előzetes méréseink (az összegyűjtött biomassza roncsolásos feltárása) alapján az intracellulárisan megkötött fém mennyisége egyezik az összes megkötött és az extracellulárisan megkötött mennyiségek különbözetével.

3.5.1. Az eltávolított cink mennyiségi meghatározása (4.1. és 4.2. fejezetek)

A felülúszók cinktartalmának meghatározása láng-atomabszorpciós spektrometriás (FAAS) eljárással (AAS, UNICAM 969; GF90 plus kemence és FS90 plus mintaadagoló egység) történt, magyar szabvány szerint (MSZ 1484-3:2006 5.) a Tiszántúli Környezetvédelmi és Természetvédelmi Felügyelőség Mérőállomásának laboratóriumában.

3.5.2. Az eltávolított cink, illetve réz mennyiségi meghatározása (4.3. fejezet)

A nehézfémek mennyiségi meghatározása mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometriás (MP-AES) módszerrel, MP-AES 4100 készülékkel (Agilent Technologies) történt. A méréseket a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék laboratóriumában végeztük, a készüléket a mérésekhez a Novo-Lab Kft. biztosította.

3.6. Statisztikai elemzés

A növekedési görbék tendenciáinak összehasonlításához a variancia-kovariancia-elemzés (ANCOVA) módszerét alkalmaztuk. A morfológiai- és az oxidatív stressz mértékében bekövetkezett változások statisztikai elemzését a kétszemponos varianciaanalízis (two-way ANOVA) módszerével végeztük. Az eltávolított fémek mennyiségi változásainak statisztikai értékeléséhez az egyszemponos varianciaanalízis (one-way ANOVA) és az ismételt mérések varianciaanalízis (repeated measures ANOVA) módszereket használtuk. Az alkalmazott algafaj, a nehézfémek minősége és mennyisége, valamint az eltávolítás mechanizmusa közötti összefüggések (4.3. fejezet) statisztikai elemzéséhez a háromszemponos varianciaanalízis (three-way ANOVA) módszerét alkalmaztuk (Zar, 2009; Hammer et al., 2001).

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. *Monoraphidium* fajok cink toleranciája és cink-eltávolító képessége

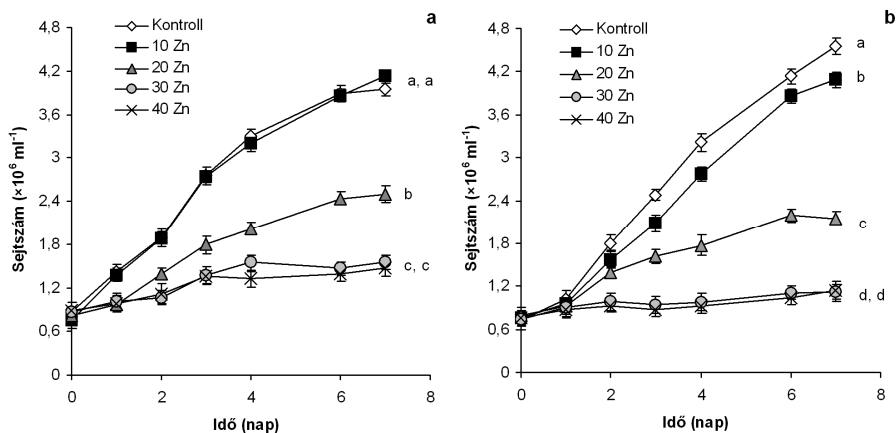
4.1.1. A tenyészetek növekedése

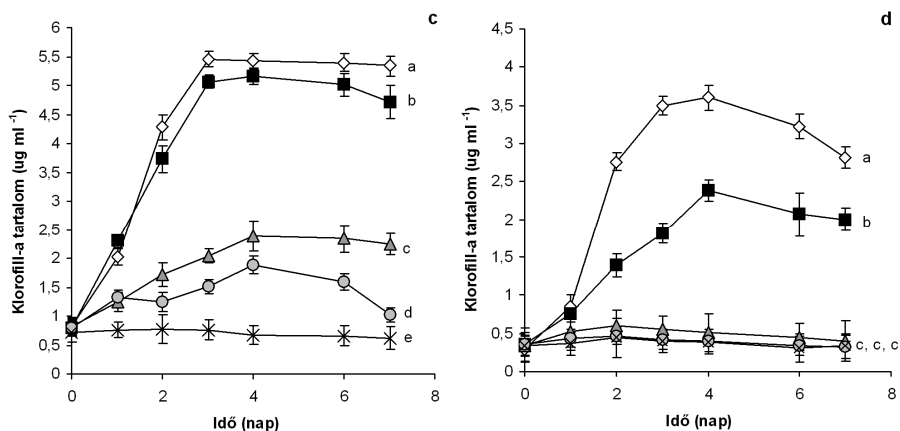
A cink növekedésre (sejtszám, illetve klorofill-a tartalom változásra) gyakorolt hatását 10 mg l^{-1} koncentrációtól vizsgáltuk a *Monoraphidium pusillum* és a *Monoraphidium griffithii* tenyészetekben. A 10 mg l^{-1} cinkkel kezelt *M. pusillum* tenyészet sejtszáma a tenyésztés végére kis mértékben emelkedett a kontrollhoz képest, de nem tért el szignifikánsan (5a. ábra), míg a *M. griffithii* tenyészetben ugyanaz a koncentráció már szignifikáns ($P < 0,001$) gátlást okozott a kontroll tenészethez viszonyítva (5b. ábra). Mindkét tenészetről elmondható, hogy a koncentráció növekedésével (20 , 30 és 40 mg l^{-1}) a sejtszámok fokozatos csökkenését figyeltük meg, a kezelt tenyészetek szignifikánsan ($P < 0,001$) eltértek a kontroll tenészettől. A kontroll tenészethez viszonyítva a 30 illetve a 40 mg l^{-1} -es kezelésekben 50 - 60% -al csökkent a sejtek száma már a tenyésztés 3 . napjától kezdve, amely tovább csökkent a tenyésztés utolsó napjáig (60 - 75%). A sejtszám alapján a 30 és a 40 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetek között nem volt szignifikáns különbség egyik izolátum esetében sem (5a-b. ábra). A 40 mg l^{-1} és ennél nagyobb (80 , 120 és 160 mg l^{-1}) kiindulási cink koncentrációjú tenyészetek sejtszáma nem különbözött egymástól szignifikánsan (nem bemutatott eredmények), a növekedés erősen gátolt volt. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a *M. pusillum* esetében még a 160 mg l^{-1} kiindulási cink-mennyiséggel kezelt tenyészetben is megfigyelhető volt kismértékű sejtszám emelkedés.

Általánosan elmondható, hogy a kontroll tenészethez képest a klorofill tartalom fokozatosan csökkent a növekvő cink koncentrációkkal (5c-d. ábra). A 10 mg l^{-1} cinkkel történő kezelés mindkét esetben a klorofill-a tartalom mennyiségének szignifikáns ($P < 0,001$) csökkenését okozta (5c-d. ábra). Azonban míg a *M. pusillum* törzs esetében a 3 . napon mindössze $\sim 7\%$, addig a *M. griffithii* törzsnél ugyanazon a napon $\sim 50\%$ volt az eltérés a kontrollhoz képest. A 20 - 40 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetek növekedése a tenyésztési idő végén már jelentősen csökkent, a klorofill-tartalom átlagosan 70% -kal volt kevesebb, mint a kontroll

tenyészetekben (5c-d. ábra). Nagyobb koncentrációk (80, 120 és 160 mg l⁻¹) a klorofill-tartalom további folyamatos csökkenéséhez vezettek.

Az akut toxicitás jellemzésére használt EC₅₀ értékeket meghatároztuk a sejtszám és a klorofill mennyisége alapján is (4. táblázat). A *M. pusillum* tenyészetben 3 és 7 nap expozíció során 33,69 illetve 27,7 mg l⁻¹ cink okozott 50%-os gátlást a sejtek számában, 18,79, illetve 16,99 mg l⁻¹ cink pedig a klorofill mennyiségében (1. táblázat). A *M. griffithii* tenyészetekben 3 nap expozíció alatt 25,63; 7 nap expozíció alatt 18,36 mg l⁻¹ cink gátolta 50%-al a sejtszám növekedést, 3 és 7 nap expozíció során 9,53 és 10,07 mg l⁻¹ cink okozott 50%-os gátlást a klorofill-tartalomban (4. táblázat). A sejtszám- és klorofill-tartalom változásai alapján a *M. griffithii* tenyészetek érzékenyebben reagáltak az alkalmazott kezelésekre, mint a *M. pusillum*, azonban azt hozzá kell tenni, hogy a növekedés változásainak nyomon követésére érdemes több paramétert is vizsgálni, mivel így pontosabb képet kaphatunk az okozott hatásokról. Jelen esetben a klorofill-tartalom mindkét faj esetében érzékenyebben reagált a kezelésekre, mint a sejtszám.





7. ábra A kontroll és a különböző mennyiségű cinkkel kezelt *Monoraphidium pusillum* és *M. griffithii* tenyészetek sejtszámában (a-b) és klorofill-a tartalmában (c-d) bekövetkező változások. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) a kisbetűk (a-e) jelölik.

4. táblázat A sejtszám, illetve a klorofill-a tartalom alapján számított EC_{50} értékek 3 és 7 nap expozíció után.

EC_{50} (mg l ⁻¹ Zn)	<i>M. pusillum</i>	<i>M. griffithii</i>
Sejtszám alapján, 3 nap expozíció	33,69	25,63
Sejtszám alapján, 7 nap expozíció	27,7	18,36
Klorofill-a alapján 3 nap expozíció	18,79	9,53
Klorofill-a alapján 7 nap expozíció	16,99	10,07

A *Monoraphidium* nemzetség cink-toleranciájával kapcsolatban kevés tanulmány született, az általunk vizsgált két *Monoraphidium* fajról tudomásunk szerint eddig nem volt közölt adat. A nehézfémek növekedésre gyakorolt hatásait bemutató eredmények összehasonlítását, az adatok értékelését nehezítik a különböző tanulmányokban alkalmazott változatos nevelési körülmények (pl. folyékony/szilárd táptalajok), a

különböző növekedési paraméterek és expozíciós idők alkalmazása. Eredményeink alapján mégis azt mondhatjuk, hogy a két vizsgált faj cink-toleránsnak tekinthető, azonban vannak lényegesen nagyobb koncentrációk mellett is életképes taxonok. A Travieso és munkatársai (1999) által vizsgált *Scenedesmus acutus* és *Chlorella vulgaris* törzsek növekedése csak 100 illetve 300 mg l⁻¹ cink-koncentráció felett mutatott csökkenő tendenciát a kontrollhoz képest. Az EC₅₀ értéke 300 mg l⁻¹-nek adódott egy *Chlamydomonas acidophila* izolátum esetében (Nishikawa és Tominaga 2001). Másrészt nagyszámú olyan fajt ismerünk, amelyek lényegesen érzékenyebbek a cink jelenlétére az általunk vizsgált *Monoraphidium* fajoknál. Tripathi és Gaur (2006) megfigyelte, hogy 1,64 mg l⁻¹ cink a növekedés gátlását okozta egy *Scenedesmus* faj esetében már 48 órán belül. A cink 6,5 mg l⁻¹ koncentrációja növekedésgátlást és oxidatív stresszt okozott egy *Pavlova viridis* izolátum esetén (Li et al., 2006). Abd-El-Monem és munkatársai (2011) kimutatták, hogy az általuk vizsgált két *Scenedesmus acutus* izolátum növekedését már 2,5 mg l⁻¹ cink koncentráció is gátolta.

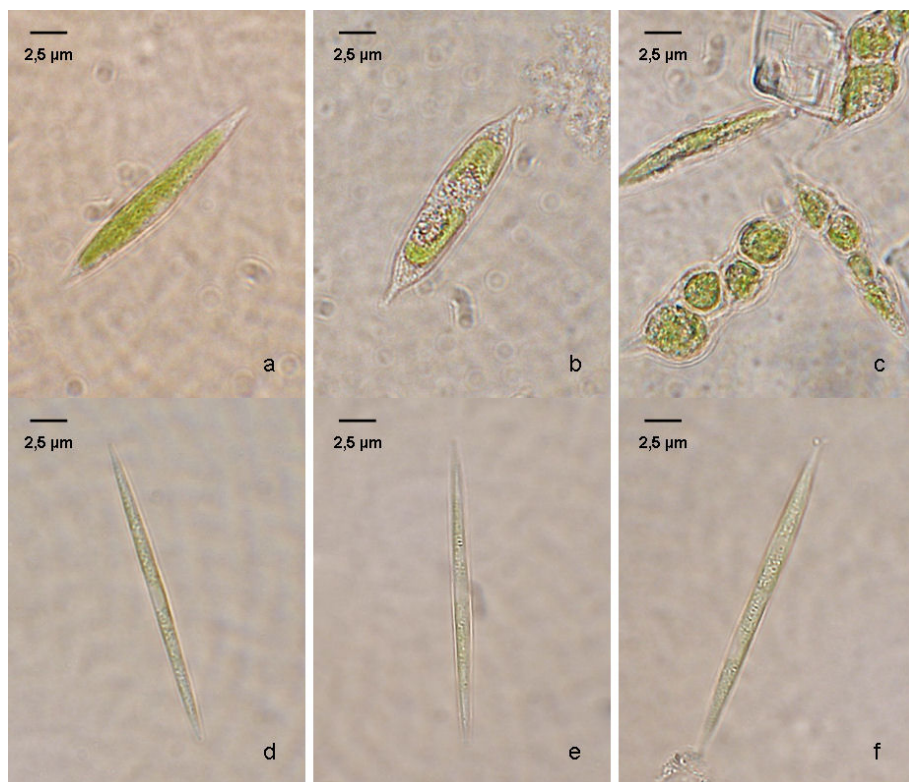
Ahogy a fentiekben említésre került, a *Monoraphidium* nemzetség köréből igen kevés adat áll rendelkezésünkre e fajok fém-toleranciájára vonatkozóan. Magdaleno és munkatársai (2014) a cink növekedésre gyakorolt hatását vizsgálták (sejt denzitás, valamint klorofill-a tartalom alapján) a *Monoraphidium contortum* és a közeli rokon *Ankistrodesmus fusiformis* esetében, amelyeket erősen szennyezett vízfolyásból izoláltak. 0,2 mg l⁻¹ cink koncentráció mellett a *M. contortum* növekedése 17%-os, az *A. fusiformis*-é pedig 65%-os csökkenést mutatott a kontrollhoz viszonyítva.

Összességében tehát megállapítható, hogy a két vizsgált *Monoraphidium* faj „közepes” cink-toleranciával jellemezhető, valamint, hogy a klorofill tartalom érzékenyebben reagált a kezelésre, mint a sejtszám. A nehézfémek növekedésre kifejtett hatásainak minél pontosabb megállapítása, illetve a nehézfém-tolerancia értékelése érdekében érdemes több növekedési paramétert vizsgálni.

4.1.2. A sejtek morfológiai változásai

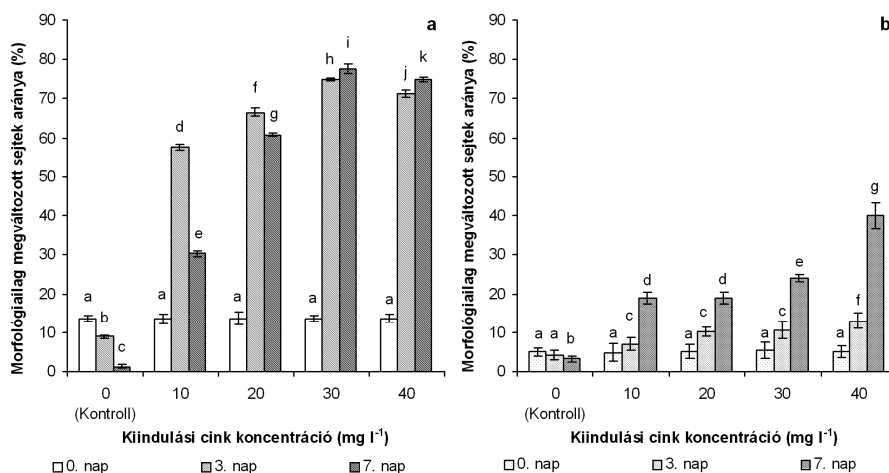
A morfológiai változásokat azokban a tenyészetekben követtük nyomon, amelyekben a hozzáadott cink jelentősen befolyásolta a növekedést, de még élő, növekedőképes tenyészetek voltak. A cink

eltérő változásokat okozott a sejtek morfológiájában a két *Monoraphidium* tenyészetben, a *M. pusillum* tenyészetek esetében markánsabban jelentkeztek a megfigyelt hatások (8. ábra). A cink hatására a *M. pusillum* tenyészet kisárgult, a sejtek sejthalmazokba álltak össze és kiüledtek. A sejtek befűződtek, valamint a deformálódott sejtek színtestjei feldarabolódtak (8a-c. ábra). A *M. griffithii* tenyészet szintén kisárgult, a sejtek ebben az esetben a cink hatására csillag alakú aggregátumokat képeztek és itt is kiüledést figyeltünk meg, a kezelés hatására a sejtek szélessége megnőtt (8d-e. ábra).



8. ábra A két *Monoraphidium* faj sejteinek morfológiai változásai a kísérlet harmadik napján (1000× nagyítás). a) *M. pusillum* sejt a kontroll tenyészetben; b) megváltozott morfológiájú *M. pusillum* sejt 10 mg l⁻¹ kiindulási cink-koncentráció esetén; c) deformált és összetapadt *M. pusillum* sejtek 40 mg l⁻¹ kiindulási cink-koncentráció esetén; d) *M. griffithii* sejtek a kontroll; e) 10 mg l⁻¹ kiindulási cink-koncentráció; és f) 40 mg l⁻¹ kiindulási cink-koncentráció esetén.

Mindkét *Monoraphidium* tenyészetben szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt a deformálódott sejtek aránya a kezelt tenyészetekben, mint a kontroll tenyészetekben (9a-b. ábra). A 10 és 20 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. pusillum* tenyészetekben a 3. napon (58 és 67%), a 30 és 40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetekben a tenyésztési idő utolsó napján volt a legmagasabb (78 és 75%) a deformálódott sejtek aránya. A koncentráció emelésével szignifikánsan ($P < 0,001$) nőtt az adott napokon megfigyelhető deformált sejtek aránya (9a. ábra). A *M. griffithii* tenyészetekben a deformálódott sejtek aránya lényegesen alacsonyabb volt a *M. pusillum* tenyészetekhez képest. A kezelt tenyészetekben a morfológiailag megváltozott sejtek aránya az idővel arányosan emelkedett, minden kezelés esetén a 7. napon volt a legmagasabb (9b. ábra). A deformálódott sejtek aránya a 30 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. griffithii* tenyészetben a 7. napon, míg a 40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben a 3. és 7. napon szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt a többi kezelt tenyészethez viszonyítva (9b. ábra).



9. ábra A morfológiailag megváltozott sejtek aránya a kontroll és a cinkkel kezelt *Monoraphidium pusillum* (a) és *M. griffithii* (b) tenyészetekben a 0., a 3. és a 7. napon. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns eltéréseket ($P < 0,05$) a kisbetűk (a-k) jelölik.

Természetes jelenség, hogy a megváltozott abiotikus és biotikus tényezők a sejtekben molekuláris szintű stressz-válasz reakciókat váltanak ki. A megváltozott környezeti hatásra kialakuló válaszreakció

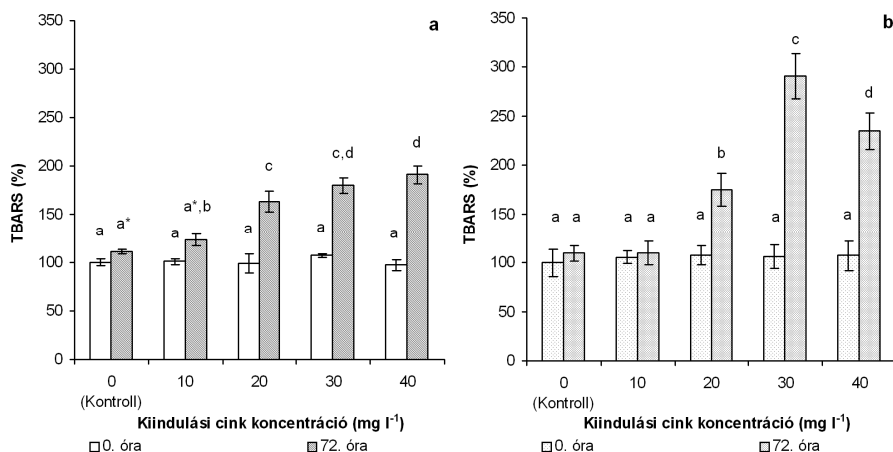
biztosítja az egyensúly helyreállítását és fenntartását a sejtekben. A reakció során megváltozhat a sejtek szerkezete, morfológiája és az egyes sejtorganellumok funkciója (Kültz, 2005; Chakravarty és Banerjee, 2008; Volland et al., 2014; Lütz-Meindl et al., 2016). Az abiotikus tényezők megváltozására adott válaszreakcióra jó példa Lüring és Van Donk (1997) tanulmánya. Megfigyelték, hogy az egyébként egysejtű *Scenedesmus acutus* zöldalgák kora tavasszal kolóniába rendeződnek a magas zooplankton abundancia hatására, így védekezve a zooplankton általi kifalás ellen. Pawlik-Skowronska (2003) megállapította, hogy a cink hatására kialakuló morfológiai változásokat, illetve azok mértékét nagymértékben befolyásolja az adott taxon ökotípusa. Ezen kívül a fém koncentrációja és a kitettség ideje is befolyással lehet ezekre a folyamatokra (Gold et al. 2003; Morin és Coste 2006). Carfagna és munkatársai (2013) transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) vizsgálták az ólom és kadmium hatását a *Chlorella sorokiniana* mikroalgára. A 24 órás ólom és kadmium expozíció is a kloroplasztiszok deformálódását okozta, a szintestek amőboid formát vettek fel, a tilakoid membránok rendezetlenek, megosztottak voltak. Çelekli és munkatársai (2015) a *Spirogyra setiformis* fonalas zöldalga morfológiájában bekövetkező változásokat tanulmányozták kadmium jelenlétében. Megállapították, hogy a kadmium hatással van a fonalas zöldalga morfológiájára, a normális esetben spirális szerkezetű szintestek 30 mg l⁻¹ kadmium koncentráció mellett deformálódtak.

A fémek okozta stressz-válaszokkal foglalkozó tanulmányok abban megegyeznek, hogy bizonyos koncentrációk felett megváltozik a sejtek szaporodása, a sejtek mennyisége csökken, a sejtek/sejtorganellumok alakja megváltozik, deformálódik. (Gold et al. 2003; Pawlik-Skowronska 2003; Morin és Coste 2006). Ezek a jelenségek az általunk izolált *Monoraphidium* fajoknál is megfigyelhetők, azonban mindkét faj esetében viszonylag nagy cink koncentrációk váltják ki ezeket a folyamatokat. A fémek a sejtsztódás szabályozásában szerepet játszó fehérjék –SH csoportjaihoz kapcsolódva képesek gátolni a sejtsztódást (Visviki és Rachlin, 1991). A 40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. pusillum* tenyészetekben megfigyelhető volt a sejtszám emelkedése (azaz sejtsztódás), ez lehetett az oka annak, hogy ebben a tenyészetben volt a legmagasabb a deformált sejtek aránya.

4.1.3. Oxidatív stressz - A lipidperoxidáció mértékének változása

A lipidperoxidációban bekövetkező változásokat a morfológiai változásokhoz hasonlóan azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, amelyek növekedését a hozzáadott cink mennyisége jelentősen befolyásolta, de még élő tenyészeteknek voltak tekinthetők. A kiindulási értékhez képest a 72. órában mért tiobarbitursav-reaktív anyagok (TBARS) mennyisége kis mértékben, de nem szignifikánsan növekedett a kontroll és a 10 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetekben is (10a-b. ábra). A *M. pusillum* tenyészetekben a 10 mg l⁻¹-nél nagyobb koncentrációk esetében szignifikánsan (P<0,001) magasabb volt a lipidperoxidáció mértéke a kontroll tenyészetéhez viszonyítva. A cink-koncentrációkkal együtt nőtt a TBARS mennyisége (10a. ábra), a 72. órában 65, 73 és 94%-kal volt magasabb a 0. órában mért értékekhez képest. A 72. órában a kontroll tenyészet TBARS mennyiségéhez mérten 53, 69 és 80%-kal magasabb aktivitások voltak mérhetők (10a. ábra).

A *M. pusillum* tenyészetéhez hasonlóan, fokozott lipidperoxidáció csak a 20, 30 és 40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. griffithii* tenyészetekben volt kimutatható. A legnagyobb TBARS koncentrációt a 30 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben mértük, ~180%-kal volt magasabb mind a kontrollhoz, mind pedig a kiindulási értékhez képest (10b. ábra). A 20 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. griffithii* tenyészet TBARS koncentrációja 65-67%-al, míg a 40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben 125 és 127%-kal nőtt a kontrollhoz és a kiindulási értékhez képest (10b. ábra).



10. ábra A lipidperoxidáció mértéke a kontroll és a cinkkel kezelt *M. pusillum* (a) és *M. griffithii* (b) tenyészetekben a 0. és a 72. órában. A lipidperoxidáció mértékét a tiobarbitursav reaktív anyagcseretermékek (TBARS) mennyiségében (%) kifejezve adtuk meg, a kezelés kezdetén a kontrollban mérhető értéket tekintve 100%-nak. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) a kisbetűk (a-d) jelölik.

A nehézfémek mellett számos környezeti tényező (pl.: UV sugárzás) indukálja a reaktív szabad gyökök keletkezését. A nehézfémek a sejtekbe bekerülve bizonyítottan fokozzák a reaktív oxigénszármazékok képződését, bizonyos koncentrációk felett, meghaladva a sejt védekezési mechanizmusainak kapacitását, felborítják a sejtek redox-egyensúlyi állapotát. Az átmeneti fémek, mint pl. a vas és a réz többféle oxidációs állapotuknak köszönhetően részt vesznek a különböző enzimek által irányított, katalizált folyamatokban (Pinto, 2003). Ezt a jelenséget támasztja alá Tripathi és Gaur (2004) munkája, melyben kimutatták, hogy a többféle oxidációs állapotban megjelenő fémek (Cu; Cr) a TBARS mennyiségének nagyobb mértékű emelkedését idézik elő, mint az egyféle oxidációs állapottal jellemezhetők (Zn, Cd). A lipidperoxidáció mértékének fémionok hatására bekövetkező emelkedését számos zöldalga faj esetében igazolták. Vavilin és munkatársai (1998) kísérleteik során arra az eredményre jutottak, hogy $30 \mu\text{M}$ ($\sim 2 \text{ mg l}^{-1}$) cink koncentráció fokozza a lipidperoxidáció mértékét *Chlorella pyrenoidosa* tenyészetekben. Li és munkatársai (2006) azt mutatták ki, hogy a $6,5 \text{ mg l}^{-1}$ cinkkel kezelt *Pavlova viridis* sejtek lipidperoxidációja 76%-kal nőtt a kontroll tenészetéhez képest. Murugan és Harish (2007) megfigyelték, hogy a szennyezett területekről származó *Cladophora glomerata* fonalas zöldalgában kétszer magasabb volt a lipidperoxidáció mértéke, mint a szennyezetlen területről gyűjtött taxon esetében. Bajguz (2010) megállapította, hogy a növekvő nehézfém koncentráció fokozza az antioxidáns enzimek (SOD, CAT, APX, GR) aktivitását és a nem-enzimatis antioxiidánsok (aszorbát, glutation) mennyisége is nő.

Eredményeink alapján a két *Monoraphidium* faj oxidatív stressz szempontjából sem tekinthető érzékenynek a cinkre, mivel a fokozott lipidperoxidációra utaló nagy TBARS-mennyiség csak viszonylag nagy (20 mg l^{-1}) cink koncentrációtól jelent meg.

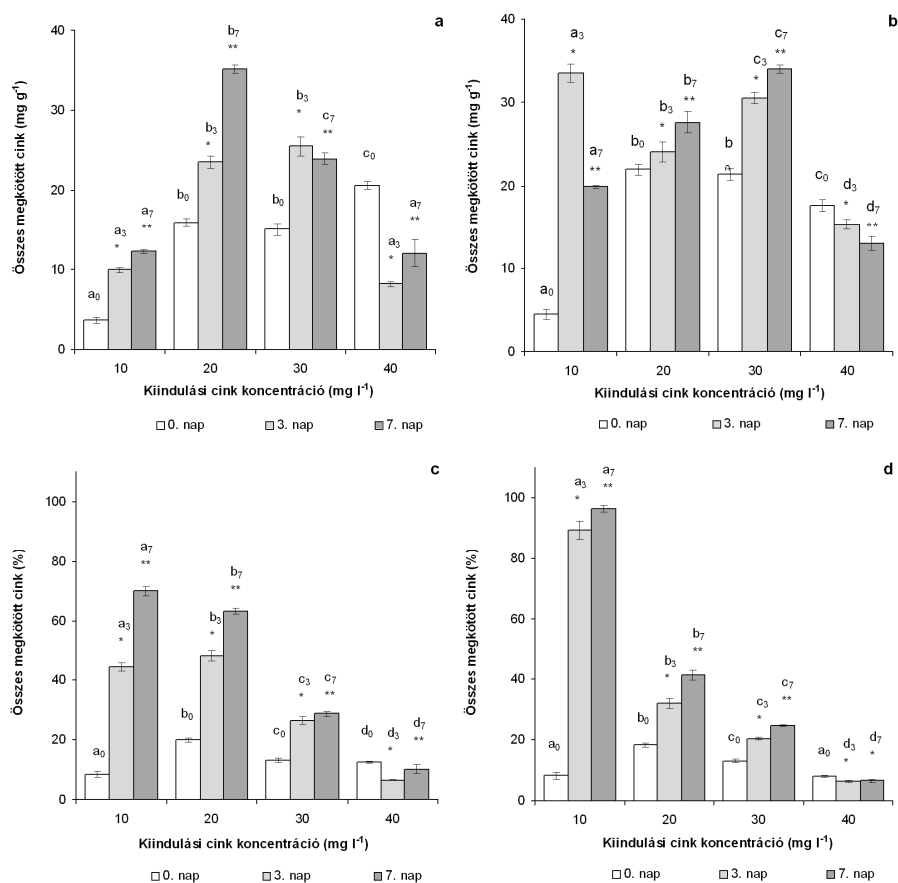
4.1.4. *Monoraphidium* fajok cink-eltávolítása

A cink eltávolítást azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, amelyekben a hozzáadott cink mennyisége a növekedést nem gátolta teljes mértékben, azaz élő tenyészeteknek voltak tekinthetők (lásd még 4.3. fejezet). A megkötött cink-mennyiségét egységnyi száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg (mg g^{-1}), valamint a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított fém %-os mennyiségét is ábrázoltuk.

A *M. pusillum* esetében a 20 mg l^{-1} , a *M. griffithii* esetében a 30 mg l^{-1} kiindulási cink koncentrációt tartalmazó tenyészetekben volt a legmagasabb az eltávolított cink száraz tömegre vonatkoztatott mennyisége ($\sim 35 \text{ mg g}^{-1}$ illetve $\sim 34 \text{ mg g}^{-1}$), míg a kiindulási mennyiségre vonatkoztatott legnagyobb mértékű %-os eltávolítás a 10 mg l^{-1} kezdeti cink mennyiséggel kezelt tenyészetekben volt megfigyelhető mindkét vizsgált törzs esetében (11a-d. ábra). A *M. pusillum* tenyészet a bemért cinkmennyiség ~ 70 %-át, a *M. griffithii* tenyészet ~ 96 %-át távolította el.

A száraz tömegre vonatkoztatott cink-eltávolítás esetében nem állapítható meg egyértelmű trend az idő előrehaladtával: egyes koncentrációknál szignifikánsan ($P < 0,001$) nőtt az eltávolított cink mennyisége, másoknál csökkent, egyes esetekben pedig mintavételről mintavételre változott az eltávolítás mértéke (8a-b. ábra). Hasonlóképpen nem lehet egyértelmű trendet megállapítani a koncentráció hatásával kapcsolatban sem: a kiindulási koncentráció növelésével nőtt az eltávolított cink mennyisége, de nem a koncentrációk emelkedésével egyenes arányban, sőt, 40 mg l^{-1} esetén visszaesés tapasztalható mindkét faj cink-eltávolításában. (11a-b. ábra).

A kísérletek indításakor bemért fémmennyiséget tekintve 100%-nak, az eltávolított cink %-os mennyisége mindkét *Monoraphidium* faj esetében szignifikánsan ($P < 0,001$) nőtt az idő előrehaladtával (kivéve a 40 mg l^{-1} -es kezeléseket (8c-d. ábra). A kezdeti koncentrációk hatását figyelembe véve általánosságban elmondható, hogy ahogyan nőtt a cink koncentrációja, úgy egyre kisebb mennyiség került eltávolításra (a 0. nap, illetve a *M. pusillum* esetében a 10 és 20 mg l^{-1} -es kezeléseknél a 3. nap kivételével (11c-d ábra).

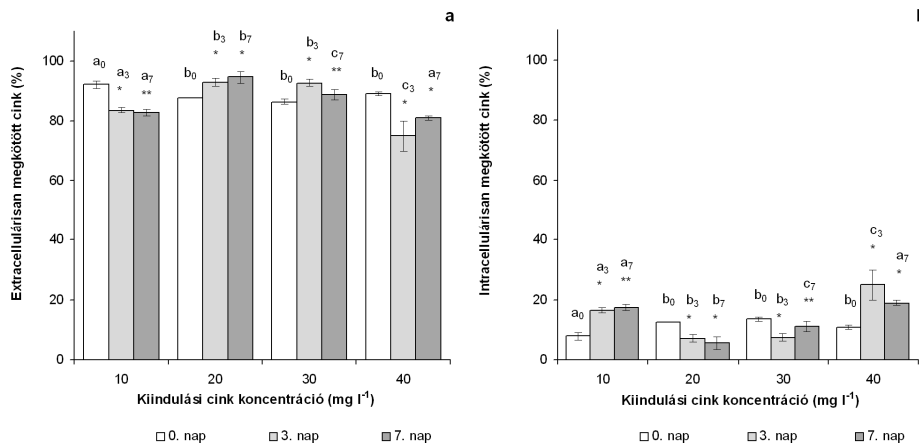


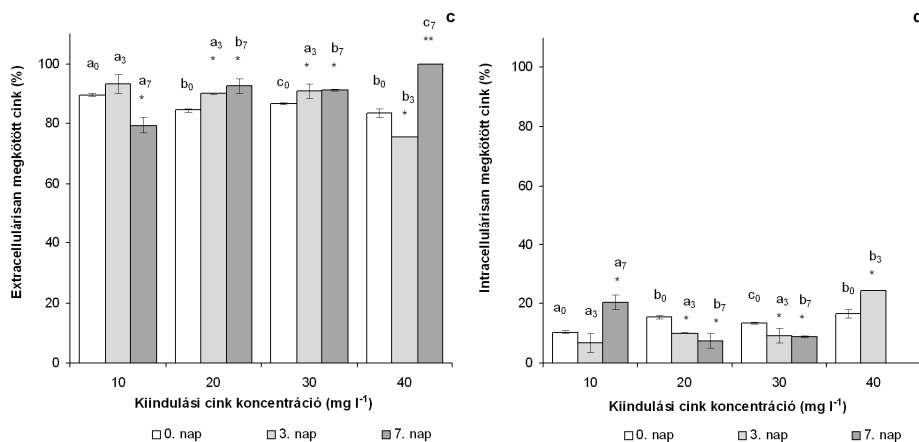
11. ábra A száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink mennyisége (a-b) és a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított cink %-os mennyisége (c-d) a *Monoraphidium pusillum* és *M. griffithii* tenyészetekben. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*, **), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Az extracellulárisan megkötött cink mennyiségét az összes eltávolított mennyiség %-ában fejeztük ki. Mindkét tenyészet esetében elmondhatjuk, hogy az extracellulárisan megkötött cink mennyisége minden kezelésben nagyobb volt, mint az intracellulárisan megkötött mennyiség (12a-d. ábra). Nem állapítható meg egyértelmű trend az idő

előrehaladtával: egyes koncentrációknál szignifikánsan ($P < 0,001$) nőtt az eltávolított cink mennyisége, másoknál csökkent, egyes esetekben pedig nem változott időben szignifikánsan az eltávolítás mértéke (12a-b. ábra). Hasonlóképpen nem lehet egyértelmű trendet megállapítani a koncentráció hatásával kapcsolatban sem: minden kiindulási koncentráció esetén közel azonos mértékű volt az extracelluláris cink-eltávolítás (90-99%). Kiemelendő, hogy a 40 mg l⁻¹-es kezelés esetén szignifikánsan ($P < 0,001$) nagyobb mennyiségű intracelluláris cink volt kimutatható a 0. és a 3. napon, míg a 7. npra az intracelluláris cink mennyisége mindkét faj esetében visszaesett (az *M. griffithii*-nél a 7. napon nem is tudtunk intracelluláris cinket kimutatni; 12c-d. ábra).

Tudomásunk szerint ezek az első adatok a *M. pusillum* és *M. griffithii* zöldalga fajok cink megkötésével kapcsolatban. Az irodalmi adatok egymással és a saját eredményeinkkel való közvetlen összehasonlítása nehéz a különböző nevelési körülmények, expozíciós idők alkalmazása és a mért eredmények eltérő módon történő bemutatása miatt. Azt azonban elmondhatjuk az irodalmi adatok ismeretében, hogy mindkét faj közepes cink-eltávolítási potenciállal jellemezhető.





12. ábra Az extracellulárisan és intracellulárisan megkötött cink mennyisége a 0., 3. és 7. napon a különböző kiindulási cink-mennyiséggel kezelt *M. pusillum* (a-b) és *M. griffithii* (c-d) tenyészetekben. Az extra- és intracellulárisan eltávolított mennyiségeket az összes eltávolított mennyiséghez viszonyítva %-ban adtuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillagok (*, **), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Bizonyos cianobaktérium és eukarióta alga izolátumok esetében viszonylag nagy cink mennyiségek eltávolítását írták le több tanulmányban is. Az *Oscillatoria angustissima* cianobaktérium 20 és 30 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetek 35,7 és 83,4 mg g⁻¹ cink mennyiséget kötöttek meg 10 napos expozíció során (Ahuja et al., 2001). A 0,5 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *Scenedesmus subspicatus* törzs 76,06 mg g⁻¹ cinket kötött meg 4 napos expozíció során (Schmitt et al., 2001). A Monteiro és munkatársai (2011a) által vizsgált *Desmodesmus pleiomorphus* 83,1 mg g⁻¹ cink eltávolítására volt képes. Vannak olyan taxonok, amelyek még ezeknél is nagyobb cink mennyiségek megkötésére is képesek. Nagyobb cink-mennyiség eltávolítását mutatták ki Ahuja és munkatársai (1999), valamint Pradhan és munkatársai (1998) *Oscillatoria angustissima* és *Microcystis* cianobaktérium törzsekben. Előbbi esetében 641,25 mg g⁻¹-nak, utóbbi esetében 999,5 mg g⁻¹-nak adódott az eltávolított cink mennyisége, azonban a cianobaktériumok lehetséges toxikus tulajdonságai miatt nem feltétlenül javasolt ilyen irányú alkalmazásuk,

még jó szorpciós kapacitásuk ellenére sem (Vasas et al., 2010; 2013). A Travieso és munkatársai (1999) által vizsgált *Scenedesmus acutus* és *Chlorella vulgaris* szintén jó cink-eltávolítók: előbbi 40 g feletti, utóbbi 200 g feletti mennyiségű cinket távolított el a tápoldatból literenként.

Más fajok az általunk vizsgált *Monoraphidium*-oknál kevesebb cink megkötésére képesek: a fonalas zöldalgák közül a *Spirogyra insignis* esetében 21,1 mg g⁻¹, a *Stigeoclonium tenue* törzs esetében 8,1 mg g⁻¹ cink szorpcióját mutatták ki (Romera et al., 2007; Pawlik-Skowrońska, 2003). Fukami (1988) vizsgálata alapján az *Euglena gracilis* laboratóriumi törzs 5 mg g⁻¹ cink mennyiség eltávolítására volt képes (Fukami, 1988).

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a vizsgált *Monoraphidium* fajok egyike sem a legnagyobb koncentrációjú oldatból távolította el a legnagyobb mennyiségű cinket, valamint a cink nagyobb része extracellulárisan került felvételre. A hazai felszíni vizeinkben közöséges algafajokkal végzett bioremediációs kísérletek igen biztatóak. Annak alapján, hogy az eltávolított cink mennyiségét a kiindulási fémmennyiség %-ában, vagy száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg, azt mondhatjuk, hogy a vizsgált fajok cink toleranciája és cinkeltávolító képessége alkalmassá teszi őket 20-30 mg l⁻¹ cink koncentrációjú vizek kezelésére. A vízszennyező anyagok kibocsátásairól szóló rendeletek a nehézfémekre vonatkozóan különböző kibocsátási határértékeket szabnak meg. A felszíni vízbe történő bevezetésük előtt a szennyvízminőségre vonatkozó követelmények cink esetében maximum 10 mg l⁻¹ vagy az alatti értékeket határozz meg (28/2004. (XII. 25.) KvVM rendelet), így az általunk vizsgált *Monoraphidium* fajok alkalmazhatók cink eltávolítására.

4.2. A *Desmodesmus communis* élő és holt biomasszájának cink-eltávolító sajátságai

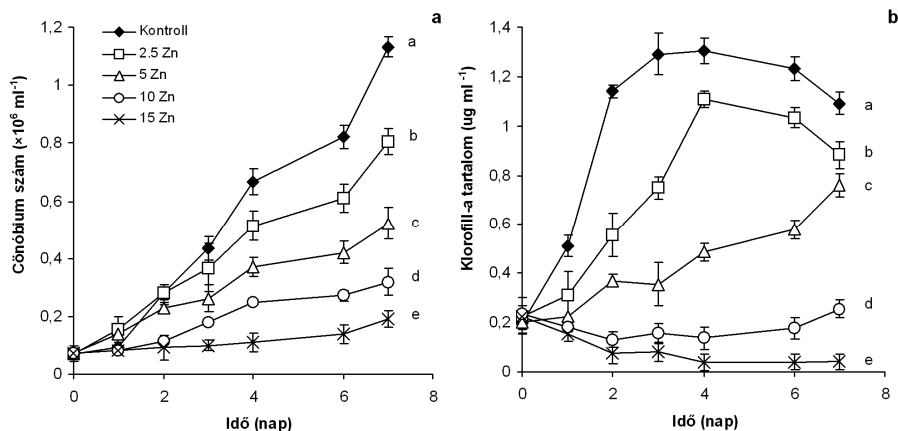
4.2.1. A *Desmodesmus communis* tenyészetek növekedése

Általánosan elmondható, hogy a kezelt tenyészetekben a cönóbiomok száma és a klorofill-a tartalom egyre alacsonyabb értéket mutatott a nagyobb cink koncentrációk mellett. Mindegyik kezelés esetén a növekedés trendje szignifikánsan ($P < 0,05$) eltért egymástól és a kontroll tenyésztettől is (13a-b. ábra). A 15 mg l^{-1} cink-koncentrációnál nagyobb koncentrációval végzett kezelések a növekedés teljes mértékű gátlását okozták (nem bemutatott adatok).

A cönóbiom-szám adatokból láthatjuk, hogy a cink már 2.5 mg l^{-1} koncentrációnál, a kísérlet 3. napjától gátolta a kezelt tenyészet növekedését (13a. ábra). A koncentrációtól függően a cönóbiomok száma a tenyésztés 3. napján $\sim 16\text{-}77\%$ -kal volt alacsonyabb a kontroll tenyészetéhez képest, a 7. napra ez a különbség tovább emelkedett ($\sim 28\text{-}83\%$). A kontroll tenyészetéhez képest a 10 és 15 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetekben már a tenyésztés 2. napjától szignifikáns ($P < 0,05$) csökkenés volt megfigyelhető a cönóbiomok számában (13a. ábra).

A cönóbiom-szám adatokhoz hasonlóan, a klorofill-a tartalom a cink koncentráció emelkedésével szintén csökkent, azonban a klorofill tartalom érzékenyebben reagált a cink jelenlétére, itt már a kísérlet 1. napján $\sim 40\text{-}70\%$ -kal alacsonyabb volt a kontroll tenyészetéhez viszonyítva (13b. ábra). A kontroll és a $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ cinkkel kezelt tenyészetekben a klorofill-tartalom a tenyésztés 4. napján érte el maximumát, azután a tenyésztési idő végére csökkent (13b. ábra). Az 5 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészet klorofill tartalma a 4. nap után még jelentős mértékben növekedett, a 4. napon a klorofill-a mennyisége $\sim 40\%$ -a, a 7. napon $\sim 70\%$ -a volt a kontroll tenyészetének (13b. ábra). A 10 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészet klorofill tartalma a tenyésztés 4. napjáig csökkenő tendenciát mutatott, majd azt követően enyhe növekedés volt tapasztalható, ami azonban jóval kisebb mértékű volt, mint az 5 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetnél (13b. ábra). A klorofill-tartalom a tenyésztés 4. napján körülbelül 10% -a volt a kontroll tenyészetben mérhető mennyiségnek, ami a tenyésztés utolsó napjára a kontrollban mérhető érték $\sim 20\%$ -ára emelkedett. A 15 mg l^{-1} cinkkel

kezelt tenyészet klorofill-tartalma a tenyésztési idő végéig csökkent, a 7. napon mindössze ~4%-a volt a kontroll tenyészetének (13b. ábra).



13. ábra A kontroll és a különböző mennyiségű cinkkel kezelt *Desmodesmus communis* tenyészetek sejtszámában (a) és klorofill-a tartalmában (b) bekövetkező változások. Az ábrákon az átlagértékek ($n=3$) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket ($P<0,05$) a kisbetűk (a-e) jelölik.

A *Desmodesmus communis* tenyészet esetében a cink cönóbiumszámra meghatározott EC_{50} értéke 6,58 és 4,02 mg l^{-1} -nek adódott 3 és 7 nap expozíció során, míg a klorofill mennyiségében 3,04 és 5,19 mg l^{-1} cink okozott 50%-os gátlást ugyanannyi expozíciós idő alatt (5. táblázat).

5. táblázat A cönóbiumszám, illetve a klorofill-a tartalom alapján számított EC_{50} értékek 3 és 7 nap expozíció után.

EC_{50} (mg l^{-1} Zn)	<i>D. communis</i>
Sejtszám alapján, 3 nap expozíció	6,58
Sejtszám alapján, 7 nap expozíció	4,02
Klorofill-a alapján 3 nap expozíció	3,04
Klorofill-a alapján 7 nap expozíció	5,19

Ahogy a 4.1.1. fejezetben arról szó volt a nehézfémek növekedésre gyakorolt hatásainak összehasonlításával kapcsolatban, az adatok értékelését nehezíti a különböző nevelési körülmények, az eltérően mért növekedési paraméterek és a különböző expozíciós idők alkalmazása. A *Scenedesmaceae* család képviselőinek a nehézfémekkel szembeni toleranciájával több tanulmány is foglalkozott. Omar (2002a,b) a cink *Scenedesmus quadricauda* és *Scenedesmus obliquus* zöldalga fajokra kifejtett hatását vizsgálta. Kimutatta, hogy a cink kis mennyiségben szükséges az algák normális növekedéséhez, azonban a nagy cink koncentráció mindkét faj növekedését gátolta. A *Scenedesmus obliquus* 4,5 ppm (4,5 mg l⁻¹), a *Scenedesmus quadricauda* esetében pedig 1,5 ppm (1,5 mg l⁻¹) cink koncentráció felett a növekedés intenzitása csökkent. A *Scenedesmus quadricauda* érzékenyebbnek mutatkozott a nagy cink koncentrációkra, mint a *Scenedesmus obliquus* zöldalga faj. A Monteiro és munkatársai (2010) által végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy az általuk izolált *Desmodesmus* (korábban *Scenedesmus*) *pleimorphus* még 30 mg l⁻¹ cink koncentráció mellett is életképes, bár növekedése csupán 12,5 %-a volt a kontroll tenyészetének. Ezzel szemben a Travieso és munkatársai (1999) által vizsgált *Scenedesmus acutus* még 100 mg l⁻¹ cink-koncentráció jelenlétében is növekedett.

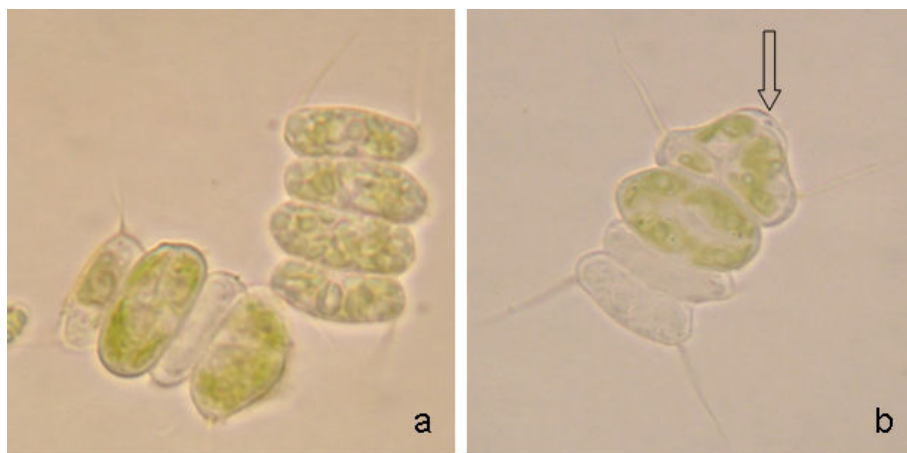
A cink, mint esszenciális mikroelem feltétlenül szükséges az algák normális növekedéséhez (Shrotri et al., 1981). Egyes vízi szervezetek nehézfémeket akkumulálhatnak a protoplazmába anélkül, hogy azok toxicitást okoznának a sejtekben (Omar, 2002a). Például a Fukami (1988) által vizsgált *Euglena gracilis* 5 mg g⁻¹ cink mennyiséget is képes ilyen módon elviselni. Costa és Leite (1990, 1991) azonban azt mutatták ki, hogy a cink gátolja az enzimrendszerek biokémiai és fiziológiai folyamatait, ahogyan Prasad és Prasad (1987) is kimutatták, hogy a nehézfémek gátolják a klorofill szintéziséért felelős enzimek működését (Costa és Leite, 1990, 1991; Prasad és Prasad, 1987). A nagy cink koncentráció jelenlétében csökken a sejtek klorofill tartalma, a karotinoid/klorofill aránya, ATP-áz enzim aktivitása és a sejtsztódás lelassul (De Filippis et al., 1981; Rai et al., 1981; Labyntseva et al., 1998).

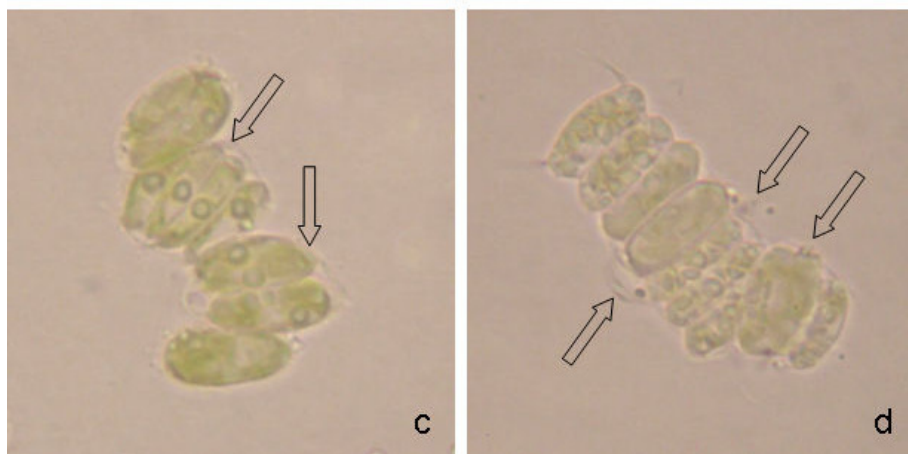
A *D. communis* zöldalga faj érzékenyebb a nagy cink-koncentrációkra (>15 mg l⁻¹), mint más *Scenedesmus* fajok. A cönóbiusszám és a klorofill-a tartalom alapján is elmondható, hogy a

Monoraphidium fajokhoz képest a *D. communis* tenyészet érzékenyebben reagált a cinkkel való kezelésekre.

4.2.2. A cönóbiумok morfológiai változásai

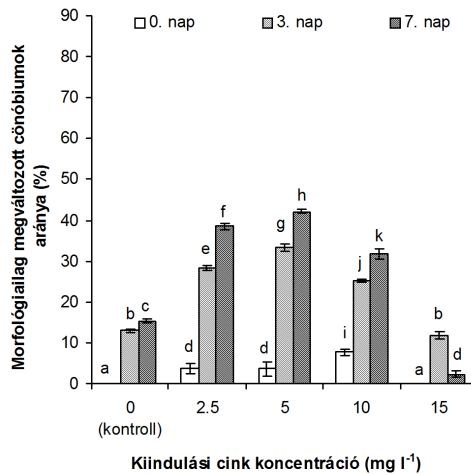
A cönóbiумok morfológiájában bekövetkező változásokat a *Monoraphidium* tenyészetekhez hasonlóan azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, amelyek növekedését a hozzáadott cink mennyisége szignifikáns mértékben befolyásolta, de még élő, növekedőképes tenyészeteknek voltak tekinthetők. A cink-kezelés hatással volt a cönóbiумok morfológiájára, a sejtek a normálistól (2-4-8 sejtes cönóbiумok) eltérő számban jelentek meg. Továbbá megfigyelhetők voltak a rendellenes sejtosztódásra utaló morfológiai jelek: összeolvadt sejtfalak, rendellenes helyzetű tüskék jelentek meg a cönóbiумokon (14. ábra).





14. ábra Morfológiai változások a cinkkel kezelt *Desmodesmus communis* cönóbiумokon (1000× nagyítás). a) kontroll tenyészet; b-d) kezelt tenyészetek. A nyilak a rendellenes sejtsztódásra utaló morfológiai jeleket mutatják (több sejt közös falal; rendellenes helyzetű tüskék, stb.).

A kiindulási állapothoz és a kontroll tenyészetéhez viszonyítva is emelkedett a rendellenes sejtszámú cönóbiумok aránya a 2,5, az 5 és a 10 mg l⁻¹ koncentrációjú cinkkel kezelt tenyészetekben (15. ábra). A 15 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben találtuk a legkevesebb rendellenes cönóbiумot, amely valószínűleg a növekedési adatokkal hozható összefüggésbe, ebben a tenyészetben számoltuk a legkevesebb cönóbiумot, illetve a klorofill szintézise is erőteljesen gátolt volt (15. ábra). A tenyésztési idő végére a kontroll tenyészetben is megfigyelhetők voltak rendellenes számú sejtből álló cönóbiумok, ~15% a kiindulási állapothoz képest (15. ábra), amelyet egyéb környezeti tényezők válthattak ki. A legnagyobb arányban az 5 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészet tartalmazott rendellenes számú sejtből álló cönóbiумokat, a tenyésztés 7. napjára az összes cönóbiум ~42%-a deformálódott sejtekből állt (15. ábra). A 2,5 és a 10 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetekben ~38% illetve ~32% volt a megváltozott sejtszámú cönóbiумok aránya a tenyésztési idő utolsó napján. A kontroll tenyészetéhez viszonyítva 16-27%-al volt magasabb a morfológiailag megváltozott cönóbiумok aránya (15. ábra).



15. ábra A morfológiailag megváltozott cönóbiomok aránya a kontroll és a cinkkel kezelt *Desmodesmus communis* tenyészetekben a 0., a 3. és a 7. napon. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) a kisbetűk (a-k) jelölik.

Ahogy az a 4.1.2. fejezetben is olvasható, a fémek okozta stressz-válaszokkal foglalkozó tanulmányok eredményeit összefoglalva elmondhatjuk, hogy bizonyos koncentrációk felett megváltozik a sejtek szaporodása, a sejtek mennyisége csökken, a sejtek/sejtorganellek alakja megváltozik, deformálódik. (Gold et al. 2003; Pawlik-Skowronska 2003; Morin és Coste 2006).

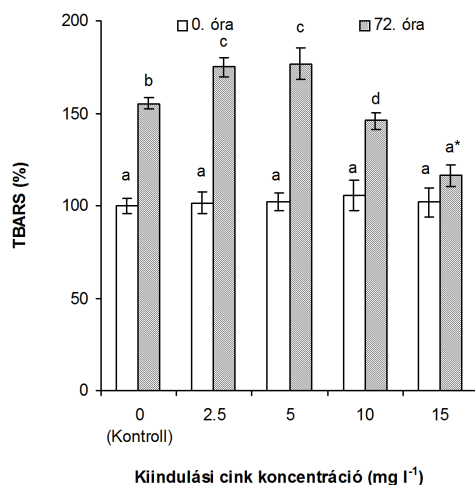
A cink hatására bekövetkező morfológiai változások nagy hasonlóságot mutatnak a szelén szelenit formája által okozott morfológiai változásokhoz: a *Scenedesmus quadricauda* sejteken a megszokottól eltérő számú tüskék jelentek meg, a cönóbiomon belül egyes sejtek elhaltak, míg mások osztódása, növekedése gátlódott (Umysová et al., 2009). Güclü és Ertan (2012) megfigyelték, hogy a növekvő cink-koncentráció csökkentette a sejtek számát az *Acutodesmus obliquus* és *Desmodesmus armatus* cönóbiomaiban (Güclü és Ertan, 2012). Visviki és Rachlin (1991) tanulmányukban kimutatták, hogy a fémek képesek gátolni a sejtosztódást azáltal, hogy -SH csoportokhoz kapcsolódnak, amelyek a sejtosztódás szabályozásában játszanak fontos szerepet (Visviki és Rachlin, 1991). Az algataxonok morfológiai változásai függenek az adott taxon ökotípusától (Pawlik-Skowronska,

2003), a környezet abiotikus és biotikus tényezőitől (Liu et al., 2010) a nehézfém koncentrációjától és a kitétettség idejétől (Gold et al., 2003; Morin és Coste, 2006). Összességében elmondható, hogy a cink a *D. communis* morfológiáját szignifikáns mértékben, de nem specifikus módon változtatja meg, a megfigyelhető deformitások más stressz-faktorok által kiváltott változásokhoz hasonlóak.

4.2.3. Oxidatív stressz - A lipidperoxidáció mértékének változása

A lipidperoxidációban bekövetkező változásokat a morfológiai változásokhoz hasonlóan azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, amelyek növekedését a hozzáadott cink szignifikáns mértékben befolyásolta, de még élő, növekedőképes tenyészeteknek voltak tekinthetők. A tiobarbitursav reaktív vegyületek (TBARS) koncentrációja a 72. órában mindegyik tenyészetben szignifikánsan ($P < 0,001$) nőtt a 0. órában mért értékekhez viszonyítva (16. ábra). 5 mg l⁻¹ kiindulási koncentrációig a cink növekvő mennyiségével együtt nőtt a tiobarbitursav reaktív anyagok mennyisége, míg a 10 mg l⁻¹ kezelés esetén a lipidperoxidáció emelkedése kisebb mértékű volt (nem haladta meg a kontrollban mért emelkedés mértékét), 15 mg l⁻¹ cink-koncentráció mellett pedig a tiobarbitursav reaktív anyagok mennyisége nem nőtt szignifikánsan a kiindulási értékhez képest (16. ábra). A kiindulási állapothoz képest a 72. órában ~75, 77 és 46%-al volt magasabb a TBARS mennyisége a 2,5; 5 és 10 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetekben, amely a kontrollhoz viszonyítva mindössze 20, 22 és 9% eltérést jelentett (16. ábra).

Ahogy az korábban említettük, az oxidatív stressz kialakulásában számos tényező szerepet játszhat, valószínűleg ezeknek a tényezőknek az együttes hatása indukálta, hogy a kontroll tenyészetben a kiindulási állapothoz képest a tenyésztési idő 3. napján mért tiobarbitursav reaktív vegyületek (TBARS) koncentrációja jelentősen megnőtt.



16. ábra A TBARS mennyisége a kontroll és a cinkkel kezelt *Desmodesmus communis* tenyészetekben a 0. és a 72. órában. A lipidperoxidáció mértékét a tiobarbitursav reaktív anyagcseretermékek (TBARS) mennyiségében (%) kifejezve adjuk meg, a kezelés kezdetén a kontrollban mérhető értéket tekintve 100%-nak. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) a kisbetűk (a-d) jelölik.

A *D. communis* tenyészetekben mérsékeltebb aktivitásnövekedés volt tapasztalható, amely alatta maradt a *Monoraphidium* fajok esetében cink-kezelés hatására bekövetkező változásoknak, azonban azt meg kell jegyeznünk, hogy az alkalmazott koncentrációk is eltértek a *Monoraphidium* tenyészetekhez képest. A *D. communis* (korábban *S. quadricauda*) más oxidatív stresszt kiváltó szennyező esetén is alacsonyabb lipidperoxidációs aktivitást mutatott több zöldalga fajhoz képest (Lei et al., 2005). A Tripathi és Gaur (2004) által vizsgált *Scenedesmus* izolátum esetében már 5 μM cink ($\sim 0,3 \text{ mg l}^{-1}$) mennyiségnél a TBARS detektálható mértékű emelkedését tapasztalták (Tripathi és Gaur 2004). Tripathi és munkatársai (2006) egy másik tanulmányukban a réz és cink ionok által kiváltott oxidatív stressz hatásait vizsgálták rövid (6 óra) és hosszú távú (7 nap) expozíció során. Bizonyították, hogy mindkét nehézfém fokozta a lipidperoxidáció mértékét, azonban a réz nagyobb mértékű oxidatív stresszt okozott, mint a cink (Tripathi et al., 2006). Ezt a jelenséget a réz redox-aktív tulajdonságának köszönheti, amely a rendkívül reakcióképes hidroxil

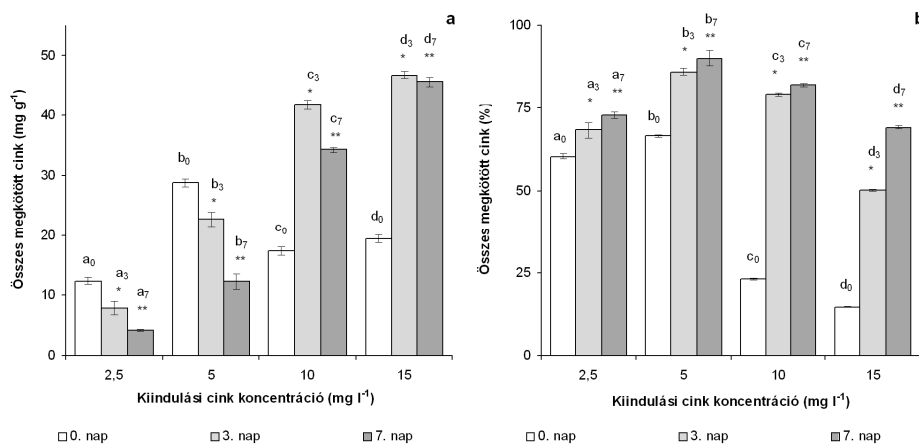
gyökök képződését katalizálja (Pinto et al., 2003). Ezt támasztja alá Bajguz (2010), valamint Mehta és Gaur (1999) korábbi munkája, amelyben kimutatták, hogy a nehézfémek közül a rézzel való kezelés váltotta ki a legnagyobb mértékű lipidperoxidációt a *Chlorella vulgaris* zöldalga esetében (Mehta és Gaur, 1999; Bajguz et al., 2010). Mindemellett elmondható, hogy az általunk kezelt tenyészetekben a tenyésztési idő 3. napján mérhető intracelluláris cink mennyisége (ld. 4.2.4. fejezet) önmagában is jól magyarázhatja a lipidperoxidációban bekövetkezett változásokat.

4.2.4. A *Desmodesmus communis* cink-eltávolítása

A cink eltávolítását a *Monoraphidium* fajok cink eltávolításához (4.1.4. fejezet) hasonlóan azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, amelyek esetében a hozzáadott cink mennyisége szignifikáns mértékben befolyásolta a növekedést, de még nem gátolta azt teljes mértékben (lásd még 4.3. fejezet). A megkötött cink-mennyiségeket szintén egységnyi száraz tömegre vonatkoztatva (mg g^{-1}), illetve a kiindulási koncentrációt 100%-nak tekintve annak %-ában adtuk meg.

A száraz tömegre vonatkoztatott legnagyobb mértékű megkötés ($\sim 47 \text{ mg g}^{-1}$) a tenyésztés 3. napján a 15 mg l^{-1} kezdeti cink-koncentrációkkal kezelt tenyészetekben volt megfigyelhető (17a. ábra), míg a kiindulási fémmennyiséget alapul véve az 5 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetben a 7. napon volt mérhető a legnagyobb mértékű eltávolítás: a cink mennyiségének ~ 90 %-a került eltávolításra a tápoldatból (17b. ábra). A száraz tömegre vonatkoztatott megkötött cink mennyisége szignifikánsan változott mind időben (0., 3. és 7. nap), mind az alkalmazott koncentrációk tekintetében minden kezelés esetében (17a. ábra). A 2.5 és 5 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetek esetében a 0. napon volt a legmagasabb a megkötött cink mennyisége, amely a tenyésztés végére fokozatosan csökkent. A 10 és 15 mg l^{-1} cinkkel kezelt tenyészetek esetében a 0. napon volt a legalacsonyabb a megkötött mennyiség, a tenyésztés 3. napjára emelkedett, majd a 7. napra lecsökkent (17a. ábra). A különböző koncentrációkat adott napon vizsgálva az mondható el, hogy a kezdeti, gyors megkötés (0. nap) nem mutatott összefüggést a koncentrációval, a 3. és 7. napokon azonban a kezelési koncentráció emelésével nőtt az eltávolított cink mennyisége (17a. ábra).

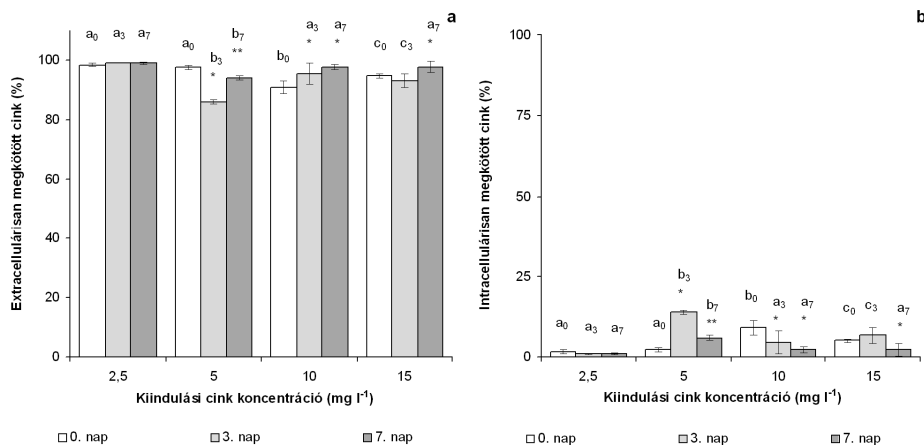
A kiindulási koncentrációra vonatkoztatott %-os eltávolítást vizsgálva az eltávolított cink mennyisége szignifikánsan ($P<0,001$) nőtt az idő előrehaladtával minden alkalmazott koncentráció esetében, míg adott napon a különböző koncentrációk és az eltávolított cink mennyisége között annyi összefüggés állapítható meg, hogy 5 mg l⁻¹-től a koncentráció emelésével csökkent az adott napon eltávolított mennyiség (17b. ábra). Általánosan elmondhatjuk a kezelt tenyészetekről, hogy a tenyésztési idő 3. napjára a cink több mint 50%-át megkötötték és a 7. napra ez a mennyiség tovább nőtt a kiindulási állapothoz képest.



17. ábra A száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink mennyisége (a) és a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított cink %-os mennyisége (b) a *Desmodesmus communis* tenyészetekben. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket ($P<0,05$) csillagok (*, **), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket ($P<0,05$) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Az extracellulárisan megkötött cink mennyiségét ebben az esetben is az összes eltávolított mennyiség %-ában fejeztük ki. A *Monoraphidium* tenyészetekhez hasonlóan a *D. communis* tenyészetek esetében is elmondható, hogy az extracellulárisan megkötött cink mennyisége minden kezelésben nagyobb volt, mint az intracellulárisan

akkumulált mennyiség (18a-b. ábra). A 2,5 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészet a cink ~99 %-át extracellulárisan kötötte meg a tenyésztési idő 3. és 7. napján egyaránt. Az extracelluláris megkötés minden további esetben is elérte a 90 %-ot vagy annál magasabb értéket, kivéve az 5 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben a tenyésztés 3. napján, amely esetében a megkötött cink ~14 %-a intracellulárisan halmozódott fel a sejtekben (18a-b. ábra).



18. ábra A különböző kiindulási cink-mennyiséggel kezelt *Desmodesmus communis* tenyészetek által extracellulárisan (a) és intracellulárisan (b) eltávolított cink mennyisége a 0., 3. és 7. napon. Az extra- és intracellulárisan eltávolított mennyiségeket az összes eltávolított mennyiséghez viszonyítva %-ban adjuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*,**), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Bár egyes alkalmazott koncentrációk esetében az idő előrehaladtával jelentkeztek szignifikáns eltérések az eltávolított mennyiségek között, illetve adott napon mért eltávolítás mértékét figyelembe véve szignifikáns eltérések voltak kimutathatók bizonyos koncentrációk között, egyértelmű trend sem az idővel sem az alkalmazott koncentrációkkal kapcsolatban nem volt kimutatható.

Az általunk vizsgált zöldalgák közül a *D. communis* tenyészet érzékenyebbnek mutatkozott a cink jelenlétére, mint a vizsgált *Monoraphidium* fajok, azonban 15 mg l^{-1} cink-koncentrációig hatékony cink-eltávolítással volt jellemezhető. Mindegyik kezelt tenyészeetről elmondható, hogy a cink nagyobb részét extracellulárisan köti meg, így a sejtfal nagyobb szerepet tölt be a fémek kötésében.

A Scenedesmaceae család fajait széles körben alkalmazzák fémeltávolító-képesség kutatására (Aksu et al., 1998; Travieso et al., 1999; Canizares-Villanueva et al., 2001; Perales-Vela, 2006). Az irodalmi adatok egymással és saját adatainkkal való összevethetőségét számos tényező (alkalmazott koncentrációk, nevelési körülmények, expozíciós idők) különbözősége nehezíti. Általánosan elmondható, hogy a korábbi egységes *Scenedesmus* nemzetség fajai jó fémeltávolító képességgel jellemezhetők, amely azonban széles tartományon belül változhat a nemzetségen belül is, valamint ugyanazon faj különböző izolátumai is eltérő toleranciával és fémkötő képességgel rendelkezhetnek. Az Omar (2002a) által vizsgált *D. communis* (korábban *Scenedesmus quadricauda*) izolátum például $5,03 \text{ mg g}^{-1}$ cinket távolított el $0,5\text{--}11 \text{ mg l}^{-1}$ oldatokból 24 óra alatt (Omar, 2002a), amely alatta van az általunk vizsgált izolátum eltávolító képességének. Az is elmondható, hogy a relative nagyobb fémkoncentrációknak kitett fajok alkalmazkodni képesek, így jobb fémeltávolító képesség alakulhat ki náluk. Ezt bizonyítják a szennyezett élőhelyről izolált és a kereskedelembe kapható törzsek fémeltávolító képességét összevető tanulmányok eredményei (Monteiro et al., 2009; 2011a).

Összességében azt mondhatjuk, hogy a hazánkban a természetes és mesterséges vizekben is közönséges *D. communis* élő biomasszája az előző fejezetben tárgyalt *Monoraphidium* fajoknál a cink jelenlétére érzékenyebb, de kisebb cink-koncentrációkkal szennyezett vizek esetében jelentősnek tekinthető fémeltávolító kapacitással rendelkezik.

4.2.5. A holt *Desmodesmus communis* biomassza cink megkötése

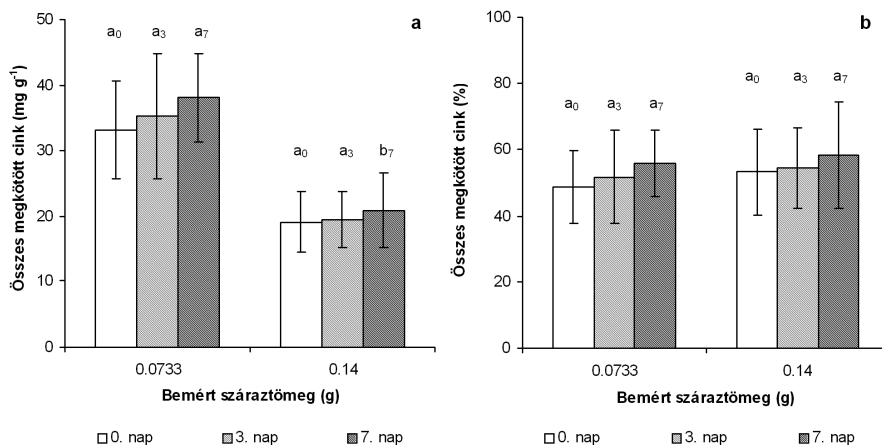
A holt biomassza cink megkötését az élő biomassza esetében is alkalmazott módon, egységnyi száraz tömegre (mg g^{-1}), valamint a kiindulási koncentrációra vonatkoztatva %-ban adtuk meg. A bemérendő holt biomassza mennyiségét a kiindulási fémkoncentrációra vonatkoztatott eltávolítás figyelembe vételével, a legnagyobb

cinkmennyiséget megkötő élő tenyészet adott napon mért száraz tömege alapján határoztuk meg. A 0,0733 g száraz tömeg az 5 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészet 3. napon mért száraz tömegének megfelelő mennyiségű biomassa, a 0,1400 g száraz tömeg az 5 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészet 7. napon mért száraz tömegének megfelelő mennyiségű biomassa.

A holt biomassa száraz tömegre vonatkoztatva ~33-38 mg g⁻¹ cinket kötött meg 0,0733 g bemért száraz tömeg esetén, míg majdnem kétszer annyi bemért száraz tömeg esetében mindössze csak ~19-21 mg g⁻¹-ot (19a. ábra). Az idő előrehaladtával nem változott szignifikáns mértékben a száraz tömegre vonatkoztatott eltávolított cink mennyisége. A bemért biomassa mennyiségét tekintve a nagyobb mennyiség a 7. napra szignifikánsan kevesebb cinket kötött meg, mint a kisebb mennyiség ugyan azon a napon (19a. ábra).

A holt *D. communis* biomassa az 5 mg l⁻¹ cinket tartalmazó tápoldatból a bemért cinkmennyiség ~50 %-át távolította el (19b. ábra). A tenyésztés végéig emelkedett a megkötött cink mennyisége, de sem az eltelt idő, sem a bemért biomassa mennyisége nem befolyásolta szignifikáns mértékben a holt biomassa által megkötött cink mennyiségét (19b. ábra).

A holt biomassa cink-kötése is jelentősnek mondható, mivel az összes bemért cinkmennyiség ~50%-a adszorbeálódott, azonban az élő biomasszához képest szignifikánsan (P<0,001) kevesebb cink megkötésére volt képes. A bemért száraz tömeg mennyiségének csaknem duplájára emelése mindössze ~1%-os emelkedést eredményezett a megkötött cink mennyiségében (19b. ábra).



19. ábra A holt *Desmodesmus communis* biotassza száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink mennyisége (a) és az 5 mg l⁻¹ kiindulási koncentrációt 100%-nak tekintve az eltávolított cink %-os mennyisége (b) a 0., a 3. és a 7. napon. A bemérendő biotassza mennyiségét a legnagyobb cinkmennyiséget megkötő élő tenyészet adott napon mért száraz tömege alapján határoztuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az eltávolított cink mennyiségek között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-b) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

A Monteiro és munkatársai (2011b) által vizsgált inaktivált *Scenedesmus obliquus* sejtek cink megkötése kapcsán azt tapasztalták, hogy a cink-kötés az 5-15 perc időintervallumban volt a legintenzívebb, majd a 30. perc után nem kötött meg több cinket a vizsgált biotassza. Ezzel szemben az általunk vizsgált liofilizált *D. communis* biotassza a bemért cinkmennyiség 8-26%-át kötötte meg fél-egy órában belül, tehát a további mennyiség adszorpciója hosszabb idő alatt játszódott le.

A holt biotassza, a sejtfal maradványai potenciális kötőhelyként szolgálhatnak a fémek számára. Vegyületeik, mint pl. a poliszacharidok jól alkalmazhatók fémek megkötésére (Volesky, 1990; Wase és Foster, 2003). Az általunk vizsgált *D. communis* ugyan annyi száraz tömegnek megfelelő mennyiségű élő sejtje több mint 30%-kal nagyobb mennyiségű fémot kötött meg, ami arra utal, hogy az élő sejtben, illetve az élő sejtek felszínén lejátszódó folyamatoknak nagy jelentősége van a cink megkötésében.

4.3. Az alkalmazott algafaj, a nehézfémek minősége és mennyisége, valamint az eltávolítás mechanizmusa közötti összefüggések

Az összehasonlíthatóság érdekében a különböző kémiai sajátosságokkal jellemezhető nehézfémek (cink és réz) felvételi mechanizmusait olyan koncentrációk mellett vizsgáltuk, amelyek egyik faj esetében sem okoztak jelentős mértékű gátlást a növekedésben, azaz az alkalmazott koncentráció tartományban a tenyészetek aktív, élő tenyészeteknek voltak tekinthetők. Ez alól kivételt képez a *Desmodesmus communis* rézzel való kezelése, ahol a viszonylag kicsi, de már jelentős növekedésgátlást okozó koncentráció miatt a fémeltávolítás nem tekinthető az élő tenészethez köthető folyamatnak a teljes alkalmazott koncentráció tartományban.

4.3.1. A *Monoraphidium pusillum* és *Desmodesmus communis* tenyészetek növekedése a különböző cink és réz koncentrációk mellett

4.3.1.1. Növekedés a sejt- illetve cönóbiumszám alapján

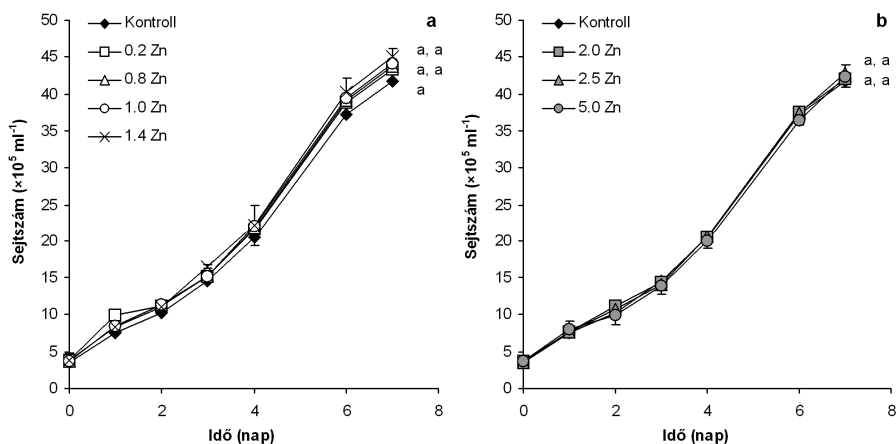
A 0,2-5,0 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. pusillum* tenyészetek sejtszámai nem tértek el egymástól és a kontroll tenésztől sem szignifikáns mértékben (20a-b. ábra). A 0,2-1,4 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetek sejtszáma kis mértékben növekedett a kontroll tenészethez képest, de nem szignifikánsan (20a. ábra).

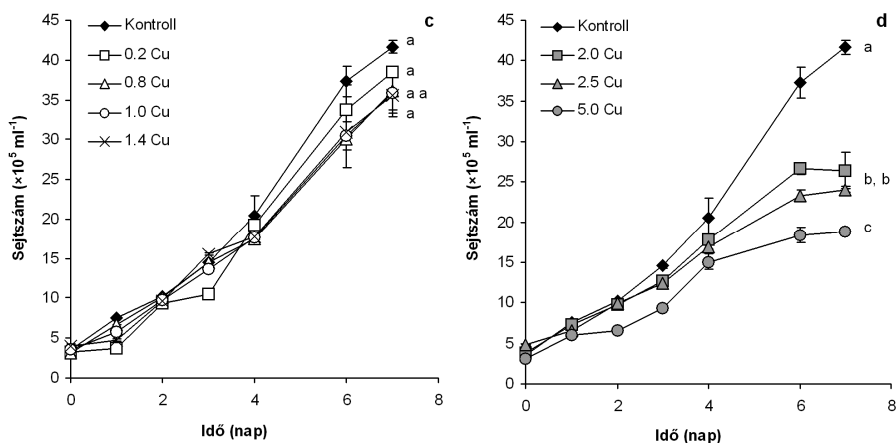
Ezzel szemben a 0,2-1,4 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetek esetében azt figyeltük meg, hogy a kontrollhoz képest nem szignifikáns mértékben ugyan, de csökkent a sejtek száma (20c. ábra). A koncentráció további növekedése a sejtszám fokozatos csökkenését okozta, a 2,0 és 2,5 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetek már szignifikáns (P<0,05) eltérést mutattak a kontroll és a 0,2-1,4 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetekhez viszonyítva is (20d. ábra). Az 5,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészet a kontrolltól és a kezelt tenyészetektől is szignifikánsan (P<0,01) különbözött, ebben a tenyészetben volt a legalacsonyabb a sejtek száma (20d. ábra). Azt mindenképpen meg kell azonban jegyezni, hogy a *M. pusillum* tenyészetek még 40 mg l⁻¹ réz jelenlétében is növekedőképesek voltak a tenyésztés 6. napjáig (nem bemutatott adatok).

A *M. pusillum* tenyészetekben a sejtszám alapján 50% gátlást okozó koncentráció a cink esetében nem volt kimutatható a vizsgált koncentráció tartományban, míg az EC₅₀ értéke réz esetében 3,82 mg l⁻¹–nek adódott a 7 napos expozíció alatt (6. táblázat). Ez a 7. napra számolt EC₅₀ érték jelentősen alacsonyabb, mint azt a cinkre vonatkozóan korábban megállapítottuk (4.1.1. fejezet) azaz annak ellenére, hogy kisebb réz koncentrációk szignifikánsan serkentették a tenyészetek növekedését, és nagyobb koncentrációk sem okoztak 50%-os növekedésgátlást a tenyésztés első 3 napján, a zöldalga rézre lényegesen érzékenyebbnek tekinthető, mint cinkre.

6. táblázat A *M. pusillum* sejtszáma alapján cinkre és rézre számított EC₅₀ értékek 3 és 7 nap expozíció után.

EC ₅₀ (mg l ⁻¹ fém)	<i>M. pusillum</i>
Zn, sejtszám alapján, 3 nap expozíció	-
Zn, sejtszám alapján, 7 nap expozíció	-
Cu, sejtszám alapján, 3 nap expozíció	-
Cu, sejtszám alapján, 7 nap expozíció	3,82





20. ábra A kontroll és a 0,2-5,0 mg l⁻¹ cinkkel (a-b) és rézzel (c-d) kezelt *M. pusillum* tenyészetek sejtszámában bekövetkező változások. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket (P<0,05) a kisbetűk (a-c) jelölik.

A cönóbiusszámok alapján a *D. communis* tenyészetekben a 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ cink-kezelés szignifikáns (P<0,05) mértékben serkentette a növekedést, míg az 1,0 és 1,4 mg l⁻¹ kezelések nem mutattak eltérést a kontrollhoz képest (21a. ábra). A 2,0, 2,5 és 5,0 mg l⁻¹ cinkkel történő kezelések esetében a cink növekvő koncentrációja a cönóbiusszámok fokozatos csökkenését okozta. Ezek a tenyészetek szignifikánsan (P<0,05) alacsonyabb mértékű növekedést mutattak a kontroll és a 2,0 mg l⁻¹ alatti cinkkel kezelt tenyészetekhez, valamint egymáshoz képest is (21b. ábra).

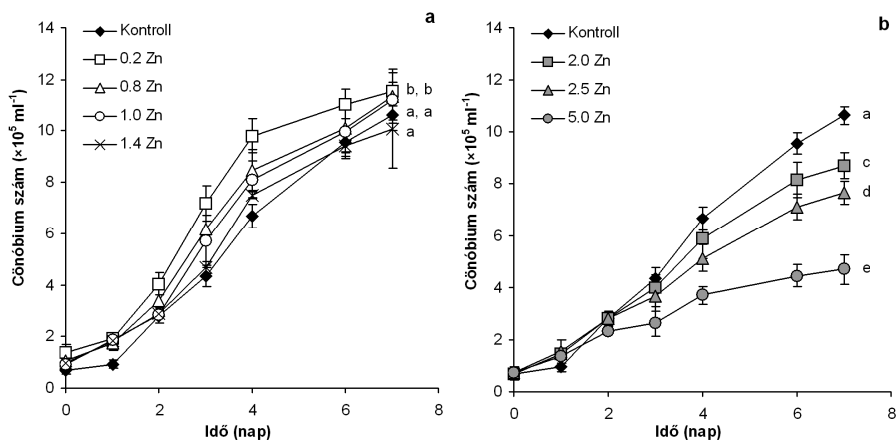
A 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ réz koncentráció nem mutatott eltérést a kontroll tenyészetéhez képest, azonban 1,0 mg l⁻¹ réz már jelentősen gátolta a *D. communis* tenyészet növekedését (21c. ábra). 1,4-5,0 mg l⁻¹ réz-kezelések szignifikánsan (P<0,01) eltértek a kontroll és a többi kezelt tenyészetétől egyaránt, azonban egymáshoz viszonyítva nem mutattak szignifikáns különbséget (21c-d. ábra). A tenyésztés 4. napjától az 1,0 mg l⁻¹ réz koncentráció feletti kezelések a növekedés ~80%-os vagy nagyobb mértékű gátlását okozták.

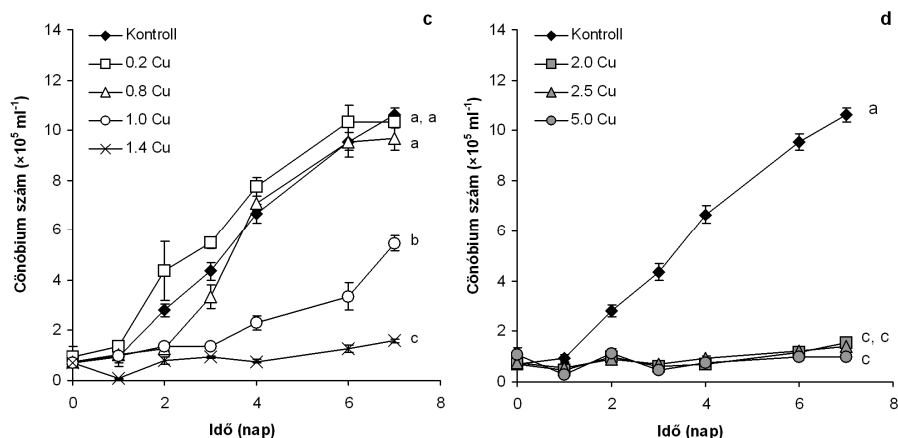
A cink a 7. napon 4,42 mg l⁻¹ koncentráció mellett okozott 50%-os gátlást a cönóbiomok száma alapján, ez jól összevethető a korábban, nagyobb koncentrációk alkalmazása mellett megállapított 4,02 mg l⁻¹

értékkel (4.2.1. fejezet). Az eltérés oka valószínűleg a koncentráció tartomány „finomabb” léptékében rejlik. A réz esetében az EC_{50} értéke a 3. és a 7. napon 1,13 és 1,12 $mg\ l^{-1}$ volt (7. táblázat), azaz a *D. communis* is lényegesen érzékenyebb a réz jelenlétére, mint a cinkre.

7. táblázat A *D. communis* cönóbiusszáma alapján cinkre és rézre számított EC_{50} értékek 3 és 7 nap expozíció után.

EC_{50} ($mg\ l^{-1}$ fém)	<i>D. communis</i>
Zn, sejtszám alapján, 3 nap expozíció	-
Zn, sejtszám alapján, 7 nap expozíció	4,42
Cu, sejtszám alapján, 3 nap expozíció	1,13
Cu, sejtszám alapján, 7 nap expozíció	1,12





21. ábra A kontroll és a 0,2-5,0 mg l⁻¹ cinkkel (a-b) és rézzel (c-d) kezelt *D. communis* tenyészetek cönóbiumszámában bekövetkező változások. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket (P<0,05) a kisbetűk (a-c) jelölik.

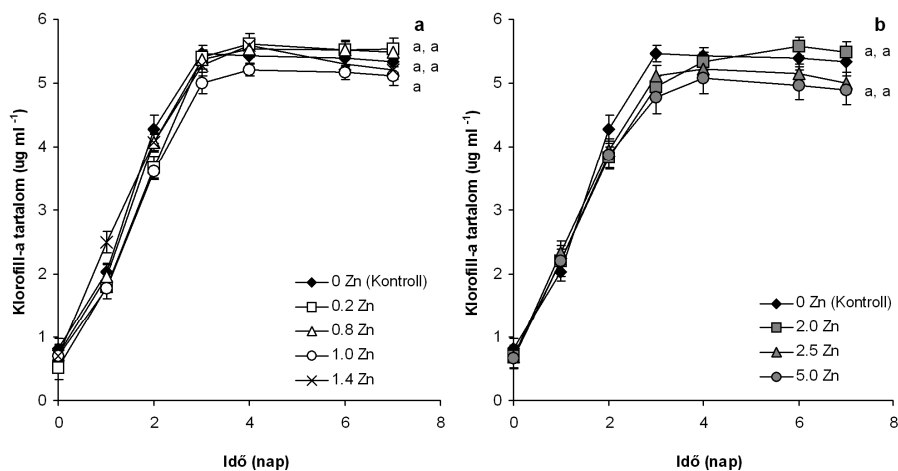
A *M. pusillum* tenyészetek sejtszámában a cink nem okozott szignifikáns mértékű serkentést és/vagy gátlást a kontroll tenészethez viszonyítva, ezzel szemben a 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *D. communis* tenyészetekben a cink növelte a sejtek osztódásának az ütemét a kontrollhoz képest, míg 2,0 mg l⁻¹ réz koncentráció már gátolta a növekedést. A rézzel történő kezeléseket során is hasonló jelenség volt megfigyelhető, azzal a különbséggel, hogy az 1,4 mg l⁻¹ réz-koncentrációnál nagyobb mennyiségű rézzel való kezeléseket már gátolták a *M. pusillum* tenyészetek növekedését is, míg a *D. communis* tenyészetek esetében már 1,0 mg l⁻¹ réz koncentrációtól gátlás volt megfigyelhető. Így a sejt- és cönóbiumszámok alapján elmondható, hogy a cinkhez viszonyítva a rézzel történő kezelésekre mindkét faj érzékenyebben reagált, valamint, hogy a *D. communis* a *M. pusillum*-hoz viszonyítva kevésbé toleráns mindkét vizsgált fém jelenlétére egyaránt.

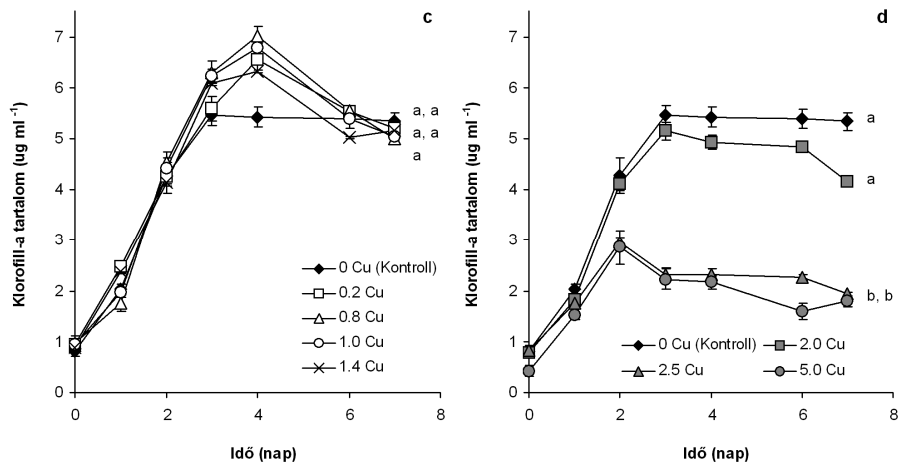
4.3.1.2. Növekedés a klorofill-tartalom alapján

A sejtszám adatokhoz hasonlóan a *M. pusillum* tenyészetekben a cink-kezelés nem okozott szignifikáns mértékű eltérést a klorofill-a tartalom mennyiségében egyik tenyészetben sem (22a-b. ábra).

A rézzel kezelt tenyészetekben 0,2-2,0 mg l⁻¹ réz nem okozott eltérést a kontroll tenyészetéhez viszonyítva (22c. ábra), azonban a 2,5 és 5,0 mg l⁻¹-es kezelésekben már szignifikáns (P<0,01) mértékben csökkent a klorofill-tartalom a többi tenyészetéhez képest (22d. ábra). Nagyobb réz koncentrációk (10-40 mg l⁻¹) a klorofill-tartalom további csökkenéséhez vezettek, 30 és 40 mg l⁻¹ réz jelenlétében a 3. illetve a 2. naptól a klorofill-a tartalom a kimutatási határ alá csökkent (nem bemutatott adatok).

Az akut toxicitás jellemzésére használt EC₅₀ értékeket a klorofill mennyisége alapján is meghatároztuk. A *M. pusillum* tenyészetben hasonlóan a sejtek számában bekövetkezett változásokhoz, a cinkkezelés nem ért el 50%-os gátlást a klorofill-tartalom mennyiségében, míg a rézzel történt kezelések során 2,53 és 2,38 mg l⁻¹ réz-koncentráció a klorofill-a tartalom növekedésének 50%-os gátlását okozta a tenyésztés 3. és 7. napján (8. táblázat).





22. ábra A kontroll és a 0,2-5,0 mg l⁻¹ cinkkel (a-b) és rézzel (c-d) kezelt *M. pusillum* tenyészetek klorofill-a tartalmában bekövetkező változások. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket (P<0,05) a kisbetűk (a-b) jelölik.

8. táblázat A *M. pusillum* klorofill-tartalma alapján cinkre és rézre számított EC₅₀ értékek 3 és 7 nap expozíció után.

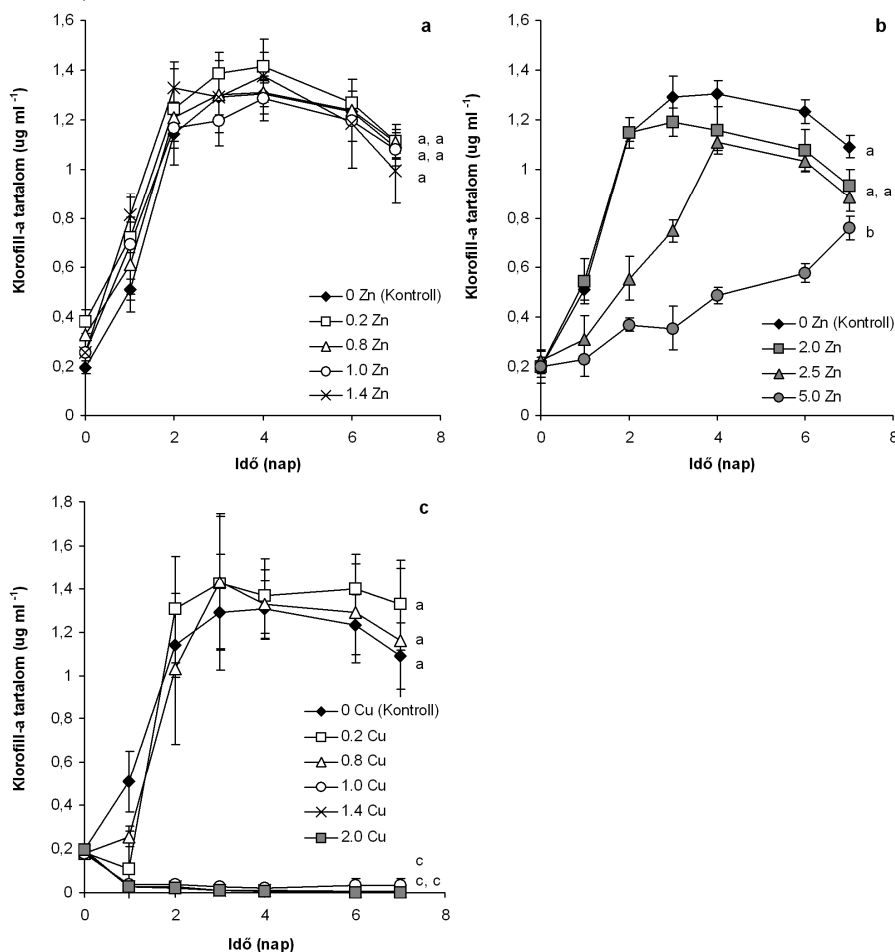
EC ₅₀ (mg l ⁻¹ fém)	<i>M. pusillum</i>
Zn, klorofill alapján, 3 nap expozíció	-
Zn, klorofill alapján, 7 nap expozíció	-
Cu, klorofill alapján, 3 nap expozíció	2,52
Cu, klorofill alapján, 7 nap expozíció	2,38

A *M. pusillum* tenyészetekhez hasonlóan a cink növekvő koncentrációja a *D. communis* tenyészetek esetében sem okozott szignifikáns különbséget a klorofill-tartalomban (23a-b. ábra), kivéve az 5,0 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetet (23b. ábra).

A tenyésztés 4. napjától a 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetek klorofill-tartalma meghaladta a kontroll tenyészetét, azonban ez az eltérés nem volt szignifikáns (23c. ábra). Az 1,0 mg l⁻¹ rézzel való kezelés jelentősen, míg 1,4 és 2,0 mg l⁻¹ réz teljes mértékben gátolta a klorofill szintézisét a *D. communis* cönóbiumokban. Az 1,0 mg

l^{-1} kezelés szignifikánsan ($P < 0,01$) eltért a 1,4 és 2,0 $mg\ l^{-1}$ kezelésektől, amelyek egymáshoz viszonyítva nem mutattak különbséget (23c. ábra).

A *D. communis* tenyészetekben a cink a 3. napon 3.08 $mg\ l^{-1}$ koncentráció mellett fejtett ki 50%-os gátlást a klorofill-tartalom alapján. A tenyésztés 7. napján nem volt kimutatható az EC_{50} értéken alapuló akut toxicitás, mivel azokban a tenyészetekben, ahol a cink egyáltalán nem vagy csak kis mértékben fejtett ki gátló hatást a tenyésztés végére a szaporodás hanyatló fázisába léptek, azokban a tenyészetekben viszont, ahol a tenyésztés elején jelentősen gátolta a klorofill szintézisét a tenyésztés végére még növekedő fázisban voltak. A réz esetében az EC_{50} értéke 0,97 és 0,96 $mg\ l^{-1}$ volt a 3 és 7 napos expozíció során (8. táblázat).



23. ábra A kontroll és a 0,2-5,0 mg l⁻¹ cinkkel (a-b) és rézzel (c) kezelt *D. communis* tenyészetek klorofill-a tartalmában bekövetkező változások. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. A szignifikáns különbségeket (P<0,05) a kisbetűk (a-b) jelölik.

8. táblázat. A *D. communis* klorofill-tartalma alapján cinkre és rézre számított EC₅₀ értékek 3 és 7 nap expozíció után.

EC ₅₀ (mg l ⁻¹ fém)	<i>D. communis</i>
Zn, klorofill alapján, 3 nap expozíció	3,08
Zn, klorofill alapján, 7 nap expozíció	-
Cu, klorofill alapján, 3 nap expozíció	0,97
Cu, klorofill alapján, 7 nap expozíció	0,96

A sejt- és cönóbiumszám változásaihoz hasonlóan a klorofill mennyiségében bekövetkezett változások is alátámasztják, hogy a *D. communis* érzékenyebb mind a cinkkel, mind a rézzel történő kezelésekre, valamint, hogy a réz jelenlétére mindkét faj érzékenyebb.

A növekedési adatok alapján elmondható, hogy a cink-kezelés 0,2-5,0 mg l⁻¹ koncentráció között nincs hatással az általunk vizsgált *M. pusillum* tenyészetekre. A rézzel történő kezelés azonban már 2,0 mg l⁻¹ koncentrációtól szignifikánsan (P<0,05) csökkenti a növekedés ütemét, azonban a *M. pusillum* tenyészet még 40 mg l⁻¹ réz mellett is képes növekedni. A nagyobb koncentrációk (30, 40 mg l⁻¹) azonban a klorofill szintézis teljes mértékű gátlását okozták (nem bemutatott adatok). A *D. communis* tenyészetekben a 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ cink serkentette a növekedést, azonban 2,0 mg l⁻¹ cink-koncentráció már szignifikáns (P<0,01) mértékben csökkentette a növekedést, a réz pedig 1,4 mg l⁻¹ koncentrációtól a növekedés teljes gátlását okozta a kezelt tenyészetekben.

Az irodalmi adatokból kiderül, hogy mind a cink, mind a réz nélkülözhetetlen mikroelem az élőlények, így az algák növekedése során is, kis koncentrációk mellett akár serkenthetik is a növekedést, azonban nagyobb koncentrációkban toxikussá válhatnak. (Morelli és Scarano, 2004; Li et al., 2006, Shrotri et al., 1981; Sugarman 1983). Számos fiziológiai és biokémiai folyamatban részt vesznek, a réz leginkább mint redox-aktív fém a fotoszintetikus és légzési elektrontranszportlánc

folyamataiban játszik szerepet, a cink az anyagcsere-folyamatokban szereplő enzimek szerkezeti részeként, vagy azok funkcionális modulátoraként működik (Nguyen-Deroche et al., 2012; Falkowski és Raven, 1997). Mindkét fém esetében megfigyelték, hogy nagyobb koncentrációban gátolják a sejtek osztódását, a tenyészetek növekedését, a fotoszintézist és a klorofill-a szintézist (Wong és Chang, 1991; Cid et al., 1995; Monteiro, 2011a,b; Omar, 2002a,b). Emellett azonban meg kell jegyeznünk, hogy a nehézfémek által kiváltott toxicitás mértéke fajonként, sőt ugyanazon faj különböző genotípusaiként is jelentős mértékben eltérhet (Bertrand és Poirier, 2005). Adott faj szenzitivitását/toleranciáját abiotikus faktorok, mint a pH, sótartalom, oldott szerves széntartalom és biotikus faktorok, mint a megkötés módja, az organizmusok mérete, kora és a sejten belül lejátszódó detoxifikációs mechanizmusok egyaránt befolyásolják (Borowitzka et al, 2016; Levy et al., 2007). Ezeket a szempontokat a megfelelő szorbens kiválasztásához érdemes figyelembe venni.

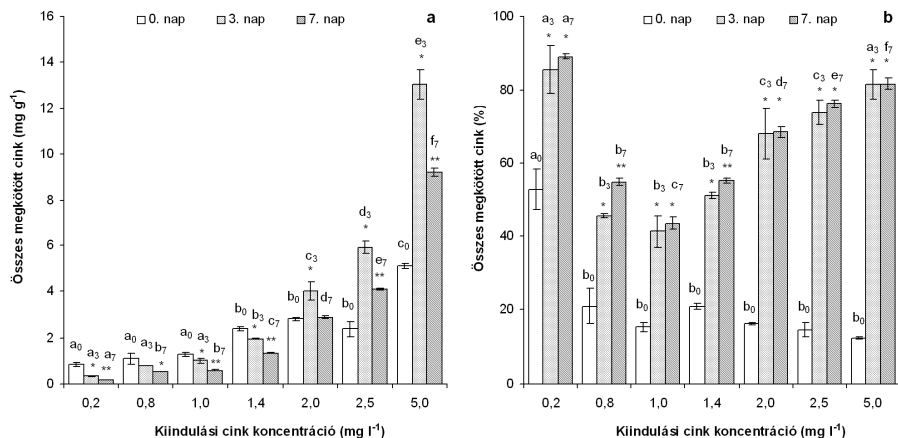
4.3.2. A *M. pusillum* és *D. communis* tenyészetek cink- és réz-eltávolítása

4.3.2.1. A cink-eltávolítás jellemzése

A *M. pusillum* tenyészetek száraz tömegre vonatkoztatott cink eltávolítása a tenyésztés 3. napján az $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ cinkkel kezelt tenyészetben volt a legmagasabb, $\sim 13 \text{ mg g}^{-1}$ (24a. ábra). A $0,2\text{-}1,4 \text{ mg l}^{-1}$ cinkkel kezelt tenyészetek száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink mennyisége a tenyésztés 0. napján volt a legmagasabb, majd a tenyésztés végére lecsökkent, míg a $2,0\text{-}5,0 \text{ mg l}^{-1}$ -es kezelések esetében a tenyésztés 3. napján volt a legmagasabb az eltávolított cink mennyisége. A koncentráció emelésével nőtt az adott napon a száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink mennyisége, bár ez a változás nem volt minden esetben szignifikáns (24a. ábra).

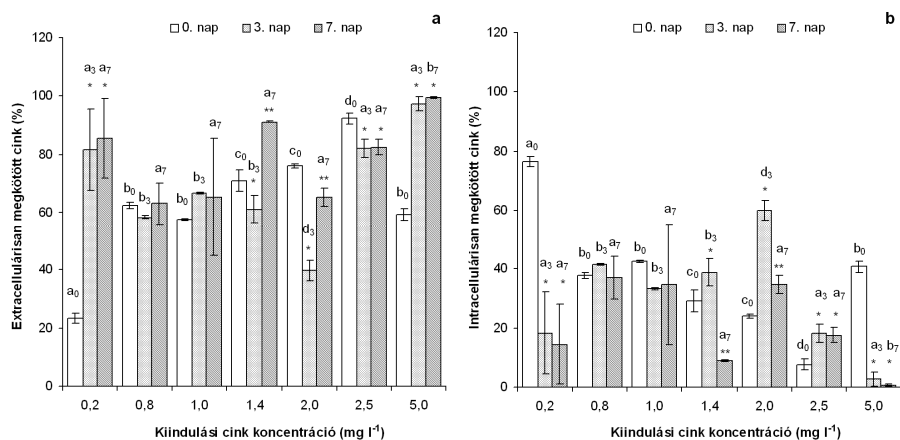
A kísérletek indításakor bemért fémmennyiséget tekintve 100%-nak, a $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ cinkkel kezelt tenyészetben a tenyésztés 7. napján volt a legmagasabb ($\sim 89\%$) az eltávolított cink %-os mennyisége (24b. ábra). Minden kezelt tenyészetben nőtt az eltávolított cink %-os mennyisége az idő előrehaladtával (24b. ábra). Az alkalmazott koncentrációk hatását tekintve nem volt egyértelmű trend az adott napon megkötött

cinkmennyiségekben, 0,2-1,0 mg l⁻¹ között csökkent az adott napon eltávolított cink %-os mennyisége a kiindulási koncentráció növelésével, 1,4-5,0 mg l⁻¹ között pedig nőtt, legalábbis a 3. és 7. napokon.



24. ábra A száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink mennyisége (a) és a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított cink %-os mennyisége (b) a *Monoraphidium pusillum* tenyészetekben. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*, **), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-f) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Az extra- és intracellulárisan megkötött cink mennyiségét az összes eltávolított mennyiség %-ában fejeztük ki. Az extracellulárisan megkötött cink mennyisége az 5,0 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *M. pusillum* tenyészetben, a tenyésztés végén (7. nap) volt a legnagyobb mértékű, a kiindulási cink-mennyiség ~99%-át adszorbeálta a vizsgált tenyészet (25a. ábra). Az intracellulárisan megkötött cink mennyisége a 0,2 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben, a tenyésztés 0. napján volt a legmagasabb, a bemért mennyiség ~76%-át akkumulálta a vizsgált *M. pusillum* tenyészet (25b. ábra).



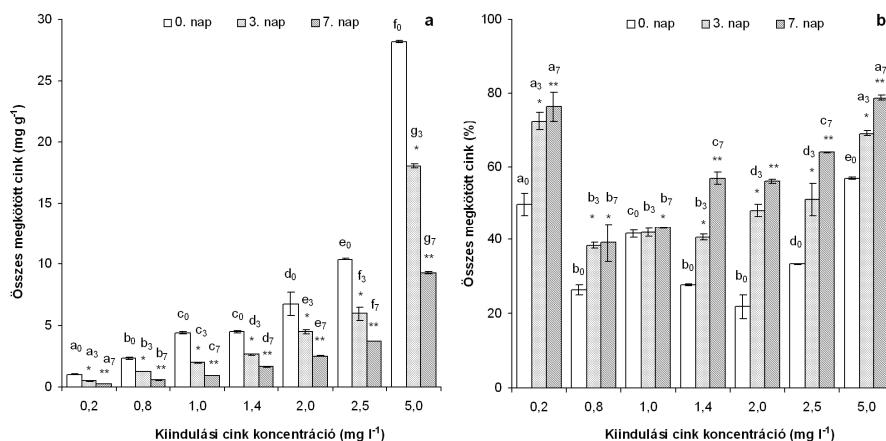
25. ábra A különböző kiindulási cink-mennyiséggel kezelt *M. pusillum* tenyészetek által extracellulárisan (a) és intracellulárisan (b) megkötött cink mennyisége a 0., 3. és 7. napon. Az extra- és intracellulárisan eltávolított mennyiségeket az összes eltávolított mennyiséghez viszonyítva %-ban adtuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*,**), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

A nagyobb koncentrációkhoz viszonyítva (4.1.4. fejezet) egyes esetekben több az intracellulárisan megkötött cink mennyisége, azonban az extra- és intracellulárisan megkötött mennyiségek egymáshoz viszonyított arányában nem fedezhető fel egyértelmű trend sem időben, sem pedig az alkalmazott koncentrációkat tekintve.

A *M. pusillum* tenyészetekhez hasonlóan a *D. communis* tenyészetek esetében a száraz tömegre vonatkoztatott megkötött cink mennyisége az 5,0 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben volt a legmagasabb (~28 mg g⁻¹; 26a. ábra), azonban a *D. communis* tenyészet a 0. napon távolította el a legtöbb cinket, míg a *M. pusillum* tenyészetben a 3. napon figyeltük meg a legmagasabb eltávolítást. A száraz tömegre vonatkoztatott eltávolított cink mennyisége az összes kezelt tenyészetben a 0. napon volt a legmagasabb, majd a 3. és a 7. napra szignifikánsan (P<0,001) csökkent (26a. ábra). Az alkalmazott koncentrációkat tekintve elmondhatjuk, hogy a koncentráció emelkedésével szignifikánsan (P<0,05) nőtt a megkötött cink

menntisége a 0., 3. és a 7. napon is, kivéve a tenyésztés kezdetén (0. nap) az 1,0 és 1,4 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetek esetében (26a. ábra).

A kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított cink %-os menntisége az 5,0 mg l⁻¹ cinkkel kezelt *D. communis* tenyészetben volt a legmagasabb (~79%), mindegyik kezelt tenyészeztől elmondható, hogy az idő előrehaladtával növekedett a megkötött cink menntisége (26b. ábra). A kiindulási koncentrációk és a megkötött cinkmenntiségek között azonban nem találtunk egyértelmű összefüggést: 0,2 mg l⁻¹ esetén volt a legmagasabb minden mintavételi napon, 0,8-5,0 mg l⁻¹ között pedig nőtt a koncentráció növelésével, legalábbis a 3. és 7. napon.

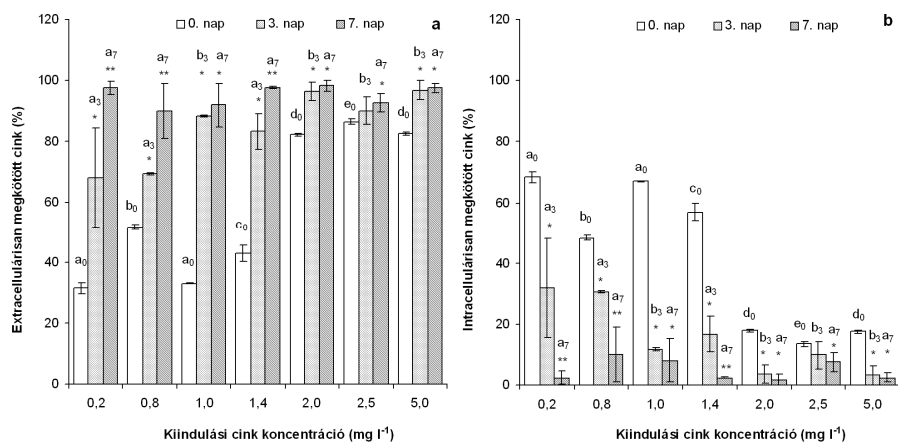


26. ábra A száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított cink menntisége (a) és a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított cink %-os menntisége (b) a *Desmodesmus communis* tenyészetekben. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*,**), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-g) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

A *D. communis* tenyészet esetében az extracellulárisan megkötött cink menntisége a tenyésztés 7. napjára minden kezelés esetében meghaladta a 90%-ot, a legnagyobb mértékű extracelluláris cink-eltávolítás (~98%) a 2,0 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben volt megfigyelhető (27a. ábra). Az intracellulárisan megkötött cink

mennyisége a tenyésztés 0. napján a 0,2 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetben volt a legnagyobb (~68%; 27b. ábra).

A 0,2-1,4 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetekben a tenyésztés kezdetén (0. nap) magasabb volt az intracellulárisan megkötött cinkmennyiség az extracellulárisan megkötött mennyiséghez képest (27a-b. ábra), az extracellulárisan megkötött mennyiség mind az idő előrehaladtával, mind a kiindulási koncentráció emelésével nőtt (értelemszerűen, az intracelluláris mennyiség éppen ellentétesen változott).



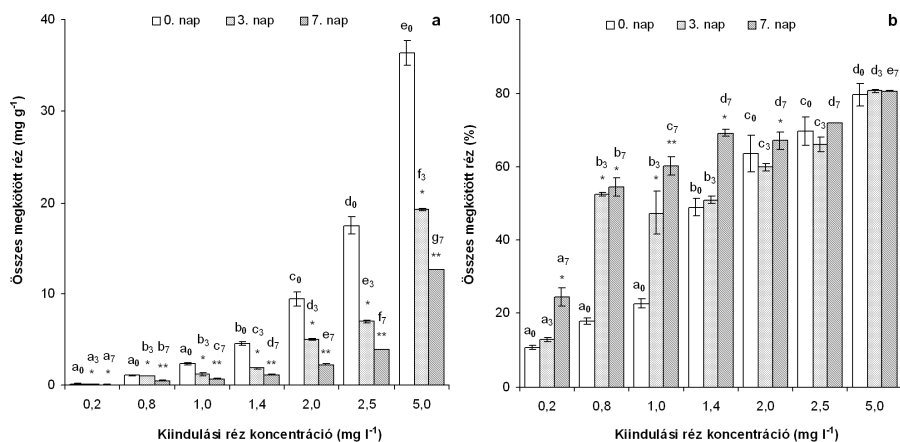
27. ábra A különböző kiindulási cink-mennyiséggel kezelt *D. communis* tenyészetek által extracellulárisan (a) és intracellulárisan (b) megkötött cink mennyisége a 0., 3. és 7. napon. Az extra- és intracellulárisan eltávolított mennyiségeket az összes eltávolított mennyiséghez viszonyítva %-ban adtuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*,**), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

4.3.2.2. A réz-eltávolítás jellemzése

A cink megkötéshez hasonlóan a száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított réz mennyisége az 5,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt *M. pusillum* tenyészetekben volt a legmagasabb (~36 mg g⁻¹), illetve a száraz tömegre vonatkoztatott eltávolított réz mennyisége a 0. napon volt a

legmagasabb és a tenyésztési idő végéig szignifikáns ($P<0,001$) mértékben csökkent. A kiindulási koncentrációk hatását figyelembe véve a koncentráció növekedésével az adott napon megkötött réz mennyisége növekedett, bár ez a növekedés nem minden esetben volt szignifikáns (28a. ábra).

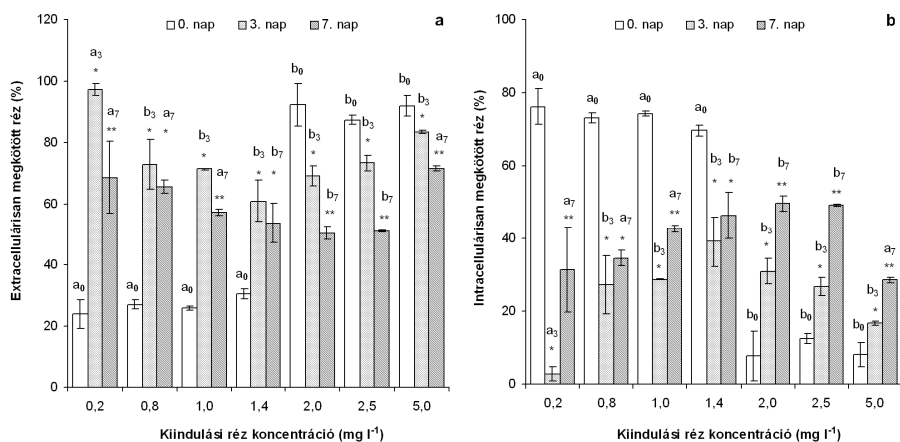
A kísérletek indításakor bemért fémmennyiséget tekintve 100%-nak, az eltávolított réz %-os mennyisége alapján a legnagyobb mértékű réz-eltávolítás (~80-81%) a legnagyobb kiindulási koncentrációval kezelt tenyészetben ($5,0 \text{ mg l}^{-1}$) volt megfigyelhető a tenyésztés 0., 3. és 7. napján egyaránt (28b. ábra). A *M. pusillum* tenyészet esetében nem volt megfigyelhető trend az eltávolított réz mennyiségében az idő előrehaladtával. Az alkalmazott koncentrációk emelésével nőtt az eltávolított réz mennyisége, bár ez a növekedés nem minden esetben volt szignifikáns (28b. ábra).



28. ábra A száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított réz mennyisége (a) és a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított réz %-os mennyisége (b) a *Monoraphidium pusillum* tenyészetekben. Az ábrákon az átlagértékek ($n=3$) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket ($P<0,05$) csillagok (*, **), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket ($P<0,05$) kisbetűk (a-g) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Az extra- és az intracellulárisan eltávolított réz mennyisége a $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ rézzel kezelt tenyészetben volt a legmagasabb, az extracellulárisan

megkötött mennyiség (~97%) a tenyésztés 3., míg az intracellulárisan megkötött mennyiség (~76%) a tenyésztés 0. napján (29a-b. ábra). A 0,2-1,4 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetekben megfigyelhető volt, hogy a tenyésztés 0. napján az intracellulárisan megkötött réz, míg a 3. és 7. napon az extracellulárisan megkötött réz mennyisége volt nagyobb (29a-b. ábra). A 2,0-5,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetek esetében a 0. napon az extracelluláris megkötött réz mennyisége meghaladta a 90%-ot, majd az idő előrehaladtával fokozatosan csökkent, így növekedett az intracellulárisan megkötött réz mennyisége (29a-b. ábra).

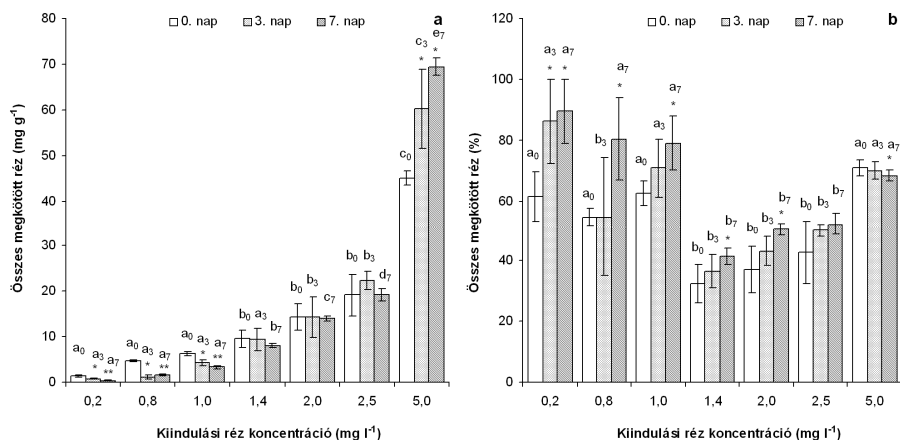


29. ábra A különböző kiindulási réz-mennyiséggel kezelt *M. pusillum* tenyészetek által extracellulárisan (a) és intracellulárisan (b) megkötött réz mennyisége a 0., 3. és 7. napon. Az extra- és intracellulárisan eltávolított mennyiségeket az összes eltávolított mennyiséghez viszonyítva %-ban adtuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*,**), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

A *D. communis* tenyészet a tenyésztés 7. napján az 5,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetben kötötte meg a legtöbb mennyiségű rezt (69,4 mg g⁻¹; 30a. ábra). Az eltelt idő megkötésre gyakorolt hatását tekintve azt mondhatjuk, hogy 0,2-1,0 mg l⁻¹ között csökkent, 1,4-2,5 mg l⁻¹ között nem változott, míg 5,0 mg l⁻¹ koncentrációnál növekedett az eltávolított réz mennyisége az idő előrehaladtával, ez a változás azonban

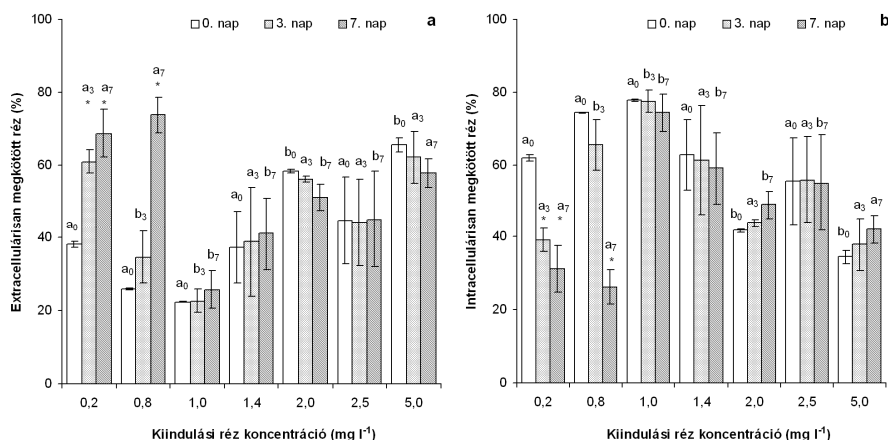
nem minden esetben volt szignifikáns. A kiindulási réz koncentráció emelésével nőtt az adott napon eltávolított réz mennyisége, szintén nem minden esetben szignifikáns mértékben (30a. ábra).

A kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve, az eltávolított réz %-os mennyisége a tenyésztés 7. napján a 0,2 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetben volt a legmagasabb (~89%; 30b. ábra). Az eltávolított réz %-os mennyisége az idő előrehaladtával az esetek többségében növekedett, kivéve az 5,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetet, amely esetében kis mértékben csökkent az eltávolított réz mennyisége (30b. ábra). Adott napon a kiindulási koncentrációk hatását tekintve nem állapítható meg egyértelmű trend a megkötött réz %-os mennyiségében, 0,2-1,0 mg l⁻¹ rézmennyiségnél nem volt különbség az adott napon eltávolított mennyiségben, nagyobb koncentrációknál a kiindulási koncentrációk növelésével nőtt a megkötött réz %-os mennyisége (30b. ábra).



30. ábra A száraz tömegre vonatkoztatott összes eltávolított réz mennyisége (a) és a kiindulási koncentrációkat 100%-nak tekintve az eltávolított réz %-os mennyisége (b) a *Desmodesmus communis* tenyészetekben. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*, **), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-e) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

Az extracellulárisan megkötött réz mennyisége a 0,2 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetben a tenyésztés 7. napján volt a legmagasabb (~74%), míg az intracellulárisan megkötött réz mennyisége (~78%) az 1,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetben a tenyésztés 0. napján (31a-b. ábra). A 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetekben az intracelluláris megkötés mértéke a 0. napon magasabb volt az extracelluláris megkötésnél, majd a tenyésztés 3. és 7. napjára az extracelluláris megkötés vált meghatározóvá (31a-b. ábra). Az 1,0-5,0 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetekben az idő előrehaladtával nem változott a rézmennyiség extra- és intracellulárisan megkötött aránya. Adott napokon az alkalmazott kiindulási koncentrációkat tekintve nem volt megfigyelhető trend a megkötött réz mennyiségében. (31a-b. ábra).



31. ábra A különböző kiindulási réz-mennyiséggel kezelt *D. communis* tenyészetek által extracellulárisan (a) és intracellulárisan (b) megkötött réz mennyisége a 0., 3. és 7. napon. Az extra- és intracellulárisan eltávolított mennyiségeket az összes eltávolított mennyiséghez viszonyítva %-ban adtuk meg. Az ábrákon az átlagértékek (n=3) és az átlagtól való eltérés van feltüntetve. Az adott koncentrációval való kezelés 0.; 3. és 7. napja közötti szignifikáns különbségeket (P<0,05) csillagok (*,**), a különböző koncentrációk között adott napon tapasztalható szignifikáns különbségeket (P<0,05) kisbetűk (a-d) jelölik (alsó indexben az adott nappal: 0; 3; 7).

A két faj cink-, illetve réz-eltávolítási sajátosságait foglalja össze a Melléklet 1. és 2. táblázata. Noha nehéz általános érvényű következtetéseket levonni, a két táblázat alapján mégis elmondható,

hogy a két faj cink megkötési sajátosságai hasonlóak: a cink kis koncentrációban (50%-os növekedésgátlást okozó koncentráció alatt) is főként extracellulárisan kötődik meg. Az egységnyi száraz tömegre vonatkoztatott időbeni csökkenés oka az lehet, hogy nagyobb mennyiségű sejt, azaz nagyobb felület állt rendelkezésre a megkötéshez. Általánosságban mindkét faj esetén nő az eltávolított mennyiség a koncentráció növelésével. Mindkét faj esetén kijelenthető, hogy a cink eltávolítása egy kezdeti gyors szakasszal jellemezhető, amely esetén kisebb koncentrációban (0,2-1,4 mg l⁻¹) az intracelluláris felhalmozás felülmúlhatja az extracelluláris adszorpciót.

Réz esetében a legfeltűnőbb különbség, hogy a *D. communis* réz-eltávolítása megváltozik 1,0-1,4 mg l⁻¹ kezelésnél. Ennek oka, hogy ez a koncentráció tartomány már igen jelentős (50% fölötti) növekedésgátlást eredményez (ld. 4.3.1. fejezet), így ezekben az esetekben, illetve a nagyobb réz koncentrációknál már nem lehet egyértelműen élő tenyészet réz-eltávolításáról beszélni, elsősorban már a holt biomasszát jellemző folyamatok lehetnek uralkodóak. Ez áll annak háttérében is, hogy a *M. pusillum* esetén a cink és a réz eltávolítás dinamikája hasonlóbb tendenciákat mutat, mint a *D. communis* esetében.

A háromszempontos (alga, fém és koncentráció) hatását vizsgáló varianciaanalízis eredményei azt mutatták, hogy az esetek többségében az algafaj, a fém minősége, illetve a koncentráció is szignifikáns hatással van az eltávolítás mértékére, ez alól az alább felsorolt esetek képeznek kivételt:

- 0. nap:

- 0,2 és 0,8 mg l⁻¹ koncentrációk mellett nem befolyásolja szignifikánsan az eltávolítás mértékét sem az algafaj, sem a fém minősége.
- 1,0 és 1,4 mg l⁻¹ réz esetén nincs szignifikáns különbség a *M. pusillum* és a *D. communis* eltávolításának mértékében.
- a fém minősége 1,4 mg l⁻¹ koncentrációban nem befolyásolja az eltávolítás mértékét a *D. communis* esetén.
- 2,5 mg l⁻¹ cink esetén nincs szignifikáns különbség a *M. pusillum* és a *D. communis* eltávolításának mértékében.
- a fém minősége 2,5 mg l⁻¹ koncentrációban nem befolyásolja az eltávolítás mértékét a *M. pusillum* esetén.

- 3. nap:

- a 0,2 és 5,0 mg l⁻¹ koncentrációk mellett nem befolyásolja szignifikánsan az eltávolítás mértékét sem az algafaj, sem a fém minősége.
- 0,8 mg l⁻¹ cink esetén nincs szignifikáns különbség a *M. pusillum* és a *D. communis* eltávolításának mértékében.
- a fém minősége 0,8-1,4 mg l⁻¹ koncentrációban nem befolyásolja az eltávolítás mértékét a *M. pusillum* esetén.
- 2,0 mg l⁻¹ réz, illetve 2,5 mg l⁻¹ cink esetén nincs szignifikáns különbség a *M. pusillum* és a *D. communis* eltávolításának mértékében.
- a fém minősége 2,5 mg l⁻¹ koncentrációban nem befolyásolja az eltávolítás mértékét a *M. pusillum* esetén.

- 7. nap:

- a 0,2; 2,5 és 5,0 mg l⁻¹ koncentrációk mellett nem befolyásolja szignifikánsan az eltávolítás mértékét sem az algafaj, sem a fém minősége.
- 0,8 mg l⁻¹ réz esetén nincs szignifikáns különbség a *M. pusillum* és a *D. communis* eltávolításának mértékében.
- a fém minősége 0,8-1,4 mg l⁻¹ koncentrációban nem befolyásolja az eltávolítás mértékét a *M. pusillum* esetén.
- 2,0 mg l⁻¹ réz esetén nincs szignifikáns különbség a *M. pusillum* és a *D. communis* eltávolításának mértékében.
- 2,5 és 5,0 mg l⁻¹ koncentrációban sem a fém minősége, sem az algafaj nem befolyásolja szignifikánsan az eltávolítás mértékét.

A nehézfémek felvételi mechanizmusa összetett folyamat, elsősorban a fémek kémiai tulajdonságai, a mikroorganizmusok sejtfalának kémiai összetétele, az organizmus fiziológiája és fizikokémiai faktorok (pH, hőmérséklet, ionerősség stb.) befolyásolják (Damodaran et al., 2013). Ezen felül több tanulmány bizonyította, hogy a nehézfémekkel szennyezett területekről származó, nehézfémek jelenlétéhez adaptálódott fajok jelentősebb mennyiségű fém eltávolítására képesek, mint a nem szennyezett területekről izolált taxonok (Richmond és Hu, 2013). Ugyanakkor, ahogyan az eredményeink alapján látható, ugyanazon víztérből izolált különböző fajok is jellemezhetők lehetnek különböző toleranciával és fémeltávolító

képességgel. Az organizmusok bioakkumulációs képességét az adott szervezet metabolizmusa, genotípusa, adaptációs képessége, a biomassza mennyisége, a sejteket körülvevő közeg (esetünkben tápoldat), pH és hőmérséklet viszonyai, a nehézfém koncentrációja és az oldatban jelen levő más ionok mennyisége és minősége határozza meg (Mehta és Gaur, 2005). Eredményeink szerint az összetett rendszerekből (mint amilyen a kísérleteink során alkalmazott tápoldat) való fémeltávolítást nehéz általános módon jellemezni. Mégis azt mondhatjuk, hogy az eredmények alapján a *M. pusillum* nagyobb mennyiségben halmozza fel intracellulárisan a cinket, mint a *D. communis*, míg a rézzel kapcsolatban épp fordított a helyzet. A jelenség hátterében álló fiziológiai különbségek felderítése további vizsgálatokat igényel, mely meghaladja e dolgozat kereteit.

A mikroalgák, cianobaktériumok esetében néhány kivételtől (*Spirulina* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella vulgaris*) eltekintve az extracelluláris adszorpció a meghatározó fémfelvételi mechanizmus. Azok a fajok, amelyek nagyobb mennyiségű intracelluláris fémfelvételre képesek, fejlett detoxifikációs mechanizmussal (fitokelatin, metallothionein fehérjék szintézise) rendelkeznek (Chekroun és Baghour, 2013). A 0,2-5,0 mg l⁻¹ cinkkel, illetve rézzel való kezelés azt mutatta, hogy a fentebb felsorolt kivételek mellett a fémeltávolítás módját és mértékét a fém minősége, koncentrációja és az algafaj is szignifikáns mértékben befolyásolja. Kísérleteink során mindkét fém főként extracellulárisan kötődött meg, de 0,2-1,4 mg l⁻¹ koncentrációban az intracelluláris felhalmozás felülmúlhatja az extracelluláris adszorpciót. A réz a teljes vizsgált tartományban jelentősebb mennyiségben került intracelluláris felhalmozásra, mint a cink, bár a két alga között mutatkoztak különbségek, ahogyan azt fentebb tárgyaltuk. Összességében tehát a fém minősége és koncentrációja meghatározó az eltávolítás módját illetően. Alapvetően a befogadóba engedhető tisztított szennyvizekre vonatkozó felső határértéket meghaladó koncentrációk mellett (max. 10 mg l⁻¹ cink és 4 mg l⁻¹ réz; 28/2004. (XII. 25.) KvVM rendelet, 2. és 5. mellékletek) mindkét vizsgált faj extracelluláris fémeltávolítása a jelentősebb. A tanulmányozott zöldalgák közül a *M. pusillum* mindkét fém tekintetében jobb eltávolítási mutatókkal jellemezhető, mint a *D. communis*.

4.4. Új tudományos eredmények

Munkánk során viszonylag nagyobb (5-40 mg l⁻¹) cink koncentráció mellett vizsgáltuk a cink hatásait három zöldalga faj növekedésére, morfológiájára, tanulmányoztuk a fém által kiváltott oxidatív stressz mértékét, illetve az eltávolított fém mennyiségét és az eltávolítás módját. A munka ezen része során született új tudományos eredmények a következők:

- Meghatároztuk az akut toxicitás jellemzésére használt EC₅₀ értékeket cinkre a sejtszám, valamint a klorofill mennyisége alapján a *Monoraphidium pusillum* és a *Monoraphidium griffithii* zöldalga fajokra vonatkozóan.
- Ugyancsak az EC₅₀ érték alapján az irodalmi adatokkal összevetve megállapítottuk, hogy ugyanazon faj (*Desmodesmus communis*) eltérő izolátumai eltérő toleranciával rendelkezhetnek. A három fajt összevetve megállapítottuk, hogy ugyanazon víztérből izolált fajok eltérő érzékenységet mutathatnak.
- Tudomásunk szerint ezek az első adatok a *M. pusillum* és *M. griffithii* zöldalga fajok cink megkötésével kapcsolatban. Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a vizsgált *Monoraphidium* fajok cink-eltávolító képessége alkalmassá teszi őket 20-30 mg l⁻¹ cink koncentrációjú vizek kezelésére, míg a *D. communis* érzékenyebbnek mutatkozott a cink jelenlétére, mint a vizsgált *Monoraphidium* fajok, azonban 15 mg l⁻¹ cink-koncentrációig hatékony cink-eltávolítással volt jellemezhető, kisebb cink-koncentrációkkal szennyezett vizek esetében jelentősnek tekinthető fémeltávolító kapacitással rendelkezik.
- A holt *D. communis* biomassa cink-kötése is jelentősnek mondható, mivel az összes bemért cinkmennyiség ~50%-át eltávolította, azonban ugyan annyi száraz tömegnek megfelelő mennyiségű élő sejt több mint 30%-kal nagyobb mennyiségű fémot kötött meg, ami arra utal, hogy az élő sejtben, illetve az élő

sejtek felszínén lejátszódó folyamatoknak nagy jelentősége van a cink megkötésében.

Kisebb fém koncentrációk ($0,2-5,0 \text{ mg l}^{-1}$) mellett a *M. pusillum* és a *D. communis* esetén azt is tanulmányoztuk, hogy a fém minősége, a koncentráció, illetve az algafaj hogyan befolyásolja a megkötés mértékét és módját. A munka ezen része kapcsán az alábbi eredményeket emeljük ki:

- Az akut toxicitásra vonatkozó adatok (EC_{50} értékek) alapján elmondható, hogy a *Monoraphidium pusillum* és a *Desmodesmus communis* fajok a cinkhez képest érzékenyebbek a réz jelenlétére, illetve, hogy az ugyanabból a víztérből izolált *D. communis* lényegesen érzékenyebb a rézre, mint a *M. pusillum*, azaz ugyanazon víztérből izolált fajok eltérő érzékenységet mutathatnak.
- Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a vizsgált fajok egységnyi száraz tömegre vonatkoztatva rézből nagyobb mennyiséget távolítottak el, mint cinkből (5 mg l^{-1} oldatból). Kisebb koncentrációknál egyes esetekben az intracelluláris felhalmozás felülmúlhatja az extracelluláris adszorpciót, azonban főként az extracelluláris megkötődés a meghatározó folyamat.

Eredményeinket azonban egyik fajra nézve sem tekinthetjük általános érvényűnek, mivel adott taxon toleranciáját, ellenállóképességét elsősorban a genetikai adaptáció és az őt körülvevő környezet fizikai és kémiai tulajdonságai határozzák meg. Eredményeink a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen) fenntartott *Monoraphidium pusillum* ACCDH-UD0911, *Monoraphidium griffithii* ACCDH-UD1008 és *Desmodesmus communis* ACCDH-UD1004 zöldalga fajokra érvényesek, ezen fajok más izolátumai más cink- és réz-toleranciával, illetve eltávolító képességgel lehetnek jellemezhetők.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a környezetszennyezés globális méreteket ölt, az antropogén tevékenységek következtében jelentősen megnövekedett a környezetünket terhelő nehézfémek mennyisége. A nehézfémeket biológiai szempontból nem bontható szennyezők közé soroljuk, bioakkumulációjuk és/vagy biomagnifikációjuk komoly környezeti károkat okozhat a vízi és vizes ökológiai rendszerekben. A nehézfémek eltávolítását hagyományosan fizikai, kémiai és fizikai-kémiai módszereken alapuló eljárásokkal végzik. A napjainkban egyre inkább a figyelem középpontjába kerülő biológiai módszerek gazdaságos és környezetbarát technológiát biztosítanak a nehézfémek eltávolításához. Az eltávolítást elsősorban mikroorganizmusokkal (baktériumok, gombák, algák) és anyagcseretermékeikkel végzik. A mikroorganizmusok közül az eukarióta zöldalgák jól alkalmazhatók fémszennyezők vizes oldatból történő eltávolítására, mivel több képviselőjük is igen jó adaptív képességgel és fémmegkötő kapacitással jellemezhető.

Dolgozatomban hazai felszíni vizeinkben széles körben elterjedt, könnyen izolálható és olcsón fenntartható zöldalga taxonok nehézfém bioszorpció és/vagy bioakkumulációs sajátosságait jellemeztem. Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen) fenntartott *Monoraphidium pusillum* (Printz) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD0911), *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD1008) és *Desmodesmus communis* (E.Hegewald) E.Hegewald (ACCDH-UD1004) zöldalga fajokkal végeztük. Kísérleteink során az élő szervezetek számára esszenciális, azonban nagyobb koncentrációkban toxikussá váló nehézfémek (cink, réz) hatásait vizsgáltuk, amelyek gyakran előforduló szennyezőanyagok felszíni vizekben és a hazai kommunális, ipari és mezőgazdasági szennyvizek állandó összetevői.

Kísérleteink során egy nagyobb (5-40 mg l⁻¹) koncentráció tartományban két *Monoraphidium* faj és a *Desmodesmus communis* esetében vizsgáltuk a nehézfémek növekedésre (sejt/cönóbiumszám, klorofill-tartalom), morfológiára gyakorolt hatásait, a nehézfémek toxicitását (EC₅₀), az általuk okozott oxidatív stressz (TBARS) mértékét,

az eltávolított fém mennyiségét, valamint azt, hogy az extracelluláris szorpció vagy az intracelluláris akkumuláció játszik nagyobb szerepet a nehézfémek megkötésében. Eredményeink alapján a feltett kérdésekre a következő válaszok adhatók:

A sejtszám- és klorofill-tartalom változásai alapján a két *Monoraphidium* faj közül a *M. griffithii* tenyészetek érzékenyebben reagáltak az alkalmazott cink-kezelésre, mint a *M. pusillum*, azonban azt hozzá kell tenni, hogy a növekedés változásainak nyomon követésére érdemes több paramétert is vizsgálni, mivel így pontosabb képet kaphatunk az okozott hatásokról. Jelen esetben a klorofill-tartalom mindkét faj esetében érzékenyebben reagált a kezelésekre, mint a sejtszám. Az akut toxicitás jellemzésére használt EC₅₀ értékeket meghatároztuk a sejtszám és a klorofill mennyisége alapján is, ezek alapján a két vizsgált faj cink-toleránsnak tekinthető, azonban vannak lényegesen nagyobb koncentrációk mellett is életképes taxonok. A *D. communis* zöldalga faj érzékenyebb a nagy cink-koncentrációkra (>15 mg l⁻¹), mint más *Scenedesmus* fajok, valamint a cönóbiumszám és a klorofill-a tartalom alapján is elmondható, hogy a *Monoraphidium* fajokhoz képest érzékenyebben reagált a cinkkel való kezelésekre.

A morfológiai és a lipidperoxidációban bekövetkező változásokat azokban a tenyészetekben követtük nyomon, amelyekben a hozzáadott cink jelentősen befolyásolta a növekedést, de még élő, növekedőképes tenyészetek voltak. Mindkét *Monoraphidium* tenyészetben magasabb volt a deformálódott sejtek aránya a kezelt tenyészetekben, mint a kontroll tenyészetekben, azonban a cink által okozott morfológiai változások a *M. pusillum* tenyészetek esetében markánsabban jelentkeztek. Mindkét tenyészetéről elmondható, hogy fokozott lipidperoxidáció csak a 20, 30 és 40 mg l⁻¹ cinkkel kezelt tenyészetekben volt kimutatható, a *M. griffithii* tenyészetben magasabb volt a lipidperoxidáció mértéke a *M. pusillum* tenyészetéhez képest. A vizsgált morfológiai és stressz-fiziológiai változások nem tekinthetők specifikusnak, és csak nagyobb cink koncentrációk mellett figyelhetők meg, vagyis a vizsgált fajok – viszonylag jó toleranciájuk miatt – nem jó indikátorai a fém- (cink) szennyezésnek. A cink-kezelés hatással volt a *D. communis* morfológiájára, a sejtek a normálistól (2-4-8 sejtes cönóbiumok) eltérő számban jelentek meg a cönóbiumokban, valamint megfigyelhetők voltak a rendellenes sejtosztódásra utaló morfológiai jelek. A cink a *D. communis* morfológiáját szignifikáns mértékben, de

nem specifikus módon változtatja meg, a megfigyelhető deformitások más stressz-faktorok által kiváltott változásokhoz hasonlóak. A *Monoraphidium* fajok esetében bekövetkezett enzimológiai változásokhoz képest a *D. communis* tenyészetekben általánosságban mérsékeltőbb aktivitásnövekedés volt tapasztalható, azonban ez már 2,5, illetve 5 mg l⁻¹ cink jelenlétében bekövetkezett, 10 mg l⁻¹-nél pedig magasabb volt a lipidperoxidáció mértéke, mint a *Monoraphidium* fajokban ugyanezen koncentrációnál, vagyis a *D. communis* nagyobb érzékenysége az oxidatív stressz esetén is megnyilvánult.

A cink eltávolítást is azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, amelyekben a hozzáadott cink mennyisége a növekedést nem gátolta teljes mértékben, azaz élő tenyészeteknek voltak tekinthetők. Tudomásunk szerint ezek az első adatok a *M. pusillum* és *M. griffithii* zöldalga fajok cink megkötésével kapcsolatban. Az irodalmi adatok ismeretében elmondhatjuk, hogy mindkét faj közepes cink-eltávolítási potenciállal jellemezhető. Akár a kiindulási fémmennyiség %-ában, vagy száraz tömegre vonatkoztatva adjuk meg az eltávolított cink mennyiségét, azt mondhatjuk, hogy a vizsgált fajok cink toleranciája és cinkeltávolító képessége alkalmassá teszi őket 20-30 mg l⁻¹ cink koncentrációjú vizek kezelésére. Mindkét tenyészet esetében elmondhatjuk, hogy az extracellulárisan megkötött cink mennyisége minden kezelésben nagyobb volt, mint az intracellulárisan megkötött mennyiség. Az általunk vizsgált zöldalgák közül a *D. communis* tenyészet érzékenyebbnek mutatkozott a cink jelenlétére, mint a vizsgált *Monoraphidium* fajok, azonban 15 mg l⁻¹ cink-koncentrációig hatékony cink-eltávolítással jellemezhető. A *Monoraphidium* tenyészetekhez hasonlóan a *D. communis* tenyészetek esetében is elmondható, hogy az extracellulárisan megkötött cink mennyisége minden kezelésben nagyobb volt.

A holt *D. communis* biomassza cink-kötése is jelentősnek mondható, mivel az összes bemért cinkmennyiség ~50%-a adszorbeálódott, azonban az élő biomasszához képest kevesebb cink megkötésére képes. A bemért száraz tömeg mennyiségének csaknem duplájára emelése mindössze ~1%-os emelkedést eredményezett a megkötött cink mennyiségében. Az ugyanannyi száraz tömegnek megfelelő mennyiségű élő sejtek több mint 30%-kal nagyobb mennyiségű fémet kötöttek meg, ami arra utal, hogy az élő sejtekben,

illetve az élő sejtek felszínén lejátszódó folyamatoknak nagy jelentősége van a cink megkötésében.

Kisebb koncentrációk esetében vizsgáltuk az alkalmazott algafaj, a nehézfémek minősége és mennyisége, valamint az eltávolítás mechanizmusa közötti összefüggéseket, mértük a nehézfémek növekedésre gyakorolt hatásait, toxicitását (EC_{50}), valamint az összes, az extra- és/vagy intracellulárisan eltávolított fém mennyiségét.

A sejt- és cönóbiumszámok alapján elmondható, hogy a cinkhez viszonyítva a rézzel történő kezelésekre mindkét tenyészet érzékenyebben reagált, valamint, hogy a *D. communis* a *M. pusillum*-hoz viszonyítva kevésbé toleráns mindkét vizsgált fém jelenlétére egyaránt. A sejt- és cönóbiumszám változásaihoz hasonlóan a klorofill mennyiségében bekövetkezett változások is alátámasztják, hogy a *D. communis* taxon érzékenyebb mind a cinkkel, mind a rézzel történő kezelésekre, valamint, hogy a réz jelenlétére mindkét faj érzékenyebb.

A két faj cink megkötési sajátosságai hasonlóak: a cink kis koncentrációban (50%-os növekedésgátlást okozó koncentráció alatt) is főként extracellulárisan kötődik meg. Általánosságban elmondható, hogy mindkét faj esetén nő az eltávolított mennyiség a koncentráció növelésével. A cink eltávolítása egy kezdeti gyors szakasszal jellemezhető, amely esetén kisebb koncentrációban ($0,2-1,4 \text{ mg l}^{-1}$) az intracelluláris felhalmozás felülmúlhatja az extracelluláris adszorpciót. A réz esetében általánosságban nagyobb mennyiség kerül intracelluláris felhalmozásra, mint cink esetében. $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ illetve nagyobb réz koncentrációk mellett a *D. communis* esetében nem lehet egyértelműen élő tenyészet réz-eltávolításáról beszélni, elsősorban már a holt biomasszáat jellemző folyamatok lehetnek uralkodóak.

Vizsgálataink komplex rendszerben (teljes tápoldatban) zajlottak, ahol a bonyolult összetétel nehezítheti ugyan a fémeltávolításra vonatkozó adatok értelmezését, a trendek megállapítását, ugyanakkor a valódi ipari szennyvizeket a teljes tápoldatok jobban modellezzik, mint csak a vizsgálni kívánt fémeket, illetve kis koncentrációban nitrogén- és foszforforrást tartalmazó minimál-tápoldatok. Összességében elmondható eredményeink alapján, hogy mindhárom tanulmányozott faj, de különösen a két, korábban ebből a szempontból még nem vizsgált *Monoraphidium* faj alkalmas lehet kis cink ($20-30 \text{ mg l}^{-1}$ -ig), illetve réz ($10-20 \text{ mg l}^{-1}$ -ig) koncentrációk mellett a fémek egyikét fő szennyezőként tartalmazó szennyvizek tehermentesítésére.

6. SUMMARY

Today, environmental pollution is a global problem. Amounts of harmful metals have been significantly increased as a result of anthropogenic activities. Heavy metals are metabolically non-biodegradable pollutants, and their accumulation and/or biomagnification can cause serious damage to aquatic and semi-aquatic ecosystems. Conventionally, physical, chemical and physico-chemical methods have been used for heavy metal removal. Today, biological methods may provide a cost-effective and environmental-friendly alternative to the removal of heavy metals. Microorganisms (bacteria, fungi, algae) and their metabolites are used to eliminate metals. Among microorganisms, eukaryotic green algae are able to remove metal contaminants from aquatic solutions because of they may have high phenotypic plasticity and high sorption or uptake capacity.

In my Thesis I have focused on characteristics of heavy metal biosorption and/or bioaccumulation with green algae taxa, which commonly occur in Hungarian surface waters, can be easily isolable and their cultures are cheaply maintainable. *Monoraphidium pusillum* (Printz) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD0911), *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová (ACCDH-UD1008) and *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald (ACCDH-UD1004) were used to our investigations and were maintained in Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen. Effects of essential metals (copper, zinc) were tested, which can be toxic from certain concentrations and are constant components of Hungarian surface waters and urban, industrial and agricultural wastewaters.

The effects of zinc on growth (cell and coenobia number, chlorophyll a content) and cell morphology, its toxicity (EC_{50}), oxidative stress responses (TBARS), and amounts as well as characteristic (extracellular sorption and/or intracellular accumulation) of bound metal of the biomass of the common phytoplankton species *Monoraphidium* spp. and *D. communis* were investigated from 5 to 40 mg l⁻¹ concentration. Our results have shown:

On the basis of cell number and chlorophyll a content *M. griffithii* was more sensitive to zinc than *M. pusillum*, but it has to be noticed that more parameters should be investigated during the

following of growth changes, because it can provides a better view of caused effects. In this case, chlorophyll a contents responded more sensitively to treatments than cell numbers. EC_{50} values used to characterize acute toxicity have been calculated both on the basis of cell number and chlorophyll a content. According to these data, the studied green algae can be characterized as zinc-tolerant ones, however, there are more tolerant species. *D. communis* was more sensitive to high zinc concentrations ($>15 \text{ mg l}^{-1}$), than other *Scenedesmus* species, and on the basis of coenobia numbers and chlorophyll-a content, it was more sensitive to zinc treatments than *Monoraphidium* species.

The changes of morphology and lipid peroxidation were followed in significantly affected, but considered as living cultures. The numbers of deformed cells were higher in treated *Monoraphidium* cultures than in control culture, the changes were more enhanced in the case of *M. pusillum*. Increasing amount of TBARS referring increased lipid peroxidation were detected in 20, 30 and 40 mg l^{-1} treated cultures, initially added zinc caused significantly higher increase in TBARS levels in *M. griffithii* cultures than in *M. pusillum* cultures. Green algae used in our study can be regarded as not sensitive to zinc from oxidative stress aspects, since amount of TBARS revealing enhanced lipid peroxidation increased only from relatively high zinc concentration. The studied morphological and enzymological changes appeared only at high zinc concentrations, and are not specific, so the studied species are not suitable to indicate metal (zinc) contamination due to their tolerance. Zinc treatment effected on *D. communis* morphology, cells appeared in unusual numbers (differently from 2–4–8 cells per coenobia) and appeared in morphological changes referring to abnormal cell division. Morphological changes of *D. communis* were changed significantly but it seemed not to be highly specific or characteristic to zinc treatment, contaminants affecting cell division other than zinc may cause similar morphological changes. The observed enzymological changes were more moderate in *D. communis* cultures than in *Monoraphidium* cultures, however these moderate changes appeared already at 2.5 and 5 mg l^{-1} zinc concentration, while higher degree of lipid peroxidation were observed at 10 mg l^{-1} zinc concentration, so it seems that *D. communis* was more sensitive than *Monoraphidium* species also from oxidative stress aspects.

Zinc removal was followed in significantly affected, but considered as living cultures. This study provides new data for the zinc tolerance and zinc removal ability of the green algae *M. pusillum* and *M. griffithii*. Comparing the literature data with each other and with our results, it seems that zinc-binding ability of the studied species is in the “medium range”. Whether our result were interpreted in percentage of the initial zinc content or in unit of dry mass, they show that the studied *Monoraphidium* species are able to remove metal from water up to 20-30 mg l⁻¹ zinc concentration, according to their zinc tolerance and removal ability. The results show that the amount of extracellularly removed zinc was higher than intracellular accumulation in treated cultures in the case of both studied strains. Among the studied species, *D. communis* was more sensitive to the presence of zinc than *Monoraphidium* ssp., however it could be able to effectively bind zinc up to 15 mg l⁻¹ zinc concentration. The results show that a larger proportion of removed zinc is bound by adsorption onto the cell surface, similarly to *Monoraphidium* species.

Substantial quantities of zinc could be removed by dried biomass of *D. communis*, since 50% of removed zinc in proportion of initial zinc concentration was removed; however removal ability was higher in the case of living biomass. Approximately twice as much dried biomass could bind only 1% more zinc. The removal ability (percentage of removed zinc in proportion of initial zinc concentration) was 30% higher in the case of the same amount of living biomass, these phenomena suggest that living cell processes have high importance in zinc sequestration.

Connections among the algal species, quality and quantity of metals and characteristic of metal removal mechanism were investigated at lower metal concentrations. The effects of metals on growth (cell and coenobia number, chlorophyll a content), toxicity (EC₅₀), and the amount of total, extracellularly and intracellularly removed metal were studied.

On the basis of cell and coenobia number both studied strains were more sensitive to copper treatment compared to zinc, and *D. communis* was less tolerant to both studied metals than *M. pusillum*. Changes of chlorophyll a content proved that *D. communis* was more sensitive to zinc- and copper treatment, and both cultures responded more sensitively to the presence of copper.

The zinc binding characteristics of the two species were similar: at low concentration (below 50% growth inhibition) zinc was mainly removed extracellularly. The amount of removed zinc increased with increasing concentrations in the case of both species. The zinc removal activity can be characterized with an initial rapid phase, in this case at lower concentration (0.2-1.4 mg l⁻¹) the intracellular accumulation may exceed the extracellular adsorption. Larger quantity of copper was accumulated into cells and coenobia, than in the case of zinc. From 2.0 mg l⁻¹ copper concentration the process of removal can not be clearly discussed as removal of living *D. communis* cultures, primarily the removal processes characteristic to dead biomass could be dominant.

Our investigations were achieved in complex systems (culture media), which composed of many components (they may interact with each other) making it difficult to interpret our data and to understand the trends, at the same time it can modelling better the characteristics of waste waters, than minimal media. It can be concluded that living biomass of the studied strains, especially *Monoraphidium* species can be used successfully in removal up to 20-30 mg l⁻¹ zinc and 10-20 mg l⁻¹ copper concentrations from contaminated water.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Bácsi Istvánnak** a több éves szakmai segítségnyújtásért, tanácsokért és munkám koordinálásáért, valamint feleségének Dr. B-Béres Viktóriának a szakmai segítségért, támogatásért.

Köszönet illeti Kovácsné Gábor Anikó vegyésztechnikust a laboratóriumi mérések során nyújtott segítségéért, valamint szeretnék köszönetet mondani a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszék minden munkatársának.

Továbbá köszönöm a Tiszántúli Környezetvédelmi és Természetvédelmi Felügyelőség, a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, valamint a Debreceni Egyetem Növénytan Tanszék munkatársainak, hogy segítették munkámat és lehetőséget biztosítottak a mérések kivitelezéséhez (Jánószky Mihály, Baranyai Edina, Harangi Sándor, Keresiné Vári Judit, Riba Milán, Barna Erzsébet).

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és a barátaimnak a biztatásukat és támogatásukat.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abd-El-Monem HM, Corradi MG, Gorbi G (2011) Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.* 40: 59–66.
- Adhiya J, Cai X, Sayre RT, Traina SJ (2002) Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii* Coll. Surf. 210(1): 1–11.
- Ahalya N, Ramachandra TV, Kanamadi RD (2003) Biosorption of Heavy Metals. *Res. J. Chem. Environ.* 7(4): 71–79.
- Ahuja P, Gupta R, Saxena RK (1999) Zn²⁺ biosorption by *Oscillatoria angustissima*. *Proc. Biochem.* 34: 77–85.
- Ahuja P, Mohapatra H, Saxena RK, Gupta R (2001) Reduced uptake as a mechanism of zinc tolerance in *Oscillatoria angustissima*. *Curr. Microbiol.* 43: 305–310.
- Akhtar N, Iqbal J, Iqbal M (2004) Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. *J. Hazard. Mater.* 108(1–2): 85–94.
- Akhtar N, Iqbal M, Zafar SI, Iqbal J (2008) Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr(III). *J. Environ. Sci.* 20(2): 231–239.
- Aksu Z (2001) Equilibrium and kinetic modelling of cadmium (II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. *Purif. Technol.* 21(3): 285–294.
- Aksu Z, Acikel Ü, Kutsal T (1997) Application of multicomponent adsorption isotherms to simultaneous biosorption of iron (III) and chromium (VI) on *C. vulgaris*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 70: 368–378.
- Aksu Z, Acikel Ü, Kutsal T (1999) Investigation of Simultaneous Biosorption of Copper (II) and Chromium(VI) on Dried *Chlorella vulgaris* from Binary Metal Mixtures: Application of Multicomponent Adsorption Isotherms. *Sci. Technol.* 34(3): 501–524.
- Aksu Z, Egretli G, Kutsal T (1998) A comparative study of copper (II) biosorption on Ca-alginate, agarose and immobilized *C. vulgaris* in a packed-bed column. *Proc. Biochem.* 33: 393–400.

- Alloway BJ (2013) Heavy Metals in Soils. Springer, New York, NY, USA.
- Álvarez-Díaz PD, Ruiz J, Arbib Z, Barragán J, Garrido-Pérez MC, Perales JA (2015) Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. *Bioresour. Technol.* 181: 90–96.
- Arica MY, Tüzün İ, Yalçın E, İnce Ö, Bayramoğlu G (2005) Utilisation of native, heat and acid-treated microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* preparations for biosorption of Cr(VI) ions. *Process Biochem.* 40(7): 2351–2358
- Atkins PW, Jones L (1999) Chemistry: Molecules, Matter and Change. 4th ed. W. H. Freeman and Company. New York, NY, USA.
- Auld DS (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biomaterials* 14: 271–313.
- Bajguz A (2010) An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress. *Environ. Exp. Bot.* 68(2): 175–179.
- Baker MD, Wong PTS, Chau YK, Mayfield CI, Inniss WE (1983) Methylation of Arsenic by Freshwater Green Algae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40(8): 1254–1257.
- Bayramoğlu G, Tuzun I, Celik G, Yilmaz M, Arica MY (2006) Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *Min. Process.* 81(1): 35–43.
- Bertrand M, Poirier I (2005) Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* 43: 345–353.
- Blaby-Haas CE, Merchant SS (2012) The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823(9): 1531–1552.
- Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (2016) The Physiology of Microalgae. Springer, New York, NY, USA.
- Bradl HB (2005) Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation. Academic Press. London. 6: 1–27.
- Brewer M, Scott TA (1983) Concise Encyclopaedia of Biochemistry. Walter de Gruyter and Co, Berlin, Germany.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A (2007) Zinc in plants. *New Phytol.* 173(4): 677–702.

- Brown RM Jr. (1982) Cellulose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, Structure, and Degradation. Springer, New York, NY, USA.
- Canizares-Villanueva, R.O., Gonzalez-Moreno, S., Dominguez-Bocanegra, A.R. (2001) Growth, nutrient assimilation and cadmium removal by suspended and immobilized *Scenedesmus acutus* cultures: influence of immobilization matrix. In: Chen, F., Jiang, Y. (Eds.), Algae and their Biotechnological Potential. Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 147–161.
- Carfagna S, Lanza N, Salbitani G, Basile A, Sorbo S, Vona V (2013) Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). Springerplus 2(1): 147.
- Çelekli A, Gültekin E, Bozkurt H (2015) Morphological and Biochemical Responses of *Spirogyra setiformis* Exposed to Cadmium. Clean soil air water 44(3): 256–262.
- Chakravarty R, Banerjee PC (2008) Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals. Extremophiles 12(2): 279–284.
- Chang WH, Tolbert NE (1970) Excretion of Glycolate, Mesotartarate and Isocitrate Lactone by Synchronized Cultures of *Ankistrodesmus braunii*. Plant Physiol. 46(3): 377-85.
- Chekroun KB, Baghour M (2013) The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. J. Mater. Environ. Sci. 4 (6): 873-880.
- Chojnacka K (2010) Biosorption and bioaccumulation--the prospects for practical applications. Environ Int. 36(3): 299-307.
- Chong AMY, SWong Y, Tam NFY (2000) Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. Chemosphere 41(1–2): 251-257.
- Chopra AK, Pathak C, Prasad G (2009) Scenario of heavy metal contamination in agricultural soil and its management. Journal of Applied and Natural Science 1(1): 99-108.
- Cid A, Herrero C, Torres E, Abalde J (1995) Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. Aquat. Toxicol. 31(2): 165-174.

- Cid VJ, Durán A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sánchez M (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 59(3): 345-86.
- Clarke SE, Stuart J, Sanders-Loehr J (1987) Induction of siderophore activity in *Anabaena* spp and its moderation of copper toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 53: 917-922.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant. Biol. 53: 159-82.
- Crist RH, Oberholser K, Shank N, Nguyen M (1981) Nature of binding between metallic ions and algal cell walls. Environ Sci Technol. 15: 1212-1217.
- Cullen WR, Li H, Hewitt G, Reimer KJ, Zalunardo N (1994) Identification of extracellular arsenical metabolites in the growth medium of the microorganisms *Apiotrichum humicola* and *Scopulariopsis brevicaulis*. Appl. Organomet. Chem. 8:303-311.
- Cullen WR, Li H, Pergantis SA, Eigendorf GK, Harrison LG (1994) The methylation of arsenate by a marine alga *Polyphysa Peniculus* in the presence of L-methionine-methyl-d3. Chemosphere 28(5): 1009-1019.
- da Costa ACA, Leite SGF (1990) Cadmium and Zinc Bioadsorption by *Chorella homosphaera*. Biotechnol. Lett. 12(12): 941-944.
- da Costa ACA, Leite SGF (1991) Metals biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera* cells. Biotechnol. Lett. 13(8): 559-562.
- Damodaran D, Balakrishnan RM, Shetty VK (2013) The uptake mechanism of Cd(II), Cr(VI), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) by mycelia and fruiting bodies of *Galerina vittiformis*. Biomed. Res. Int. 2013:149120. doi: 10.1155/2013/149120.
- De Filippis LF, Hampp R, Ziegler H (1981) The effect of sub-lethal concentration of zinc, cadmium and mercury on *Euglena* II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. Arch. Microbiol. 128: 407-411.
- Dönmez G, Aksu Z (2002) Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. Process Biochem. 38(5): 751-762.

- Dönmez GÇ, Aksu Z, Öztürk A, Kutsal T (1999) A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochem.* 34(9): 885-892.
- Duffus JH (2002) „Heavy metals” – A meaningless term. *Pure Appl. Chem.* 74(5): 793-807.
- El-Naas MH, Al-Rub FA, Ashour I, Al Marzouqi M (2007) Effect of competitive interference on the biosorption of lead(II) by *Chlorella vulgaris*. *Chem. Eng. Process.* 46(12): 1391-1399.
- Falkowski PG, Raven JA (2007) *Aquatic photosynthesis*. 2nd ed. Princeton University Press, Princeton.
- Felföldy L (1987) A biológiai vízminőség (4. kiad.). In: *Vízügyi Hidrobiológia* 16. VGI, Budapest, Magyarország.
- Fraile A, Penche S, González F, Blázquez ML, Muñoz JA, Ballester A (2005) Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chem. Ecol.* 21(1): 61-75.
- Freedman B (1995) *Environmental Ecology*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Friedland AJ (1989) The movement of metals through soils and ecosystems. In: Shaw AJ (ed.) *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Fukami M (1988) Effects of zinc on metal metabolism on the zinc tolerant chlorotic mutants of *Euglena gracilis*. *J. Agric. Biol. Chem.* 52: 2343–2344.
- Gadd GM (1988) Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: Rehm HJ (ed.) *Biotechnology – A Comprehensive Treatise*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Gadd GM, White C (1993) Microbial treatment of metal pollution — a working biotechnology?. *Trends in Biotechnology* 11(8): 353-359.
- Gold C, Feurtet-Mazel A, Coste M, Boudou A (2003) Impacts of Cd and Zn on the Development of Periphytic Diatom Communities in Artificial Streams Located Along a River Pollution Gradient. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 189-197.
- Gonzalez-Davila M, Santana-Casiano JM, Perez-Pena J, Millero FJ (1995) Binding of Cu(II) to the Surface and Exudates of the Alga *Dunaliella tertiolecta* in Seawater. *Environ. Sci. Technol.* 29(2): 289–301.

- Granchinho SCR, Polishchuk E, Cullen WR, Reimer KJ (2001) Biomethylation and bioaccumulation of arsenic(V) by marine alga *Fucus gardneri*. Appl. Organomet. Chem. 15(6): 553-560.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct. Plant Biol. 32: 481-494.
- Güclü Z (2012) Toxicity of copper on *Desmodesmus subspicatus* growth. Fresen. Environ. Bull. 21 (6B): 1703-1707.
- Güclü Z, Ertan ÖO (2012) Toxicity and removal of zinc in the three species (*Acutodesmus obliquus*, *Desmodesmus subspicatus* and *Desmodesmus armatus*) Belonging to the Family, Scenedesmaceae (Chlorophyta). Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 12:309-314.
- Guiry MD, Guiry GM (2014) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219(1): 1-14.
- Hamelink J, Landrum PF, Bergman H, Benson WH (1994) Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Hammer DA (1989) Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Municipal, Industrial and Agricultural. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4: 9.
- Han X, Gong YF, Wong YS, Tam NF (2014) Cr(III) removal by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*: effects of nitrate, chloride and sulfate. Ecotoxicology 23(4): 742-8.
- He J, Chen JP (2014) A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. Bioresour. Technol. 160: 67-78.
- Hodgson E, Mailman RB, Chambers JE (1988) Macmillan Dictionary of Toxicology. Macmillan, London.
- Holdren JP (1990) Nem vész el, csak átalakul?. Tudomány 6 (11): 114-122.

- Jardim WF, Pearson HW (1984) A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria. *Wat. Res.* 18: 985-989.
- Kaiser MJ, Attrill MJ, Jennings S, Thomas DN, Barnes DKA, Brierley AS, Hiddink JG, Kaartokallio H, Polunin NVC, Raffaelli DG (2011) *Marine Ecology: Processes, Systems, and Impacts*. Oxford University Press. Oxford, England, U.K.
- Kipigroch K, Janosz-Rajczyk M, Skowron-Grabowska B (2015) The use of algae in the removal of Cd and Cu in the process of wastewater recovery. *Desalin. Water Treat.* 57(3): 1508-1514.
- Kiss KT, Uherkovich G, Schmidt A, Ács É (1995) A *Scenedesmus* zöldség nemzetség (Chlorococcales, Chlorophyceae) különös tekintettel magyarországi előfordulású taxonjaira. Magyar Algológiai Társaság, Budapest.
- Klug A (1999) Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J. Mol. Biol.* 293: 215–218.
- Kotrba P, Mackova M, Urbánek V (2011) *Microbial Biosorption of Metals*. Springer, New York, NY, USA.
- Krienitz L, Bock C (2012) Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia* 698(1): 295–326.
- Kültz D (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 225-57.
- Kumara M, Harish SR (2007) Antioxidant modulation in response to heavy metal induced oxidative stress in *Cladophora glomerata*. *Indian journal of experimental biology* 45(11):980-3.
- Labyntseva R, Ulianenki T, Kosterin S (1998) Effect of heavy metal ion on super precipitation and ATPase activity of uterine smooth muscle actomyosin activity. *Ukr. Biokhim. Zh.* 70: 271–277.
- Lau PS, Lee HY, Tsang CCK, Tam NFY, Wong YS (1999) Effect of metal interference, pH and temperature on Cu and Ni biosorption by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella miniata*. *Environ. Technol.* 20: 953–961.
- Leeper G W (1978) *Managing the heavy metals on land (Pollution engineering & technology)*. Marcel Dekker Inc. New York, NY, USA.

- Lei A, Hu Z, Wong Y, Tam NF (2005) Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. *Journal of Applied Phycology* 18: 67–78.
- Levy JL, Stauber JL, Adams MS, Maher WA, Kirby JK, Jolley DF (2005) Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24(10):2630-9.
- Levy JL, Stauber JL, Jolley DF (2007) Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total Environ.* 387: 141–154.
- Li M, Hu C, Zhu Q, Chen L, Kong Z, Liu Z (2006) Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere* 62: 565–572.
- Liu XM, Kim KE, Kim KC, Nguyena XC, Han HJ, Jung MS, Kim HS, Kim SH, Park HC, Yun DJ, Chung WS (2010) Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71(5–6): 614–618.
- Lodeiro P, Herrero R, Sastre de Vicente ME (2006) The use of protonated *Sargassum muticum* as biosorbent for cadmium removal in a fixed-bed column. *J. Hazard. Mater.* 137(1): 244-253.
- Lüring M, Van Donk E (1997) Morphological changes in *Scenedesmus* induced by infochemicals released in situ from zooplankton grazers. *Limnol. Oceanogr.* 42(4): 783-788
- Lütz-Meindl U, Luckner M, Andosch A, Wanner G (2016) Structural stress responses and degradation of dictyosomes in algae analysed by TEM and FIB-SEM tomography. *J. Microsc.* 263(2): 129-41.
- Magdaleno A, Vélez CG, Wenzel MT, Tell G (2014) Effects of Cadmium, Copper and Zinc on Growth of Four Isolated Algae from a Highly Polluted Argentina River. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92:202–207.
- Mane PC, Bhosle AB, Kulkarni PA (2011) Biosorption and biochemical study on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) with reference to selenium. *Arch. Appl. Sci. Res.* 3: 222–229.
- Maret W (2005) Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19: 7–12.

- Markus JT, Martinoia E (2006) Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification from Microbes to Man. Springer, Berlin, Germany.
- Mehta SK, Gaur JP (1999) Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. New Phytol. 143(2): 253–259.
- Mehta SK, Gaur JP (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 25(3): 113–52.
- Mehta SK, Gaur JP (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 25(3): 113–52.
- Mehta SK, Tripathi BN, Gaur JP (2002) Enhanced sorption of Cu^{2+} and Ni^{2+} by acid-pretreated *Chlorella vulgaris* from single and binary metal solutions. J. Appl. Phycol. 14(4): 267–273.
- Meij R, te Winkel H (2007) The emissions of heavy metals and persistent organic pollutants from modern coal-fired power stations. Atmos. Environ. 41(40): 9262–9272.
- Men B, He Y, Yang X, Meng J, Liu F, Wang D (2016) Bioturbation effects on heavy metals fluxes from sediment treated with activated carbon. Environ. Sci. Pollut. Res. 23(9): 9114–9121.
- Monteiro CM, Castro PML, Malcata FX (2011a) Capacity of simultaneous removal of zinc and cadmium from contaminated media, by two microalgae isolated from a polluted site. Environ. Chem. Lett. 9: 511–517.
- Monteiro CM, Castro PML, Malcata FX (2011b) Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Environ. Chem. Lett. 9:169–176.
- Monteiro CM, Marques APGC, Castro PML, Malcata FX (2010) Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. Water, Air and Soil Pollution 208: 17–27.
- Monteiro CM, Marques AP, Castro PM, Malcata FX (2009) Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. Biodegradation 20(5): 629–41.

- Morelli E, Scarano G (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Sci. 167(2): 289–296.
- Morin S, Coste M (2006) Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from Riou Mort and Riou Vioi streams (South West France). Arch. Hydrobiol. Suppl. 97-101.
- Murugan K, Harish SR (2007) Antioxidant modulation in response to heavy metal induced oxidative stress in *Cladophora glomerata*. Indian J. Exp. Biol. 45(11): 980-3.
- Naja GM, Volesky B (2009) Treatment of Metal-Bearing Effluents: Removal and Recovery. In: Wang LK, Chen JP, Hung YT, Shammas NK (editors): Handbook on Heavy Metals in the Environment. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Naja GM, Volesky B, Murphy V (2010) Biosorption, metals. In: Flickinger MC (ed.) Encyclopedia of Industrial Biotechnology. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, USA.
- Neumüller AO (1983) Römpf Vegyészeti Lexikon. Műszaki Könyvkiadó, Budapest.
- Nguyen-Deroche TLN, Caruso A, Le TT, Bui TV, Schoefs B, Tremblin G, Morant-Manceau A (2012) Zinc Affects Differently Growth, Photosynthesis, Antioxidant Enzyme Activities and Phytochelatin Synthase Expression of Four Marine Diatoms. Scientific World Journal 2012: 982957.
- Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. 1(B): 3-26.
- Nishikawa K, Tominaga N (2001) Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 2650–2656.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature 333(6169): 134-9.
- Omar HH (2002a) Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. Int Biodeter. Biodegr. 50: 95–100.
- Omar HH (2002b) Adsorption of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *S. quadricauda* and its effect on growth and metabolism. Biol. Plant. 45(2): 261–266.

- Papp S (2011) Környezeti kémia. Környezetmérnöki Tudástár 9. kötet, 3. javított kiadás. Pannon Egyetem–Környezetmérnöki Intézet, Veszprém.
- Papp S. (2010) Biogeokémiai körfolyamatok és antropogén módosításuk. Magyar Tudomány 171(3): 298-308.
- Pawlik-Skowrońska B (2003) Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. coming from habitats of different heavy metal concentrations. Aquatic Botany 75(3): 189–198.
- Pearson RG (1963) Hard and Soft Acids and Bases. J. Am. Chem. Soc. 85(22): 3533–3539.
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Cañizares-Villanueva RO (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 64(1): 1-10.
- Perei K, Pernyeszi T, Lakatos Gy (2012) Bioremediáció. Digitális Tankönyvtár.
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. Curr. Opin. Plant Biol. 9(3): 256–263.
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leita MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) HEAVY METAL–INDUCED OXIDATIVE STRESS IN ALGAE. J. Phycol. 39: 1008-1018.
- Pradhan S, Sing S, Rai LC, Parker DL (1998) Evaluation of metal biosorption efficiency of laboratory-grown *Microcystis* under various environmental conditions. J. Microbiol. Biotechnol. 8:53–60.
- Prasad MNV (2001) Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Prasanna R, Jaiswal P, Kaushik BD (2008) Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability — promises and challenges. Indian J. Microbiol. 48(1): 89–94.
- Prasad D, Prasad A (1987) Altered δ -aminolaevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajra (*Pennisetum typhoideum*). Journal of Plant Physiology 127: 241–249.
- Rai L, Sing A, Mallick N (1991) Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavymetal stress. Journal of Plant Physiology 137: 419–424.

- Rathoure AK, Dhatwalia VK (2015) Toxicity and Waste Management Using Bioremediation. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, USA.
- Remacle J. (1990) The cell wall and metal binding. In: Volesky B (ed) Biosorption of heavy metals. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Richmond A, Hu Q (2013) Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology (2nd ed). John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, USA.
- Robson AD (1993) Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on 'Zinc in Soils and Plants' Held at The University of Western Australia, 27-28 September, 1993.
- Romera E, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA (2006) Biosorption with algae: a statistical review. Crit. Rev. Biotechnol. 26(4):223–235.
- Romera E, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA (2007) Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. Bioresour. Technol. (98)17: 3344–3353.
- Rose PD, Maart BA, Dunn KM, Rowsell RA, Britz P (1996) High rate algal oxidation ponding for the treatment of tannery effluents. Water Sci. Technol. 33(7): 219-227.
- Sandau E, Sandau P, Pulz O (1996) Heavy metal sorption by microalgae. Eng. Life Sci. 16(4): 227-235.
- Scanlon JW (1975) Dangers to the human fetus from certain heavy metals in the environment. Rev. Environ. Health 2: 39-64.
- Schaller J (2014) Bioturbation/bioirrigation by *Chironomus plumosus* as main factor controlling elemental remobilization from aquatic sediments?. Chemosphere 107: 336-43.
- Schmidt A, Fehér G (1999) A zöldalgák *Chlorococcales* rendjének kishatározója 2. [A guide for the identification of the *Chlorococcales* taxa occurring in Hungary 2.]. Vízi természet- és környezetvédelem 10. Környezetgazdálkodási Intézet, NeFTI Tájékoztató Szolgálat, Budapest.
- Schmitt D, Müller A, Csögör Z, Frimmel FH, Posten C (2001) The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. Water Res. 35(3): 779-85.
- Scott JS, Smith PG (1981): Dictionary of Waste and Water Treatment. Butterworths, London, UK.

- SenGupta AK (2001) Environmental Separation of Heavy Metals: Engineering Processes. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Shrotri CK, Rathore VS, Mohanty P (1981) Studies on photosynthetic electron transport, photophosphorylation and CO₂ fixation in Zn-deficient leaf cells of *Zea mays*. J. Plant Nutr. 3: 945-954.
- Sugarman B (1983) Zinc and infection. Review of Infectious Diseases 5: 137.
- Szabó Gy (2000) Talajok és növények nehézfém-tartalmának földrajzi vizsgálata egy bükkaljai mintaterületen. Studia Geographica. Egyetemi Kiadó, Debrecen.
- Takami R, Almeida JV, Vardaris CV, Colepicolo P, Barros MP (2012) The interplay between thiol-compounds against chromium (VI) in the freshwater green alga *Monoraphidium convolutum*: toxicology, photosynthesis, and oxidative stress at a glance. Aquat. Toxicol. 118-119: 80-7.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. Experientia Supplementum 101: 133-164.
- Templeton CM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson LG, Muntau H, van Leeuwen HP, Lobinski R (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definition, structural aspects, and methodological approaches. IUPAC Recommendation 2000. Pure Appl. Chem. 72(8): 1453-1470.
- Tercier-Waeber ML, Tallefert M (2008) Remote in situ voltammetric techniques to characterize the biogeochemical cycling of trace metals in aquatic systems. J. Environ. Monit. 10(1): 30-54.
- Terry PA, Stone W (2002) Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. Chemosphere 47: 249-255.
- Tóth P, Bulla M, Nagy G (2011) Energetika. Digitális Tankönyvtár.
- Travieso L, Canizares RO, Borja R, Benitez F, Dominguez AR, Dupeyron R, Valiente V (1999) Heavy metal removal by microalgae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62:144-151.
- Tripathi BN, Gaur JP (2004) Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. Planta. 219(3): 397-404.

- Tripathi BN, Mehta SK, Amar A, Gaur JP (2006) Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} . *Chemosphere* 62(4): 538-44.
- Tsonev T, Lidon FJC (2012) Zinc in plants - An overview. *Emir. J. Food Agric.* 24 (4): 322-333.
- Tver DF (1981) Dictionary of dangerous pollutants, ecology, and environment. Industrial Press Inc., New York, NY, USA.
- Umysová D, Vítová M, Doušková I, Bišová K, Hlavová M, Čížková M, Machát J, Doucha J, Zachleder V (2009) Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *BMC Plant Biology* 9:58 doi: 10.1186/1471-2229-9-58.
- van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13(3): 195–206.
- Vasas G, Bácsi I, Surányi G, Hamvas MM, Mathe C, Nagy SA, Borbely G (2010) Isolation of viable cell mass from frozen *Microcystis viridis* bloom containing microcystin-RR. *Hydrobiologia* 639: 147–151.
- Vasas G, Farkas O, Borics G, Felföldi T, Sramkó G, Batta G, Bácsi I, Gonda S (2013) Appearance of *Planktothrix rubescens* Bloom with [D-Asp3, Mdha7]MC-RR in Gravel Pit Pond of a Shallow Lake-dominated area. *Toxins* 5: 2434–2455.
- Vavilin DV, Ducruet JM, Matorin DN, Venediktov PS, Rubin AB (1998) Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 42(3): 233-239.
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7): 1163–1172.
- Violante A, Cozzolino V, Perelomov L, Caporale AG, Pigna M (2010) Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J. Soil. Sci. Plant Nutr.* 10(3): 268 - 292.
- Visviki I, Rachlin JW (1991) The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute

- and chronic exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20(2): 271-5.
- Volesky B (1990) Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Volland S, Bayer E, Baumgartner V, Andosch A, Lütz C, Sima E, Lütz-Meindl U (2014) Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. Journal of Plant Physiology 171(2): 154–163.
- Wang J, Chen C (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnol Adv. 27(2): 195-226.
- Wase J, Forster CF (2003) Biosorbents for Metal Ions. Taylor & Francis e-Library, London, UK.
- Webb EC (1992) Enzyme nomenclature, recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Academic Press, New York, NY, USA.
- Weiner ER (2012) Applications of Environmental Aquatic Chemistry: A Practical Guide (3th ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- White C, Wilkinson SC, Gadd GM (1995) The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. Int. Biodeterior. Biodegradation. 35(1–3): 17-40.
- Wong PK, Chang L (1991) Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. Environ. Pollut. 72(2): 127-139.
- Wood JM (1974) Biological Cycles for Toxic Elements in Environment. Science 183: 1049.
- Zar JH (2009) Biostatistical analysis (5th ed.). Pearson PLC, London, UK.
- Zeraatkar AK, Ahmadzadeh H, Talebi AF, Moheimani NR, McHenry MP (2016) Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. J. Environ. Manage. 181: 817-31.
- Zhang M, Gao B, Varnoosfaderani S, Hebard A, Yao Y, Inyang M (2013) Preparation and characterization of a novel magnetic biochar for arsenic removal. Bioresource Technology 130: 457–462.
- Zhang SY, Sun GX, Yin XX, Rensing C, Zhu YG (2013) Biomethylation and volatilization of arsenic by the marine microalgae *Ostreococcus tauri*. Chemosphere 93(1): 47-53.

- Zhang TY, Wu YH, Hu HY (2014) Domestic wastewater treatment and biofuel production by using microalga *Scenedesmus* sp. ZTY1. *Water Sci Technol.* 69(12): 2492-6.
- Zhang X, Luo S, Yang Q, Zhang H, Li J (1997) Accumulation of uranium at low concentration by the green alga *Scenedesmus obliquus* 34. *J. Appl. Phycol.* 9(1): 65-71.
- Zhang X, Zhao X, Wan C, Chen B, Bai F (2016) Efficient biosorption of cadmium by the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1. *Algal Res.* 16: 427-433.
- Yan H, Pan G (2002) Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* 49(5): 471-476.

9. MELLÉKLETEK

Melléklet 1. táblázat A kísérletek során használt Jaworski tápoldat összetétele.

Összetevők	g×l ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	0,0124
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,05
NaHCO ₃	0,0159
FeNa-EDTA	0,00225
Na ₂ -EDTA	0,00225
H ₃ BO ₃	0,00248
MnCl ₂ ×4H ₂ O	0,00139
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O	0,001
Cyanocobalamin	0,00004
Thiamine-HCl	0,00004
Biotin	0,00004
NaNO ₃	0,08
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,036

Melléklet 2. táblázat A *Monoraphidium pusillum* és a *Desmodesmus communis* cink-eltávolításának sajátosságai a 0,2-5,0 mg l⁻¹ tartományban.

	<i>Monoraphidium pusillum</i> vs Zn	<i>Desmodesmus communis</i> vs Zn
Egységnyi száraz tömegre vonatkoztatott mennyiség	- A koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - 0,2-1,4 mg l⁻¹ között időben csökken az eltávolított mennyiség; 2,0-5,0 mg l⁻¹ között a 3. napon a legnagyobb az eltávolított mennyiség	- A koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - Időben csökken az eltávolított mennyiség minden koncentráció esetén
A kiindulási mennyiség %-a	- 0,2 mg l⁻¹-nél a legnagyobb; 0,8-5,0 mg l⁻¹ között a koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség (legalább a 3-7. napokon) - Időben nő az eltávolított mennyiség minden koncentráció esetén	- 0,2 mg l⁻¹-nél a leg-nagyobb; 0,8-5,0 mg l⁻¹ között a koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - Időben nő az eltávolított mennyiség minden koncentráció esetén
Extra/intra arány	- 0,2 mg l⁻¹-nél a legkisebb az extracelluláris mennyiség a 0. napon (kisebb mint az intracelluláris) - 0,8-5,0 mg l⁻¹ között a koncentráció növelésével dominál és többé-kevésbé nő az extracelluláris mennyiség - Időben nincs egyértelmű trend az extracelluláris mennyiség változásában, a legtöbb koncentráció esetén.	- A koncentráció nincs hatással az eltávolított extracelluláris mennyiségre - 0,2-1,4 mg l⁻¹ között az extracelluláris mennyiség kisebb, mint az intracelluláris - Időben nő az extracelluláris mennyiség minden koncentráció esetén

Melléklet 3. táblázat A *Monoraphidium pusillum* és a *Desmodesmus communis* rész-eltávolításának sajátosságai a 0,2-5,0 mg l⁻¹ tartományban.

	<i>Monoraphidium pusillum</i> vs Cu	<i>Desmodesmus communis</i> vs Cu
Egységnyi száraz tömeg	- A koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - Időben csökken az eltávolított mennyiség minden koncentráció esetén	- A koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - 0,2-1,0 mg l⁻¹ között időben csökken az eltávolított mennyiség; 1,4-5,0 mg l⁻¹ között pedig nő
A kiindulási mennyiség %-a	- A koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - 0,2-1,4 mg l⁻¹ között időben nő az eltávolított mennyiség minden koncentráció esetén; 2,0-5,0 mg l⁻¹ között a megkötött mennyiség nem változik jelentősen az időben.	- 0,2-1,0 mg l⁻¹ között csökken; 1,4-5,0 mg l⁻¹ között a koncentráció növelésével nő az eltávolított mennyiség minden napon - Időben nő az eltávolított mennyiség minden koncentráció esetén (kivéve 5,0 mg l⁻¹-nél)
Extra/intra arány	- Nincs egyértelmű trend az alkalmazott koncentráció és az extracelluláris mennyiség változása között - 0,2-1,4 mg l⁻¹ között a legkisebb az extra-celluláris mennyiség a 0. napon (kisebb mint az intacelluláris), a 3. napon a legnagyobb - 2,0-5,0 mg l⁻¹ között időben csökken az extracelluláris mennyiség.	- 0,2-0,8 mg l⁻¹-nél a legnagyobb az extra-celluláris mennyiség, 1,0-5,0 mg l⁻¹ között a koncentráció növelésével többé-kevésbé nő az extracelluláris mennyiség - 0,2-1,4 mg l⁻¹ között időben nő az extracelluláris mennyiség; 2,0-5,0 mg l⁻¹ között időben kis mértékben csökken.

10. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

Az értekezés témájában megjelent közlemények (IF: 3,599):

Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven:

Bácsi I, **Novák Z**, Jánószky M, B-Béres V, Grigorszky I, Nagy SA (2015) The sensitivity of two *Monoraphidium* species to zinc - their possible future role in bioremediation. International Journal of Environmental Science and Technology 12(8): pp. 2455-2466. **IF: 2.344**

Novák Z, Jánószky M, B-Béres V, Nagy SA, Bácsi I (2014) Zinc Tolerance and Zinc Removal Ability of Living and Dried Biomass of *Desmodesmus communis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 93(6): pp. 676-682. **IF: 1.255**

Referált folyóiratokban megjelent közlemények magyar nyelven:

Novák Z, Szemán A, Jánószky M, Nagy SA, Bácsi I (2014) A *Desmodesmus communis* zöldalga rézzel szembeni érzékenysége és réz-akkumulációjának jellemzése. Hidrológiai Közlöny 94(5-6): pp. 70-73.

Novák Z, Jánószky M, Nagy SA, Bácsi I (2013) A *Scenedesmus quadricauda* zöldalga faj élő és holt biomasszájának cink-akkumulációs sajátosságai. Hidrológiai Közlöny 93(5-6): pp. 105-108.

Külföldi konferenciák, posztterek:

Novák Z, Jánószky M, Nagy SA, Bácsi, I (2013) Zinc tolerance of *Desmodesmus quadricaudatus* (Turpin) Hegewald and zinc removal ability of living and dead biomass of the green alga. III. Fresh Blood for FreshWater - Young Aquatic Science, 2013. február 27. – március 1. Lunz, Ausztria.

B-Béres V, Szabó G, **Novák Z**, Vítál Z, Bácsi I (2011) The sensitivity of two *Monoraphidium* species to zinc: their possible role in bioremediation. The 16th Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP), 2011. augusztus 21-28. S. Michele all'Adige, Olaszország.

Hazai konferenciák, posztterek:

- Novák Z**, Szemán A, Jánószky M, Nagy SA, Bácsi I (2013) A *Desmodesmus communis* zöldalga rézzel szembeni érzékenységének és réz-akkumulációjának jellemzése. LV. Hidrobiológus Napok, 2013. október 2-4. Tihany.
- Novák Z**, Jánószky M, Nagy SA, Bácsi I (2012) A *Scenedesmus quadricauda* zöldalga faj élő és holt biomasszájának cink akkumulációs sajátságai. LIV. Hidrobiológus Napok, 2012. október 3-5. Tihany.

Egyéb megjelent közlemények (IF: 10,358)

Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven:

- B-Béres V, Lukács Á, Török P, Kókai Zs, **Novák Z**, T-Krasznai E, Tóthmérész B, Bácsi I (2016) Combined eco-morphological functional groups are reliable indicators of colonisation processes of benthic diatom assemblages in a lowland stream. *Ecological Indicators* 64: pp. 31-38. **IF: 3,190**
- Bácsi I, B-Béres V, Kókai Z, Gonda S, **Novák Z**, Nagy SA, Vasas G (2016) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages. *Environmental Pollution* 212: pp. 508-518. **IF: 4,839**
- Bácsi I, Gonda S, B-Béres V, **Novák Z**, Nagy SA, Vasas G (2015) Alterations of phytoplankton assemblages treated with chlorinated hydrocarbons: Effects of dominant species sensitivity and initial diversity. *Ecotoxicology* 24(4): pp. 823-834. **IF: 2,329** (2015)

Külföldi konferenciák, előadások:

- Bácsi I, Gonda S, B-Béres V, **Novák Z**, Nagy SA, Vasas G (2015) Responses of diatom taxa to the presence of non steroid anti inflammatory drugs in natural algal assemblages. 9th Central European Diatom Meeting, 2015. március 10.-13. Bremerhaven, Németország.

Külföldi konferenciák, posztterek:

- Novák Z**, Bácsi I, Gonda S, B-Béres V, Nagy SA, Vasas G (2014) Various effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

on the growths of cyanobacteria and eukaryotic algae. The 17th Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP), 2014. szeptember 14-21. Kastoria, Görögország.

- Bácsi I, **Novák Z**, Gonda S, B-Béres V, Nagy SA, Vasas G (2014) Effects of non steroid anti inflammatory drugs on the composition of natural algal assemblages. The 17th Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP), 2014. szeptember 14-21. Kastoria, Görögország.
- Bácsi I, B-Béres V, Vasas G, Gonda S, **Novák Z**, Nagy SA (2013) Changes in composition of phytoplankton assemblages due to organic contaminants depending on the sensitivity of dominant species. 4th Croatian Botanical Symposium, 2013. szeptember 27-29. Split, Horvátország.

Hazai konferenciák, előadások:

- Bácsi I, Gonda S, B-Béres V, **Novák Z**, Nagy SA, Vasas G (2015) Nem szteroid gyulladáscsökkentők hatása természetes algaközösségek összetételére. VII. Algológus Találkozó és Továbbképzés, 2015. május 27. Budapest,
- Bácsi I, B-Béres V, Gonda S, **Novák Z**, Vasas G (2013) Fitoplankton közösség összetételének változása szerves szennyező hatására a közösség diverzitásának és a domináns faj érzékenységeinek függvényében. IV. Algológus Találkozó és Továbbképzés, 2013. november 27. Budapest.

Hazai konferenciák, poszterek:

- B-Béres V, Lukács Á, Török P, Kókai Zs, **Novák Z**, T-Krasznai E, Tóthmérész B, **Bácsi I** (2015) Ökológiai csoportok szerepe alföldi kisvízfolyás kovaalgáinak kolonizációs vizsgálataiban – holisztikus szemléletű kombinált ökológiai csoportok használhatósága. 10. Magyar Ökológus Kongresszus, 2015. augusztus 12-14. Veszprém.