

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

**A *KLEBSORMIDIUM FLACCIDUM* FONALAS ZÖLDALGA FIZIOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI VIZSGÁLATA - FOTOSZINTÉZIS, NÖVÉNYI
HORMONTERMELÉS ÉS TALAJJAVÍTÓ KÉPESSÉG**

Készítette:

Futó Péter

DOI:10.18136/PE.2026.977

Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. Bernát Gábor

tudományos főmunkatárs, HUN-REN Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Hidrobotanikai és
Mikrobiális Ökológiai Kutatócsoport, Tihany

Dr. Lengyel Edina

tudományos főmunkatárs, Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Természettudományi Központ,
Limnológiai Kutatócsoport, Veszprém

Pannon Egyetem

Mérnöki Kar, Természettudományi Központ, Limnológia Kutatócsoport

Veszprém

2025

A *Klebsormidium flaccidum* fonalas zöldalga fiziológiai és biotechnológiai vizsgálata -
fotoszintézis, növényi hormontermelés és talajjavító képesség

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Környezettudományok tudományágban

Írta: Futó Péter

Témavezetők: Dr. Bernát Gábor, Dr. Lengyel Edina

Elfogadásra javaslom: igen / nem.

.....
témavezető

Elfogadásra javaslom: igen / nem.

.....
témavezető

Az értekezés bírálatra bocsátható.

.....
TDHT elnök

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján %-ot ért el.

A bíráló Bizottság tagjai:

elnök:.....

bírálok:.....

tagok:.....

Veszprém,

.....
Bíráló Bizottság elnök

A doktori (PhD) oklevél minősítése:.....

Veszprém,

.....
EDHT elnök

Kivonat

Munkám során egy *Klebsormidium* nemzetséghez tartozó, kevésbé kutatott algában rejlő biotechnológiai hasznosíthatósági lehetőségeket kutattam. A kutatásom alapját a törzssel végzett korábbi vizsgálataim eredményei szolgáltatták; melyek alapján elmondható volt, hogy kiváló tenyésztetősége mellett, képes talajkolonizációra, illetve növényi növekedés serkentő hatással is rendelkezik. A törzset a következő szempontok szerint vizsgáltam:

1. fiziológiai jellemzőinek feltérképezése,
2. hormontartalmának meghatározása, valamint
3. mezőgazdasági felhasználhatóságának vizsgálata.

A kísérleteim egy részét laboratóriumban hajtottam végre – ún. tenyésztési kísérletek, fotoszintetikus paraméterek mérése, növényi hormontartalom meghatározása, visszaizolálási kísérletek, talajparaméterek vizsgálata –, de volt lehetőségem szántóföldön is vizsgálni a törzs eróziócsökkentő hatását. Az alábbi fő megállapításokat tettem:

- 1) Az Észak-magyarországi barlang faláról (GPS-koordináták: 47.90067, 20.37917) izolált *Klebsormidium* törzs ökofiziológiai vizsgálata során megállapítottam, hogy a törzs 10 és 40°C közötti hőmérséklet között képes növekedésre, míg a növekedésének hőmérsékleti optimuma 20–25°C közé esik. A tenyészetek brasszínolid tartalmának maximumát 35°C-on figyeltük meg. A fotoszintetikus aktivitást tekintve az oxigéntermelési és klorofill-fluoreszcencia-alapú mérések maximumai 30–40°C, illetve 35–40°C közé estek. Megállapítottam továbbá, hogy a vizsgált *Klebsormidium* törzs barlangi adaptációra utaló jellemzőket mutat, azaz magas fényhasznosítási tényező és alacsony fényadaptációs paraméter jellemzi.
- 2) A *Klebsormidium* algatenyészetek brasszínoszteroid (BR) tartalmának becsléséhez egy rizslevéllemezelhajlási bioteszt módszerfejlesztését hajtottam végre. A brasszínoszteroidok növényi hormonok, melyek fontos szerepet játszanak a növényi növekedésben, fejlődésben, illetve a növényt érő stresszhatások hatásainak csökkentésében. Ezek a hatások értékessé teszik ezt a vegyületcsaládot mezőgazdasági alkalmazásokban. Az öt vizsgált rizsfajta közül a 'Koshihikari' bizonyult a legalkalmasabbnak erre a célra. A kísérletek alapján ez a bioteszt 0,001-0,1 mg brasszínolid L⁻¹ koncentráció-tartományban alkalmazható. A vizsgált *Klebsormidium* tenyészetből az intracelluláris BR-tartalmat metanolos extrakcióval nyertem ki. A kapott extraktumon szilárd-fázisú extrakcióval oldószercserét végeztem, majd a

kidolgozott módszert sikerrel validáltam nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrográfiával (UHPLC-MS/ MS). Pontos és megbízható összefüggést mutattam ki a RLIA és BR koncentrációk közt [(nagy R^2 , alacsony RSE (Residual Standard Error – reziduumok szórása) és RMSE (root mean square error – négyzetes gyök átlagos hiba)].

- 3) A talajfelszínre oltott tenyészet a májusi kijuttatását követő 4,5 hónap alatt biológiai talajkérget (BSC) alakított ki a vizsgált területen, amely számos további hatást indukált az erózió sújtotta talajon. A kezelés hatására a talaj szerkezete és ezzel összefüggésben a vízháztartása is javult. Nőtt a makropórusok mennyisége (+52%), aggregátum stabilitás (+44%) és a nedvességtartalom (+2%) a talaj felső rétegében, miközben a mikropórusok számát az alga nem befolyásolta szignifikánsan (+6%). A mesterséges esőztetési vizsgálatok alapján elmondható, hogy a *Klebsormidium*-dominált BSC erózió-mérséklő hatással rendelkezik (-43%). Összességében megállapítottam, hogy az algakezelés jelentősen javította a talaj tulajdonságait és növelte annak erózióval szembeni ellenálló képességét.

Abstract

During my research, I investigated the potential biotechnological applications of a less-studied alga belonging to the genus *Klebsormidium*. The basis of my work was provided by previous studies with the strain, which indicated that besides being highly cultivable, it is capable of soil colonization and exerts plant growth-promoting effects. I investigated the strain according to the following aspects:

1. mapping of its physiological characteristics,
2. determination of its hormone content, and
3. its applicability in agriculture.

Parts of my experimental work were conducted in the laboratory – i.e. cultivation trials, assessment of photosynthetic parameters, determination of plant hormone content, re-isolation experiments, and soil parameter analyses – while I also had the opportunity to study in situ the strain's erosion-reducing effects. My main findings were the following:

1. During the ecophysiological characterization of a *Klebsormidium* strain isolated from the wall of a cave in Northern Hungary (GPS coordinates: 47.90067, 20.37917), I found that this algae is capable of growing between 10 and 40°C, with an optimum temperature range of 20–25°C. The maximum brassinolide content of the cultures was found at 35°C. Regarding photosynthetic activity, its maximal values were recorded between 30–40°C and 35–40°C by oxygen evolution and chlorophyll fluorescence measurements, respectively. Additionally, I established that the examined *Klebsormidium* strain exhibits a characteristics showing an adaptation to cave environment, such as a high light utilization coefficient (α) and a low light adaptation parameter (I_k).
2. To estimate the brassinosteroid (BR) content of *Klebsormidium* cultures, I have further developed a rice lamina inclination bioassay. Brassinosteroids are plant hormones that play an important role in plant growth and development, as well as in mitigating the effects of stress factors. These properties make this compound family valuable in agricultural applications. Among the five tested rice cultivars, 'Koshihikari' proved to be the most suitable for this purpose. Based on the biotests, this bioassay is applicable over the concentration range of 0.001–0.1 mg L⁻¹ brassinolide. Intracellular brassinosteroids were extracted from the *Klebsormidium* culture using methanol. The obtained extract underwent solvent exchange *via* solid-phase extraction, and the

developed method was successfully validated using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). I demonstrated a precise and reliable correlation between RLIA and BR concentrations [high R^2 , low RSE (Residual Standard Error) and RMSE (Root Mean Square Error)].

3. The algae culture, inoculated onto the soil surface, formed a biological soil crust (BSC) within 4.5 months after its application. The formed BSC induced several beneficial secondary effects on erosion-affected soil. For instance, the number of macropores (+52%) and stable aggregates increased (44%), similarly to the soil moisture content (+2%). The amount of micropores was not affected by the presence of the applied algae (+6%). According to artificial rainfall simulations, the *Klebsormidium*-dominated BSC exhibited erosion-reducing effects (-43%). Overall, I concluded that the algal treatment significantly improved soil properties and enhanced the soil's resistance to erosion.

Zusammenfassung

Während meiner Forschung untersuchte ich die potenziellen biotechnologischen Anwendungen einer bisher wenig erforschten Alge aus der Gattung *Klebsormidium*. Grundlage meiner Arbeit bildeten frühere Studien mit dem Stamm, die zeigten, dass er neben einer hohen Kultivierbarkeit auch in der Lage ist, Böden zu besiedeln und wachstumsfördernde Effekte auf Pflanzen auszuüben. Ich untersuchte den Stamm in Bezug auf folgende Aspekte:

1. Kartierung seiner physiologischen Eigenschaften,
2. Bestimmung seines Hormongehalts und
3. seine Anwendbarkeit in der Landwirtschaft.

Teile meiner experimentellen Arbeit wurden im Labor durchgeführt – d. h. Kultivierungsversuche, Bewertung von photosynthetischen Parametern, Bestimmung des Pflanzenhormongehalts, Re-Isolationsversuche und Analysen von Bodenparametern – während ich auch die Möglichkeit hatte, die erosionsmindernden Effekte des Stammes in situ zu untersuchen. Meine wichtigsten Ergebnisse waren die folgenden:

1. Bei der ökophysiologischen Charakterisierung eines *Klebsormidium*-Stammes, der von der Wand einer Höhle im Norden Ungarns isoliert wurde (GPS-Koordinaten: 47.90067, 20.37917), stellte ich fest, dass diese Alge zwischen 10 und 40 °C wachsen kann, mit einem optimalen Temperaturbereich von 20–25 °C. Der maximale Brassinolid-Gehalt der Kulturen wurde bei 35 °C festgestellt. Bezüglich der Photosyntheseaktivität wurden die Maximalwerte zwischen 30–40 °C bzw. 35–40 °C durch Sauerstoffentwicklungs- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen ermittelt. Darüber hinaus stellte ich fest, dass der untersuchte *Klebsormidium*-Stamm Merkmale aufweist, die auf eine Anpassung an die Höhlenumgebung hinweisen, wie z. B. ein hoher Lichtnutzungskoeffizient (α) und ein niedriger Lichtanpassungsparameter (I_k).
2. Zur Abschätzung des Brassinosteroid-(BR)-Gehalts der *Klebsormidium*-Kulturen habe ich einen Reislammellen-Neigungsbioassay weiterentwickelt. Brassinosteroide sind Pflanzenhormone, die eine wichtige Rolle für das Pflanzenwachstum und die -entwicklung sowie bei der Abschwächung von Stressfaktoren spielen. Diese Eigenschaften machen diese Stoffgruppe für landwirtschaftliche Anwendungen wertvoll. Unter den fünf getesteten Reissorten erwies sich „Koshihikari“ als am besten geeignet. Basierend auf den Biotests ist dieser Bioassay über den Konzentrationsbereich

von 0,001–0,1 mg L⁻¹ Brassinolid anwendbar. Intrazelluläre Brassinosteroide wurden aus der *Klebsormidium*-Kultur mit Methanol extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde über Festphasenextraktion einem Lösungsmittelaustausch unterzogen, und die entwickelte Methode wurde erfolgreich mit Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-MS/MS) validiert. Ich habe einen genauen und verlässlichen Zusammenhang zwischen RLIA- und BR-Konzentrationen nachgewiesen [hohes R², niedriger RSE (Residual Standard Error – Standardfehler der Residuen) und RMSE (Root Mean Square Error – mittlerer quadratischer Fehler)].

3. Die auf den Boden aufgebrachte Algenkultur bildete innerhalb von 4,5 Monaten nach der Anwendung eine biologische Bodenkruste (BSC). Die gebildete BSC führte zu mehreren positiven Sekundäreffekten auf erosionsgefährdeten Böden. Beispielsweise nahmen die Makroporen (+52 %) und stabile Aggregate (+44 %) zu, ebenso wie der Bodenfeuchtegehalt (+2 %). Die Anzahl der Mikroporen wurde durch die Anwesenheit der aufgebrachten Alge nicht wesentlich beeinflusst (+6 %). Laut künstlicher Regenfall-Simulationen zeigte die von *Klebsormidium* dominierte BSC erosionsmindernde Effekte (-43 %). Insgesamt schloss ich daraus, dass die Algenbehandlung die Bodeneigenschaften deutlich verbesserte und die Widerstandsfähigkeit des Bodens gegenüber Erosion erhöhte.

Rövidítések

ACN	Acetonitril
BBM	Bold tápoldat
BL	Brassinolid
BR	Brassinoszteroid
BSC	Biológiai talajkéreg
CS	Kasztaszteron
Chl	Klorofill
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EPS	Extracelluláris polimer
IAA	Indol-3-ecetsav
I_k	Fényadaptációs paraméter
PAR	Fotoszintetikusán aktív fénysugárzás
PGRP	Növényi növekedést serkentő rizobaktérium
PI	Fotoszintézis-fényintenzitás (görbe)
qN	Nem-fotokémiai kioltás
qP	Fotokémiai kioltás
RDA	Redundancia analízis
rETR	Relatív elektrontranszport-ráta
RLC	Gyors fénygörbe
RLIA	Rizs levéllemez elhajlási teszt
SPE	Szilárd-fázisú extrakció
UHPLC-MS/MS	Ultra-nagy teljesítményű folyadékkromatográfia tandem tömegspektrometriával
α	Fényhasznosítási tényező
μ	Fajlagos növekedési sebesség

Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék	14
Táblázatjegyzék.....	17
Előzmények.....	18
1 Bevezetés.....	19
1.1 Irodalmi áttekintés	19
1.1.1. Biotechnológia a mezőgazdaságban.....	19
1.1.2. Mikrobiológia a mezőgazdaságban	20
1.1.3. Mikroalgák és biotechnológiai alkalmazhatóságuk története	22
1.1.4. A <i>Klebsormidium</i> nemzetség	27
2. Barlangból izolált <i>Klebsormidium</i> törzs ökofiziológiai vizsgálata	30
2.1 Bevezetés	30
2.2 Anyagok és módszerek	31
2.2.1 Izolálás és algatenyésztési körülmények.....	31
2.2.2 Az algatörzs azonosítása - DNS-szekvencia elemzés	32
2.2.3 Oxigénhozam mérések	33
2.2.4 Fotoszintetikus aktivitás meghatározása klorofill-fluoreszcencia mérésekkel ..	34
2.2.5 Növekedési ráták meghatározása	35
2.2.6 Brasszinolid meghatározás	36
2.2.7 Statisztikai elemzés	36
2.3 Eredmények	37
2.3.1 A <i>Klebsormidium</i> törzs taxonómiai azonosítása.....	37
2.3.2 Fotoszintetikus teljesítmény hőmérsékletfüggése	38
2.3.3 A tenyészetek növekedési sebességének hőmérsékletfüggése.....	42
2.3.4 A különböző hőmérsékleten tenyésztett <i>Klebsormidium</i> tenyészetek brasszinolid tartalma 43	
2.4 Diskusszió.....	44
2.4.1 Fényigény	44
2.4.2 Hőmérsékleti igények.....	46
3. Rizslevélmez-elhajlási bioteszt kidolgozása <i>Klebsormidium</i> algatenyészetek brasszinoszteroid tartalmának meghatározására	49
3.1 Bevezetés	49
3.2 Anyagok és módszerek	50

3.2.1	Rizsfajták.....	50
3.2.2	Rizslevéllemez-elhajlási bioteszt (RLIA)	51
3.2.3	Mintaelőkészítés.....	52
3.2.4	UHPLC-MS/MS elemzés.....	54
3.2.5	Statisztikai elemzések	55
3.3	Eredmények.....	55
3.3.1	Rizsfajta kiválasztása a rizs levéllemez elhajlási bioteszthez	55
3.3.2	Az RLIA érzékenységeinek meghatározása.....	56
3.3.3	A <i>Klebsormidium</i> BL tartalmának becslése RLIA segítségével	57
3.4	Diszkusszió.....	60
4.	Alga-domináns biológiai talajkéreg hatása a talajra.....	63
4.1	Bevezetés	63
4.2	Anyagok és módszerek.....	66
4.2.1	Vizsgálati terület és kísérleti beállítás.....	66
4.2.2	<i>Klebsormidium</i> tenyészetek visszaizolálása talajmintákból.....	68
4.2.3	Közösségi DNS izolálása, amplifikálása és szekvenálása	68
4.2.4	Mesterséges esőztetés és talajvizsgálatok	70
4.2.5	Statisztikai elemzések	71
4.3	Eredmények.....	71
4.3.1	Az algaoltás sikerességének vizsgálata	71
4.3.2	A felszín morfológiájának változása a talajoltás hatására.....	75
4.3.3	Az algakezelés hatása a felszíni beszivárgási sebességre és a talajvesztésre. 76	
4.3.4	A talaj porozitásának és aggregátum-stabilitásának változása az algakezelés hatására 77	
4.3.5	Az RDA eredményei	78
4.4	Diszkusszió.....	79
4.4.1	A mesterséges algaoltás sikere.....	79
4.4.2	A talaj porozításában és aggregátum-stabilitásában bekövetkezett változások algakezelés hatására	80
4.4.3	Az algakezelés hatása az erózióra	81
4.4.4	Gyakorlati alkalmazhatóság	82
5.	Konklúzió.....	84
6.	Köszönetnyilvánítás	85
7.	Hozzájárulás.....	86

8. Tézis pontok	87
9. Key Results in Thesis Points	88
10. Publikációs lista.....	89
11. Konferencia részvételek	90
12. Irodalomjegyzék.....	92
13. Függelék	114

Ábrajegyzék

- 1. ábra** A biotechnológia eljárások színskálája
- 2. ábra** A növényi növekedést serkentő rizobaktériumok hatásai
- 3. ábra** A vörös, zöld, glaukofita és színesmoszatok evolúciós kapcsolatait és divergenciaidejét bemutató sematikus ábra
- 4. ábra** Mikroalgák alkalmazhatóságával kapcsolatos főbb tudományos eredmények
- 5. ábra** *Klebsormidium* fénymikroszkópos (400× nagyítás, a) és sztereomikroszkópos képei (80×, illetve 40× nagyítás, b-c), valamint bevonatként talaj felszínén (d)
- 6. ábra** *Klebsormidium* tenyészetek fenntartása fénypolcon
- 7. ábra** Algatenyésztés levegőztetett reaktorokban 8 liter térfogatban, a két szélső bioreaktorban *Klebsormidium* tenyészet. Levegőztetés hatására a biomassa a folyadékfelszínen koncentrálódik tenyésztés során
- 8. ábra** A fotoszintetron rendszer sematikus illusztrációja felül- (a) és oldalnézetből (b), valamint képek a rendszerről (c,d)
- 9. ábra** A fotoszintézis mérésekhez használt DUAL-PAM-100 mérőműszer
- 10. ábra** A vizsgált fonalas zöldalga törzs (félkövérrel) 18S rRNS gén és az ITS régió maximum likelihood törzsfái. A csillagok hiteles törzseket jelölnek
- 11. ábra** A *Klebsormidium* PI görbéi különböző hőmérsékleteken. (a) rETR vs. fényintenzitás görbék, (b) oxigénfejlődés vs. fényintenzitás görbék (n = 3; az átlagértékek feltüntetve)
- 12. ábra** Az rETR (piros négyzetek) és a maximális oxigénfejlődés (P_{max} , zöld háromszögek) hőmérsékletfüggése. Az értékek a 16. ábrából származnak (n = 3; az átlagértékek vannak feltüntetve)
- 13. ábra** A fényhasznosítási tényező (α , a) és a fényadaptációs paraméter (I_K , b) hőmérsékletfüggése a vizsgált *Klebsormidium* törzs esetében, az oxigénfejlődés és a fényintenzitás (zöld háromszögek), valamint az rETR és a fényintenzitás közötti görbék (piros négyzetek) alapján (n = 3; az átlagértékek vannak feltüntetve, a szórás kevesebb mint 10%)
- 14. ábra** A *Klebsormidium* tenyészetek fotokémiai (qP) és nem-fotokémiai kioltásának (qN) hőmérsékletfüggése. A qP és qN értékeket fluoreszcencia-indukciós görbék alapján határoztuk meg, 131 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aktinikus fényintenzitás mellett (n = 3, az átlagértékek vannak feltüntetve)
- 15. ábra** A fotoszintetikus oxigéntermelés és a respirációs oxigénfogyasztás hőmérsékletfüggése (a), valamint ezek aránya (P:R, b)
- 16. ábra** *Klebsormidium* tenyészetek specifikus növekedési sebessége (μ) a hőmérséklet függvényében

- 17. ábra** A *Klebsormidium* fajlagos specifikus növekedési sebességének (zöld körök) és átlagos brasszinolid tartalmának (lila háromszögek) hőmérsékletfüggése. A fajlagos növekedési sebesség értékeinek illesztéséhez lognormális függvényt ($r^2 = 0,72$), míg az átlagos brasszinolid-tartalom értékeihez másodfokú polinomiális függvényt használtunk ($r^2 = 0,89$)
- 18. ábra** A rizslevéllemez-elhajlási teszt lépései; csíráztatás (a), egyforma elhajlási szög kiválasztása (b), kezelés (c), szögmérés számítógépes szoftverrel (d)
- 19. ábra** A rizslevéllemez-elhajlási bioteszt kidolgozása során alkalmazott brasszinolid (BL) koncentrációk
- 20. ábra** Szilárd fázisú extrakció lépései
- 21. ábra** Az RLIA (rizslevéllemez-elhajlási teszt) és a *Klebsormidium* tenyészetekkel végzett brasszinoszteroid-meghatározás folyamatának vázlatos ábrázolása
- 22. ábra** A rizs levéllemez dőlési szögének brasszinolid-koncentráció-függése a „Koshihikari” rizsfajtából izolált mintákon ($n = 9$). Összehasonlításképpen feltüntetésre került a kezeletlen kontrollok, valamint az ép *Klebsormidium* tenyészettel (Kb) kezelt rizs levéllemez dőlési szöge is. Az oszlopok felett látható betűk a Welch-teszt eredményeit jelölik: az azonos betűkkel jelölt csoportok között nincs szignifikáns különbség, míg a különböző betűkkel jelölt csoportok szignifikánsan eltérnek egymástól
- 23. ábra** A metanol hatása a rizs levéllemez dőlési szögére. A rizs levéllemez dőlését BL standardok jelenlétében vagy azok nélkül idéztük elő a megadott koncentrációk mellett, víz (kék) vagy 95%/5% víz–metanol keverék (zöld) oldószer alkalmazásával. A hibasávok a szórást jelzik ($n = 8$)
- 24. ábra** A levéllemez dőlési szöge különböző koncentrációjú brasszinolid standardok (kék pontok, $n = 8$) és *Klebsormidium* kivonatok (zöld négyzet, $n = 4$) jelenlétében (átlag és szórás). A *Klebsormidium* kivonatok esetében az x irányú hibasávok a jelölés méretén belül maradnak
- 25. ábra** A talajerózió mértékének változása 2015 és 2070 között. (A) a talajeróziós rátákat mutatja be, hét osztályba sorolva az Európai Talajügyi Hivatal (European Soil Bureau) besorolása alapján. A B-D ábrák a 2015 és 2070 közötti éves átlagos talajerózió változásait szemléltetik különböző forgatókönyvek esetén
- 26. ábra** Magyarországi erodált talajok térképe
- 27. ábra** A vizsgálati helyszínek légifotója
- 28. ábra** (a) Glifozátos kezelés két nappal vetés után (április 23.), illetve (b) az algakészítmény kijuttatása május 11-én a soroló kukoricában
- 29. ábra** Meermans esőszimulátor esőztetés közben oldalról (a), és felülről (b)
- 30. ábra** *Klebsormidium* alkotta biológiai talajkéreg a kezelt talajfelszínen
- 31. ábra** A baktériumok (a) és az eukarióták (b) közösségi összetételében mutató szignifikáns különbségek. A csomópontok a taxonómiai egységeket és az alkalmazott

kezeléseket jelölik. A szalagok szélessége a taxonómiai egységek átlagos relatív abundanciájának arányát mutatja a kontroll (barna) és a kezelt (zöld) minták között. A baktériumok esetében a törzs-, míg az eukarióták esetében az osztály (divízió) szintű egységek szerepelnek

- 32. ábra** A talajfelszín jellemzői esőzést követően: (a) a kezelt területen, ahol a fehér és sárga nyilak rendre az aggregált és az egyedi szemcsés üledékképződést jelzik; (b) aggregátumok nélküli talajfelszín a kontroll parcellán; (c) aggregátumok az algával kezelt parcellán
- 33. ábra** Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek a tömörödött, szerkezet nélküli kontroll rétegről (a), valamint az aggregált, algával kezelt felszíni talajkéreg felületéről (b). Skála: 1 mm
- 34. ábra** A redundancia analízis (RDA) kétdimenziós ábrája, amely a legjelentősebb prokarióta és eukarióta taxonómiai egységei, valamint különböző talajparaméterek közötti kapcsolatot mutatja be (barna: kontroll minták, zöld: algakezelt minták, Strept: Streptophyta, Erosion: talajveszteség, Bulk: tömörség, Moisture: talajnedvesség, Macropores: makropórusok, Micropores: mikropórusok, Stability: aggregátum-stabilitás, Porosity: porozitás)

Táblázatjegyzék

- 1. táblázat** Mikroalgák hasznosítása különböző mezőgazdasági célokra. A fajok leíróját és az új taxonómiai neveit az 1. melléklet tartalmazza
- 2. táblázat** A brasszolidkezelés hatása a levéllemezek hajlásszögére különböző rizsfajták esetében (átlag és szórás)(n = 8–10). nd = nem meghatározott
- 3. táblázat** Az esőszimulációk főbb beállított paraméterei, valamint a meghatározott hidrológiai jellemzők és talajveszteség a kezeletlen (kontroll) és az algával kezelt területen ($0,05 > p > 0,01$; CV: variációs együttható)
- 4. táblázat** A kontroll- és kezelt területről származó talajminták porozitási paraméterei ($*0,01 < p < 0,05$, $**0,001 < p < 0,01$, $***p < 0,001$, CV: variációs együttható)

Előzmények

Munkahelyemen, az Albitech Biotechnológiai Kft.-nél egy barlangból izolált *Klebsormidium* fajjal dolgoztam az elmúlt 10 évben. Az izolátumról bebizonyosodott, hogy nem csak lombik-, hanem fülüzemi léptékben is kiválóan tenyészthető fonalas szerveződése ellenére, ami kiváló alapot szolgáltat a faj lehetséges biotechnológiai hasznosíthatóságához. Számos előkísérletet végeztünk az alगतörzs tulajdonságainak megismerésére, amelyek során vizsgáltuk többek között:

- 1) talajkolonizációs képességét,
- 2) UV-ellenálló képességét,
- 3) különböző típusú talajok nedvességtartalmára gyakorolt hatását, és
- 4) növényi növekedést serkentő hatását.

A vizsgálatok során biztató eredményeket kaptunk, ezért szabadalmi bejelentést tettünk (lajstromszám: 231252, Albitech Biotechnológiai Kft. 2018), illetve a törzset szabadalmi letétbe helyeztük a Spanyol Algabankba (BEA, Telde, Spanyolország), ahol a törzs a BEA_IDA_0061B azonosítót kapta 2017-ben, valamint a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményébe (292/2017).

A doktori (PhD) képzés keretein belül az előkísérletekben szerzett tapasztalatokra és összegyűjtött információkra alapozva folytattam kutatásaimat három fő irányvonal mentén:

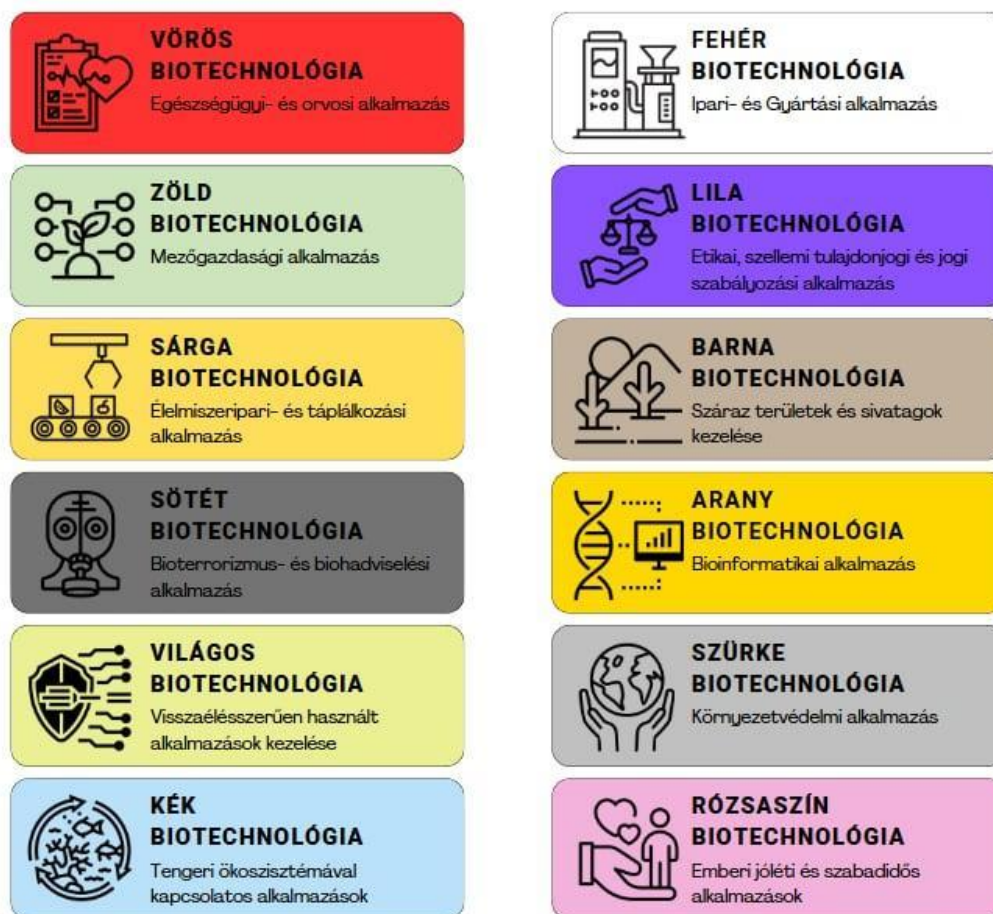
- 1) fiziológiai jellemzőinek feltérképezése (a disszertáció 2. alfejezete),
- 2) hormon tartalmának meghatározása (a disszertáció 3. alfejezete), valamint
- 3) mezőgazdasági felhasználhatóságának vizsgálata (a disszertáció 4. alfejezete).

1 Bevezetés

1.1 Irodalmi áttekintés

1.1.1. *Biotechnológia a mezőgazdaságban*

A biotechnológiai eljárások eltérő csoportokba sorolhatók, amelyeket a könnyebb megkülönböztetés érdekében eltérő színekkel jelölnek. Kezdetben három fő szint használtak: a pirosat (egészségügy, orvosi diagnosztika), a zöldet (mezőgazdaság), valamint a fehéret (ipari alkalmazások). Azonban ezek száma a tudomány fejlődésével folyamatosan növekedett, és napjainkra egész színskála reprezentálja az eljárásokat (1. ábra); például sárga – élelmiszeripar, szürke – környezetvédelem, arany – bioinformatika és számítógépes technológiák, barna – száraz, sivatagi területek biotechnológiája (Kafarski 2012). Dolgozatomban egy fonalas mikroalga tenyészet mezőgazdasági alkalmazhatóságával kapcsolatos kutatásokat végeztem, ami a felsorolt területek közül a „zöld biotechnológiához” tartozik.



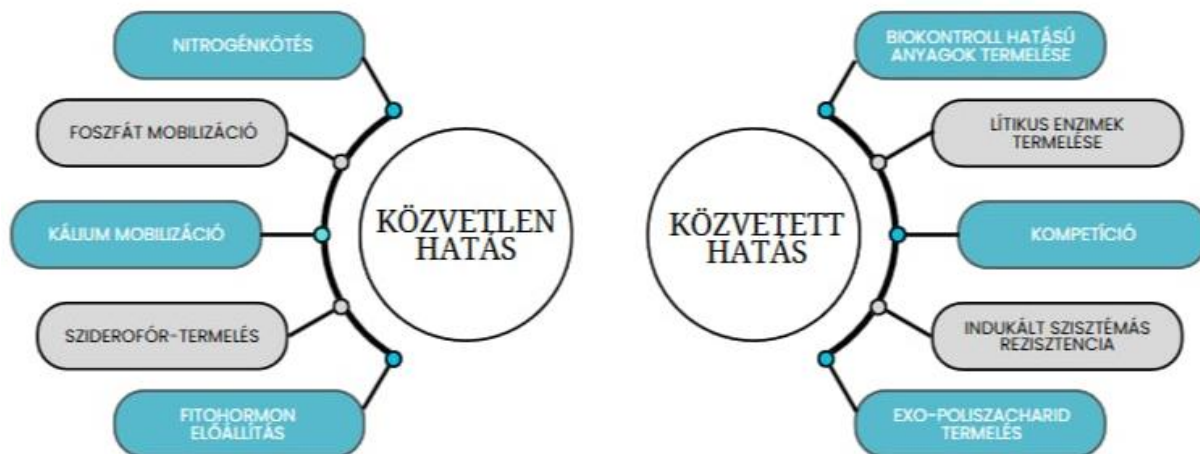
1. ábra A biotechnológia eljárások színskálája

Az agrárbiotechnológia fejlődésével párhuzamosan egyre több olyan kutatás indult el, amely figyelembe veszi a környezetre gyakorolt hatásokat, az etikai szempontokat, a szocioökonómiai megközelítéseket, a szabályozási és jogi kereteket, valamint a szellemi tulajdonjogokat egyaránt (Altman és Hasegawa 2012). Ezen elvárások miatt egyre nagyobb figyelem és igény szegeződik alternatív biotechnológiákra, ilyenek például a mikrobiológiai oltóanyagok és kivonatok előállítására. A kémiai vagy szintetikus növényvédő szerekhez és műtrágyákhoz képest a mikrobiológiai oltóanyagoknak számos előnye van (Berg 2009):

- biztonságosabbak,
- kisebb környezeti károkat okoznak,
- kevesebb egészségügyi kockázatot jelentenek az emberre,
- célzottabb hatásúak, kisebb mennyiségben is hatékonyak,
- képesek szaporodásra,
- rövidebb a lebomlási idejük,
- a rezisztencia kialakulásának esélye kisebb a többféle hatásmechanizmus miatt,
- alkalmazhatók hagyományos vagy integrált növényvédelmi rendszerekben is.

1.1.2. *Mikrobiológia a mezőgazdaságban*

A mezőgazdasági mikrobiológia területén az egyik legfontosabb korai eredmény a légköri nitrogént megkötő baktériumok felismerése és leírása volt (Hellriegel és Wilfarth 1888). Ezek a baktériumok felelősek a hüvelyesek gyökérgümőinek kialakulásáért, ahol a nitrogénmegkötés történik. Ez a tudás alapozta meg a hüvelyesek oltóanyagának világméretű gyártását (Wall és mtsai 2019). Az első mikrobiális oltóanyagot a „Nitragin” -t 1896-ban az Egyesült Államokban szabadalmaztatták, ami egy *Rhizobium* fajt tartalmazott és a hüvelyes növények talajoltására használták (Ramakrishnan és mtsai 2023). Döbereiner és Day 1976-ban írtak az *Azospirillum* nemzetségről, melyet növényi növekedést serkentő baktériumként („plant growth-promoting bacteria”) jellemeztek. A 20. század utolsó évtizedeiben a kutatóknak sikerült olyan *Pseudomonas* törzseket izolálni, amelyek képesek voltak gátló hatást kifejteni a kórokozó gombák növekedésére, de egyúttal a növényi növekedést is jelentősen serkentették. Ekkor született meg a PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – növényi növekedést serkentő rizobaktérium) kifejezés is (Kloepper és mtsai 1980). Napjainkban azokat a baktériumokat illetik ezzel az elnevezéssel, amelyek legalább két kritériumnak megfelelnek az alábbiakból: intenzív gyökérkolonizációra képesek, stimulálják a növényi növekedést, és biokontroll hatásuk van (Habig és mtsai 2015, Pathania és mtsai 2020). A mezőgazdaságban alkalmazott baktériumok hatásai sokrétűek lehetnek (2. ábra).



2. ábra A növényi növekedést serkentő rizobaktériumok hatásai (Pathania és mtsai 2020 alapján)

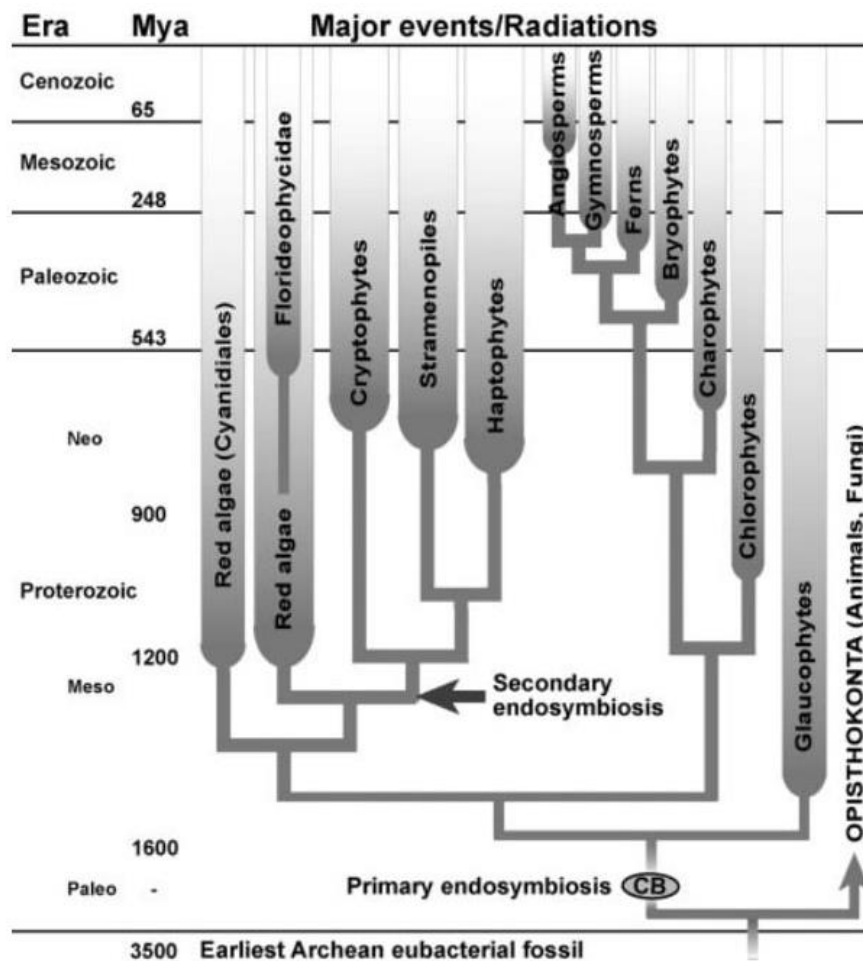
A baktériumok mellett gombákat is elterjedten használnak a mezőgazdasági biotechnológiában. A szimbiota mikorrhiza kapcsolatokat az edényes növények és a gombák között már a 19. században felismerték (Koide és Mosse 2004), azonban sikeres oltást először csak 1953-ban hajtottak végre szamócán (Mosse 1953). A baktériumokhoz hasonlóan a gombák növényekre gyakorolt hatásai is sokrétűek lehetnek:

1. *Biokontroll hatás:* a növényi kórokozók elleni antagonista szerepet is képesek egyes fajok betölteni számos különböző mechanizmus révén, például metabolitok termelésével (antibiotikumok, illékony vegyületek, enzimek), versengéssel (térért, szénforrásokért, nitrogénért és egyéb ásványi anyagokért), parazitizmussal, a növény szisztémás ellenálló képességének kiváltásával (Baron és Rigobelo 2022). Bioinszekticid hatással rendelkezik például a *Metarhizium anisopliae* valamint a *Beauveria bassiana*, fungicid hatása pedig egyes *Trichoderma* fajoknak van (Dauda és Zarafi 2019).
2. *Növekedésserkentő hatás:* növényi hormonokat is képesek kiválasztani (gibberellineket, citokinineket, abszcizinsavat, és indolecetsavat) mellyel képesek a növények növekedését elősegíteni (Turbat és mtsai 2020). Ezzel együtt indirekt módon képesek javítani a növények abiotikus stresszel szembeni ellenálló képességét is, ilyenek lehetnek például a *Glomus* fajok.
3. *Javítják a növények tápanyagellátását:* az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok számos extracelluláris enzimet és vegyületet termelnek, például sziderofórokat, lakkázokat, és foszfát mobilizátorokat (Hagh-Doust és mtsai 2022).

A baktériumok és a gombák mellett a mikroszkópikus algák is egyre fontosabb szerepet foglalnak el az mezőgazdasági biotechnológiában.

1.1.3. *Mikroalgák és biotechnológiai alkalmazhatóságuk története*

Az oxigéntermelő fotoautotróf mikroorganizmusok („mikroalgák”) filogenetikailag és morfológiailag is rendkívül heterogén csoportot alkotnak. A csoportba tartozó pro- és eukarióta szervezetek (pl. cianobaktériumok és különböző alगतörzsek) lehetnek egysejtűek, fonalas szervezésűek vagy telepeseek. A fotoszintézisre képes eukarióták endoszimbiózis során alakultak ki (3. ábra), amikor egy heterotróf eukarióta gazdasejt bekebelezett egy cianobaktériumot, amely aztán stabilan integrálódott, és végül szintestté alakult (Leliaert és mtsai 2012). Ez az elsődleges endoszimbiózis, amely feltehetően 1–1,5 milliárd évvel ezelőtt történt, és a következő alga csoportok kialakulásához vezetett: Chlorophyta, Rhodophyta, valamint Glaucocystophyta (Björn és Govindjee 2009; Yoon és mtsai 2004). A másodlagos és harmadlagos endoszimbiózist követően további taxonómiai egységek jelentek meg: eterokontophyta, Haptophyta, Euglenophyta, Dinoflagellates, Apicomplexans, Chlorarachniophyta és Cryptophyta (Bhattacharya és Medlin 1998). A cianobaktériumokat („blue green algae”- kékmoszatok, kékalgák) a klasszikus rendszertani megközelítések sokáig az algák közé sorolták, azonban a 20. század második felében egyértelművé vált, hogy a baktériumokhoz tartoznak (Stanier és Van Niel 1962). Ennek ellenére a tudományos szakirodalomban a mai napig használatos a „kékalga” elnevezés, és számos rangos folyóiratban is így hivatkoznak rájuk (Setthamongkol és mtsai 2023; Nozaki és mtsai 2024; Selvaraj és Arivazhagan 2025). Ezért dolgozatomban én is az algák közé sorolom a cianobaktériumokat is.



3. ábra A vörös, zöld, glaukofita és színesmoszatok evolúciós kapcsolatait és divergenciaidejét bemutató sematikus ábra (Forrás: Björn és Govindjee (2009))

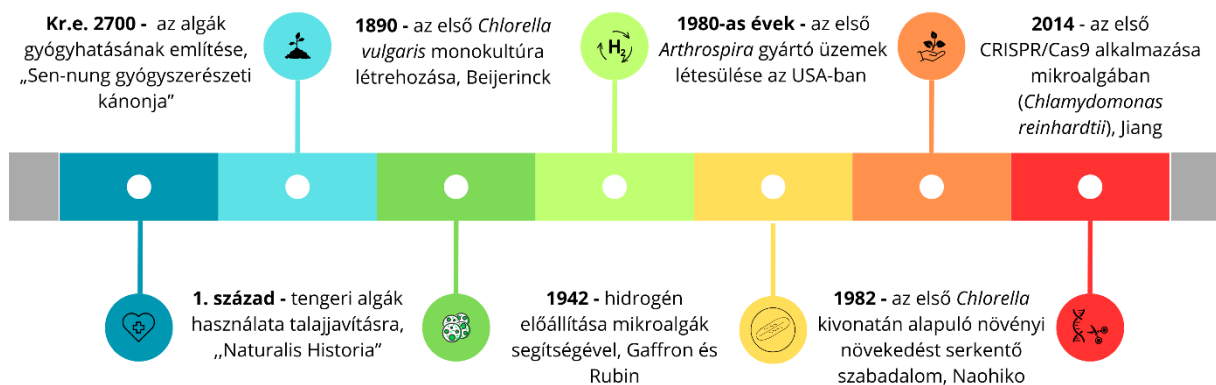
Mind a prokarióta, mind az eukarióta mikroalgák képesek alkalmazkodni a legkülönbözőbb környezeti feltételekhez, ami sejtösszetételük nagyfokú változatosságát eredményezi. Evolúciójuk során a mikroalgák számos édesvízi és tengeri élőhely mellett szinte valamennyi szárazföldi biotópot is meghódították, beleértve a sivatagokat, a sarkvidékeket és a magashegységeket is (Grams és mtsai 2022). Ezek az élőhelyek sokféle ökoszisztéma szolgáltatást nyújtanak, amelyek jelentősen hozzájárulnak az emberi jóléthez (B-Béres és mtsai 2023; Lengyel és mtsai 2023; Naselli-Flores és Padisák 2023) és az ökológiai sokféleséghez.

A mikroalgák előnyös tulajdonságait az emberiség már elég korán felismerte, amelynek legkorábbi bizonyítéka a Kr.e. 2700 körül íródott „Sen-nung gyógyszerészeti kánonja”, amiben már van említés az algák gyógyhatásairól (Oncel és mtsai 2015). A rómaiak és egyiptomiak elsősorban kozmetikumként alkalmazták az algákat, míg az ázsiai kultúrákban főként

táplálékként fogyasztották őket, ugyanakkor gyógyászati tulajdonságaikat is hasznosították (Hoppe 1979). A tengeri algák talajjavító hatása már az ókori rómaiak előtt sem volt ismeretlen, de van angol és skót példa is használatukra – előbbi az 1., utóbbi a 7. századból (Monagail és mtsai 2017).

A 19. század végén hozták létre az első *Chlorella vulgaris* mikroalga monokultúrát (Beijerinck 1890), amit modell organizmusként használtak a fotoszintézis és a növényi fiziológia megértéséhez (Grobelaar 2012). A mikroalgák iránti érdeklődés a második világháborúban megélné, amikor felismerték a tenyészetek magas lipidtartalmában lévő lehetőségeket, és felmerült alkalmazhatóságuk üzemanyag előállítására (Borowitzka 2013). A második világháborút követően az algákkal kapcsolatos kutatások elsősorban a szennyvíztisztításban való alkalmazásukra, valamint élelmiszerként történő hasznosításuk lehetőségeire irányult (Paddock 2019). Számos nagy léptékű algagyártásra alkalmas üzem létesítettek szerte a világon, így pl. Stanford Kutatóintézetben (USA), Essenben (Németország), vagy Tokióban (Japán) (Goldman 1979). 1942-ben bemutatták, hogy lehetséges hidrogént is előállítani mikroalgák segítségével (Gaffron és Rubin 1942). Kezdetben csak *Chlorella* tenyészetekkel dolgoztak, de az ötvenes évektől egyre több fajjal kezdtek el foglalkozni: *Scenedesmus*, *Coelastrum*, *Spirulina*, *Porphyridium*, *Haematococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Phaeodactylum* (Oncel és mtsai 2015). Kifejezetten *Arthrospira* algát gyártó üzemeket is létesítettek az 1980-as évek elején, először az USA-ban, majd Thaiföldön és Kínában is (Borowitzka 2013). Az *Arthrospira* mellett kereskedelmileg fontos mikroalga faj lett a β -karotin tartalmú *Dunaliella salina*, valamint a magas asztaxantin tartalmú *Haematococcus pluvialis* is (Leu és Boussiba 2014).

A kutatók idővel felismerték az algák mezőgazdasági hasznosításában rejlő lehetőségeket is. 1982-ben Japánban jelent meg az első szabadalom, ami leírta a *Chlorella* mikroalga kivonatának növényi növekedést serkentő hatását (Naohiko 1982). Az 1980-as években még két szabadalmat nyújtottak be az algák növényekre gyakorolt előnyös hatásaival kapcsolatban, majd ezt követően 2014-ig további szabadalom került bejegyzésre (Murata és mtsai 2021). Amerikai kutatók 2014-ben sikerrel alkalmazták a CRISPR/Cas9 rendszert *Chlamydomonas reinhardtii* génmódosítására (Jiang és mtsai 2014), melyet azóta más algákon is sikerrel alkalmaznak például, *Phaeodactylum tricorutum*, *Chlorella sorokiniana* (Tran és mtsai 2025). A felsorolt eredmények a 4. ábrán kerültek összefoglalásra.



4. ábra Mikroalgák alkalmazhatóságával kapcsolatos főbb tudományos eredmények

2015-től robbanásszerűen megnőtt a mikroalgákkal kapcsolatos benyújtott szabadalmak száma, elsősorban a növekedés-serkentés, biotrágya, rezisztencia-indukció, biokontroll hatás, gyomirtó hatás, betakarítást követő kezelés területén (Murata és mtsai 2021). Ebben az időszakban – a szabadalmakéhoz hasonlóan – a publikációk száma is növekedésnek indult. Ferreira (2023) tanulmányában 347 olyan tudományos cikket említ, amelyek az algák mezőgazdasági alkalmazásával foglalkozik a 2001 és 2022 közötti időszakban. Ezekben a közleményekben az algák különböző hatásait vizsgálták, amelyek három nagyobb területre fókuszálnak (Ferreira és mtsai 2023):

1) 164 cikk vizsgálta az algákat, mint potenciális biostimulánsokat. Általánosságban biostimulánsoknak nevezzük az „olyan anyagokat és/vagy mikroorganizmusokat tartalmazó készítményeket, amelyeknek az a funkciójuk, hogy a növényekre vagy a rizoszférába kijuttatva természetes folyamatokat serkentsenek, ezáltal fokozzák a tápanyagfelvételt, a tápanyag-hasznosítás hatékonyságát, a nem élettani (abiotikus) stresszel szembeni toleranciát és/vagy a termés minőségét – függetlenül azok tápanyagtartalmától” (Ben Mrid és mtsai 2021).

2) Biotrágyaként való alkalmazhatóságukkal 157 cikk foglalkozott. Bio-trágyáknak „olyan biológiai készítmények tekinthetők, amelyek mikroorganizmusokat – például algákat, gombákat vagy baktériumokat – vagy ezekből származó természetes vegyületeket tartalmaznak, és a talaj szintjén fejtik ki hatásukat. Ezek a termékek elősegítik a

növénynövekedést és javítják a talaj termékenységét azáltal, hogy növelik az alapvető tápanyagok – köztük a makro- és mikroelemek – elérhetőségét, valamint javítják a talaj fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságait” (Ferreira és mtsai 2023).

3) További 30 cikk vizsgálta biokontroll-szerként az algákat. Alapvetően a biokontroll „élő szervezetek (beleértve a vírusokat is) felhasználását jelenti kórokozók, kártevők és gyomnövények elleni küzdelemre, az emberi jólét szolgálatában” (Stenberg és mtsai 2021).

Az 1. táblázat néhány példát mutat be az egyes algafajok a mezőgazdasági alkalmazására vonatkozóan (Garcia-Gonzalez és Sommerfeld 2016; Renuka és mtsai 2018; Righini és Roberti 2019; Dineshkumar és mtsai 2019; Chamizo és mtsai 2019; Alvarez és mtsai 2021; Mishra és mtsai 2022; Ferreira és mtsai 2023 nyomán).

1. táblázat Mikroalgák hasznosítása különböző mezőgazdasági célokra. A fajok leíróját és az új taxonómiai neveit az 1. melléklet tartalmazza

<i>Funkció</i>	<i>Alga</i>
N ₂ kötés	<i>Anabaena</i> sp., <i>A. azotica</i> , <i>Azolla pinnata</i> ., <i>Nostoc</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp.
Fungicid hatás	<i>Anabaena laxa</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Chlorella fusca</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>Ecklonia maxima</i> , <i>Gracilaria edulis</i> , <i>Nostoc muscorum</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Sargassum latifolium</i> , <i>Scenedesmus</i> sp.
Inszekticid hatás	<i>Anabaena flos aquae</i> , <i>Nostoc carneum</i> , <i>Parachlorella kessleri</i>
Antibakteriális hatás	<i>Amphora</i> sp., <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Anabaena variabilis</i> , <i>Tetraselmis chui</i> , <i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Arthrospira platensis</i>
Nematocid hatás	<i>Amphora coffeaeformis</i> , <i>Oscillatoria chlorina</i> , <i>Microcoleus vaginatus</i>
Növényi növekedést serkentő hatás	<i>Anabaena variabilis</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>Scenedesmus acutus</i> , <i>S. rubescens</i>
Talajjavítás	<i>Anabaena</i> spp., <i>Chlorella</i> sp., <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Phormidium ambiguum</i> , <i>Scytonema javanicum</i>
Tápanyagfelvétel elősegítése	<i>Anabaena</i> spp., <i>Arthrospira platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. variabilis</i> , <i>Neochloris conjuncta</i> , <i>Nostoc</i> sp. <i>Scenedesmus obliquus</i>
Növények abiotikus stressz ellenálló képességének javítása	<i>Arthrospira platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Euglena gracilis</i> , <i>Nostoc muscorum</i>
Biotrágyázás	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Acutodesmus dimorphus</i>

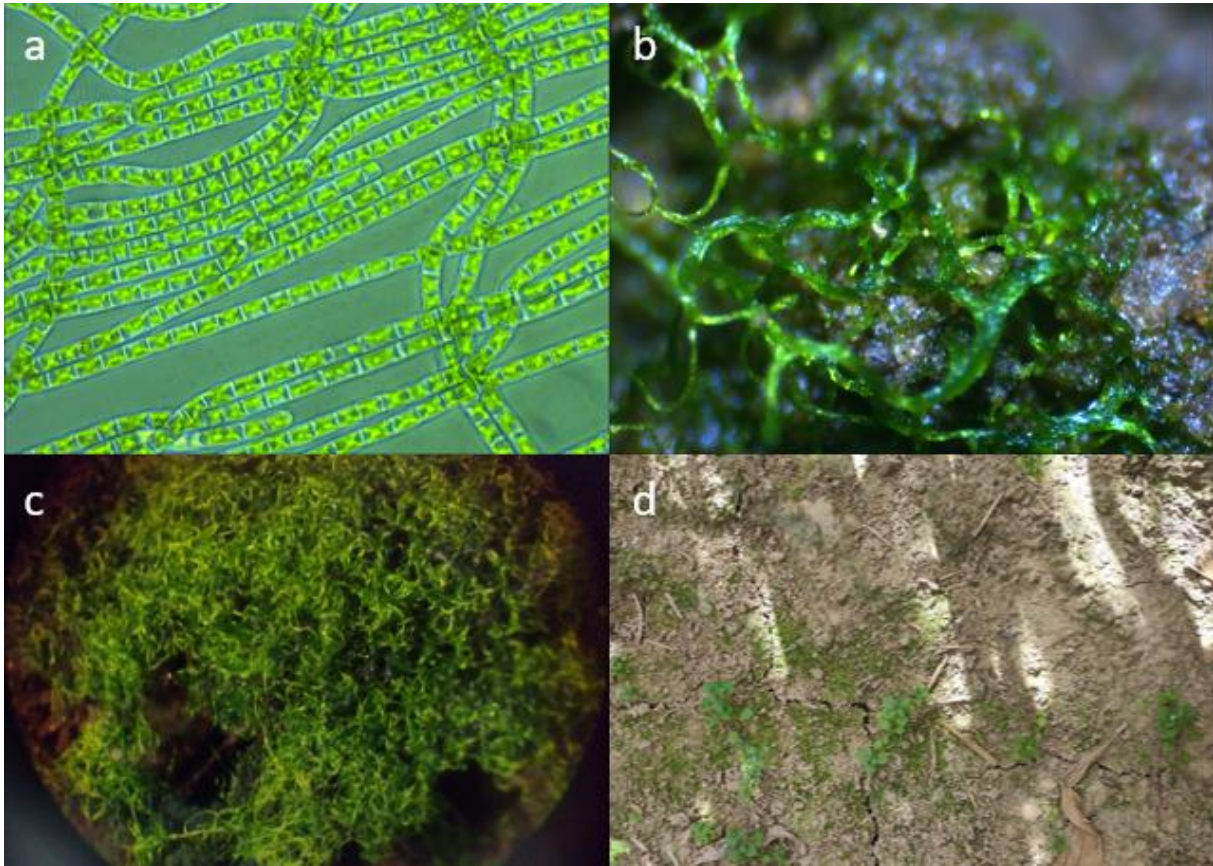
A természetben olyan algák is előfordulnak, amelyek komplex hatással rendelkeznek; ilyenek például a BSC-t (Biological Soil Crust - biológiai talajkéreg) alkotó mikroalgák. A biológiai talajkéreg olyan szorosan együtt élő mikroorganizmusokból álló közösségek, amelyek a talaj felső rétegében található. E közösségek tagjai közé tartoznak az algák, cianobaktériumok, gombák, zuzmók és mohák. Jellemzően száraz éghajlatú területeken alakulnak ki, ahol a makrofita növényborítás alacsony (Belnap és mtsai 2016). A biológiai réteg az ökológiai funkciói a talajjavítás és a talajvízgazdálkodásának javítása mellett, kiterjednek a talajfelszínen élő mikroszervezetre is (Rodríguez-Caballero és mtsai 2018).

Habár a BSC-t alkotó algák összetétele élőhelytől függően eltérő, jellemzően az alábbi nemzetségek alkotják: *Chroococcus*, *Microcoleus*, *Stichococcus*, *Gloeocapsa*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Palmelloccoccus*, *Chlorella*, *Interfilum*, és *Klebsormidium* (Zhang és mtsai 2009; Lababpour 2016; Glaser és mtsai 2018; Joseph és Ray 2024).

1.1.4. A *Klebsormidium* nemzetség

A *Klebsormidium* nemzetség a Streptophyta alországba, a Charophyta törzsbe, a Klebsormidiophyceae osztályba, a Klebsormidiales rendbe és a Klebsormidiaceae családba tartozik (Guiry és Guiry 2025). A mikroalgák között a *Klebsormidium* nemzetség viszonylag kevés fajt foglal magában (23 taxon és négy variáns; Guiry és Guiry, 2025). A *Klebsormidium* nevet Silva és munkatársai javasolták 1972-ben annak érdekében, hogy egyértelműen megkülönböztessék a szakirodalomban korábban tévesen elterjedt *Hormidium*-tól (Rindi és mtsai 2008).

A *Klebsormidium* fajok morfológiájáról elmondható, hogy egysoros fonalakat alkotnak (5. ábra), amelyek nem tartalmaznak elkülönült vagy specializálódott sejteket (Sluiman és Guihal 2008). Sejtjeik henger alakúak, átmérőjük 4 és 23 μm között változhatnak (von Berg és mtsai 2012). Minden sejt egy oldalfali kloroplasztiszt tartalmaz, amely egy pirenoidot foglal magában, ami a sejt fal felétől a háromnegyedéig terjedhet. A sejtek szaporodása kétostoros, aszimmetrikus, stigma nélküli zoospórák útján történik, amelyek egyesével képződnek a nem specializált sejtekben, és egy póruson keresztül távoznak (Rindi és mtsai 2011). A természetben viselkedése, a sejtek átmérője, a kloroplasztisz alakja, a fonalak hossza, a „H” alakú elemek jelenléte, a fonalak szétesési hajlama, sejt fal szerkezete, a zoospórák csírázási típusa, valamint az üres zoosporangiumok alakja mind fajra jellemző bélyegek (Škaloud 2006; von Berg és mtsai 2012).



5. ábra *Klebsormidium* fénymikroszkópos (400× nagyítás, a) és sztereomikroszkópos képei (80×, illetve 40× nagyítás, b-c), valamint bevonatként talaj felszínén (d) (Forrás: saját forrás)

A *Klebsormidium* nemzetség fajai hideg és meleg éghajlatú területeken egyaránt előfordulnak. Ritkán vízi élőhelyeken is megtalálhatók, de főként szárazföldi ökoszisztémákat részesítik előnyben (Smith és mtsai 2004; Rindi és mtsai 2011; Kaplan és mtsai 2012; Glaser és mtsai 2017; Donner és mtsai 2017). A nemzetség számos képviselője generalista életmódot folytat (Borchhardt és Gründling-Pfaff 2020), ugyanakkor léteznek olyan vonalak is, amelyek olyannyira specializálódtak élőhelyükhöz, hogy más környezetben nem életképesek (Škaloud és Rindi 2013; Škaloud és mtsai 2014). Fontos kiemelni, hogy a jelenleg rendelkezésre álló adatok döntő többsége vízi, illetve szárazföldi élőhelyekről származó *Klebsormidium* izolátumokra vonatkozik, miközben a barlangi eredetű törzsekről eddig nem álltak rendelkezésre vizsgálati eredmények.

A talajban élő *Klebsormidium* fajok különleges ökológiai jelentőséggel bírnak, mivel fontos szerepet játszanak a korábban már említett BSC kialakításában (Smith és mtsai 2004; Kitzing és Karsten 2015; Belnap és Büdel 2016; Samolov és mtsai 2019). Ezért ezen

mikroalgák tenyészetének alkalmazása környezetbarát megoldást jelenthet az erózióknak kitett területek megóvására, valamint a sivatagosodó területek rehabilitációjára.

Emellett a *Klebsormidium* fajok jelentős endogén brasszinoszteroid (BR) tartalommal rendelkeznek, ami megalapozza mezőgazdasági biostimulánsként való potenciális alkalmazásukat, valamint akár tesztorganizmusként is szolgálhatnak BR biotesztekben (Stirk és mtsai 2013a). A brasszinoszteroidok polihidroxiszteroid szerkezetű növényi hormonok, amelyek számos hatással bírnak a növények növekedésére és fejlődésére, valamint szerepet játszanak a biotikus és abiotikus stresszel szembeni védekezésben is (Hayat és mtsai 2011; Stirk és mtsai 2013a; Nguyen és mtsai 2020), főként más növényi hormonokkal való kölcsönhatás révén (Krishna 2003; Oklestkova és mtsai 2015).

A *Klebsormidium* nemzetség biotechnológiai alkalmazásában rejlő lehetőségekre több kutatás is rámutatott. Mezőgazdasági céllal bioherbicidként (Nunes és Melo 2025), szennyvíztisztításra (Occhipinti és mtsai 2025; Liu és mtsai 2016), arany nanorészecskék előállítására (Dahoumane és mtsai 2012), állati takarmány adalékként (Fang és mtsai 2022), bioremediációra (Oberholster és mtsai 2014) is vizsgálták alkalmazhatóságukat.

2. Barlangból izolált *Klebsormidium* törzs ökofiziológiai vizsgálata

2.1 Bevezetés

A *Klebsormidium* fajok mezőgazdasági alkalmazás szempontjából nagy potenciállal rendelkeznek elsősorban a BSC alkotó funkciójuk, valamint a magas endogén fitohormon, például a brassinoszteroid tartalmuk miatt (Stirk és mtsai 2013a). A biológiailag legaktívabb brassinoszteroid a brassinolid (brassinolide - BL) ($C_{28}H_{48}O_6$, (22R,23R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxi-6,7-seco-5 α -kampeztán-6,7-lakton) amely ötször erősebb biológiai aktivitással rendelkezik, mint a bioszintézisének köztes terméke, a kasztaszteron (Fujioka és mtsai 1995). A mikroalgák brassinoszteroid-szintjét különféle abiotikus stresszhatások befolyásolják (Stirk és mtsai 2018; Stirk és van Staden 2020).

A fitohormon-termelés mellett a talajfelszín kolonizációját, valamint a BSC-k kialakulását is számos abiotikus és biotikus tényező jelentősen befolyásolja (pl. trofikus stratégia, talajnedvesség, a talaj tápanyag- és kémiai összetétele, hőmérséklet, sugárzás, pH, CO₂-koncentráció, stb.; Lepossa 2003; Chen és mtsai 2017; Choi és mtsai 2017; Piotrowska-Niczyporuk és mtsai 2018; Stirk és mtsai 2018; Beigbeder és Lavoie 2022). Ezek közül a fényintenzitás és a hőmérséklet számítanak a *Klebsormidium* fajok ökotípus-szelekciójának fő környezeti tényezőinek (Karsten és mtsai 2017; Míguez és mtsai 2020). Fontos megjegyezni, hogy az eddig rendelkezésre álló adatok túlnyomó része vízi és jól megvilágított szárazföldi élőhelyekről származó *Klebsormidium* izolátumoktól származik, míg barlangi eredetű törzsekre vonatkozóan eddig nem álltak rendelkezésre adatok.

Jelen értekezés egyik fő célja egy eddig nem vizsgált *Klebsormidium* törzs ökológiai és biotechnológiai szempontból történő jellemzése. Ennek érdekében részletesen vizsgáltuk egy barlangból izolált törzs növekedési dinamikáját és fotoszintetikus aktivitását különböző hőmérsékleteken. A szakirodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy az adott törzs (1) széles hőmérsékleti tartományban képes hatékonyan növekedni, de az optimális hőmérséklete inkább az alacsonyabb tartományba esik; (2) alacsony fényintenzitásokat részesít előnyben, ezért erősebb megvilágítás mellett fotoinhibíció jelentkezik; (3) a BR-tartalom a hőmérséklettel függvényében változik.

2.2 Anyagok és módszerek

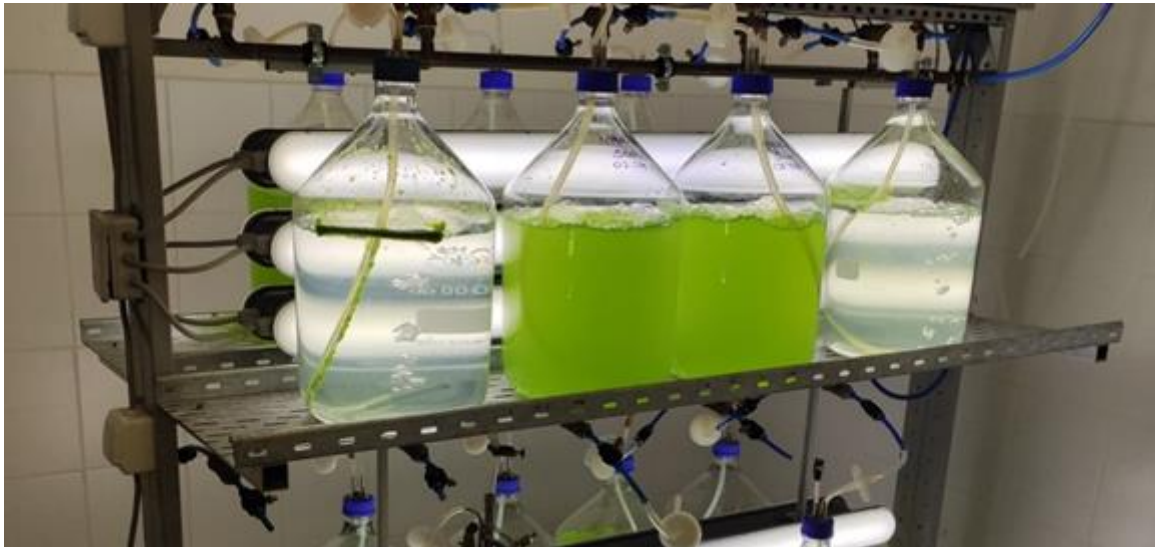
2.2.1 Izolálás és algatenyésztési körülmények

A vizsgált alga törzset tartalmazó biofilmet egy észak-magyarországi barlang faláról gyűjtöttük be (GPS-koordináták: 47.90067, 20.37917). A barlang faláról steril spatulával lekapart biofilmet steril kémcsőben szállítottuk a laboratóriumba, majd szélesztéses eljárással axenikus algatenyészetet hoztunk létre. A tenyészetet módosított BBM tápközegben (Bold's Basal Medium, Starr és Zeikus 1993, 2. melléklet) tartottuk fenn $20 \pm 2^\circ\text{C}$ -on, $35 \mu\text{mol foton m}^2 \text{s}^{-1}$ fényintenzitás (36 W meleg fehér fényű Polylux fénycső [Tungsram, Magyarország]) mellett fénypolcon (5. ábra).



6. ábra *Klebsormidium* tenyészetek fenntartása fénypolcon (Forrás: saját forrás)

A kísérletekhez szükséges algabiomasszát levegőztetett fotobioreaktorokban (8 liter; 0,3 vvm) állítottuk elő (7. ábra). A tenyésztés hét napon át tartott, 22°C -on, $20 \mu\text{mol foton m}^2/\text{s}$ fotoszintetikusan aktív sugárzás (PAR) mellett, amihez a fényt 36 W-os, természetes fehér LED csövek (V-TAC, Magyarország) szolgáltatták.



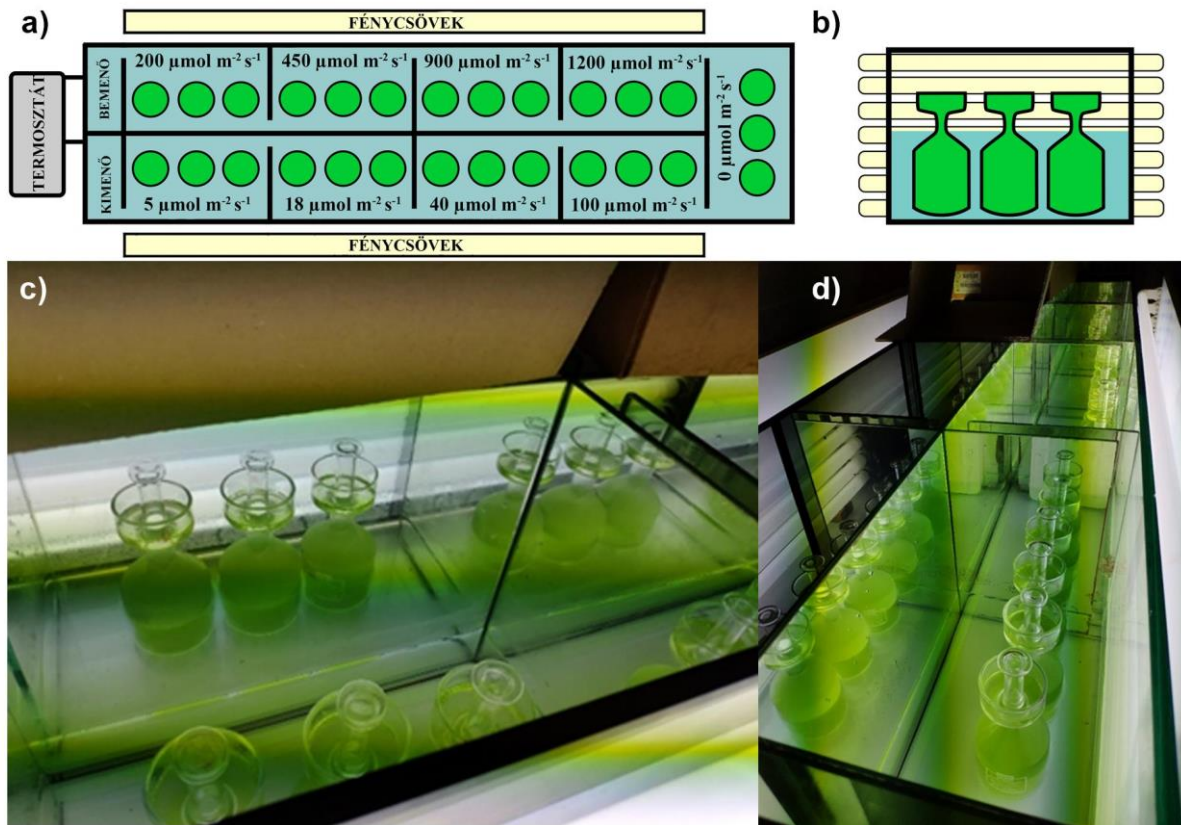
7. ábra Algatenyésztés levegőztetett reaktorokban 8 liter térfogatban, a két szélső bioreaktorban *Klebsormidium* tenyészet. Levegőztetés hatására a biomassza a folyadékfelszínen koncentrálnodik tenyésztés során (Forrás: saját forrás)

2.2.2 Az algatörzs azonosítása - DNS-szekvencia elemzés

A törzsből származó teljes genomi DNS-t DNeasy Plant Mini kit-tel (Qiagen, Németország) vontuk ki. Az 18S rRNS gén és a riboszomális ITS régió (amely tartalmazza az ITS-1, az 5.8S rRNS gén, az ITS-2, valamint a 28S rRNS gén egy rövid szakaszát) PCR-amplifikációját és szekvenálását az Euk328f és Chlo02R primerekkel (Moon-Van der Staay és mtsai, 2000; Zhu és mtsai, 2005), illetve az ITS_f és ITS_r primerekkel (Liu és mtsai, 2014) végeztük, a Somogyi és mtsai (2013), valamint Greipel és mtsai (2023) által leírt protokollok alapján. Az így kapott szekvenciákat a GenBank adatbázisban helyeztük el az alábbi hozzáférési kódok alatt: OR794009 (18S) és OR807367 (ITS). A szekvenciák BLAST-alapú hasonlósági vizsgálatát a GenBank adatbázis (Sayers és mtsai, 2022) felhasználásával végeztük. Az 18S rRNS gén esetében a szekvenciaigazítást a SINA Alignment Service (Pruesse és mtsai, 2012) segítségével végeztük el, míg az ITS régió igazításához a ClustalW algoritmust használtuk, amely a MEGA 11 szoftverben (Tamura és mtsai, 2021) található. A maximális valószínűségi (maximum likelihood) elemzést, beleértve a legjobb illeszkedési modell keresését, szintén a MEGA 11 szoftver segítségével végeztük el. A törzsfák rekonstrukciója a következő adatkészletek és modellparaméterek alapján történt: 817 nukleotidpozíció és K2 modell a 18S rRNS génhez, illetve 757 nukleotidpozíció és K2P+G modell az ITS régióhoz. Az 50 feletti bootstrap értékek a csomópontoknál kerültek feltüntetésre (500 ismétlés alapján).

2.2.3 Oxigénhozam mérések

A kísérleteket egy 9-cellás fotoszintetronban végeztük (Üveges és mtsai, 2011; 8. ábra). Ebben az inkubációs rendszerben 56 W-os természetes fényű fénycsövek (Tungsram, Magyarország) biztosították a mérés során használt különböző intenzitású PAR megvilágítást (0—5—18—40—100—200—450—900—1200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fényintenzitások meghatározására egy LI-1400 (LI-COR, USA) fénymérőt alkalmaztunk, amelyhez egy US-SQSL-1 (Walz, Németország) gömb alakú (4π) mikroszenzort (szenzorfej átmérője: 3,7 mm) csatlakoztattunk. A cellák egymással összeköttetésben álltak lehetővé téve a víz áramlását. A cirkuláló víz állandó hőmérsékletét egy Neslab RTE-211 termosztát segítségével állítottuk be és tartottuk fenn. A kísérlet során homogenizált algatenyészetet töltöttünk 250 mL térfogatú Karlsruhe-lombikokba, amelyekből hármat helyeztünk a fotoszintetron minden egyes cellájába ($n=3$). A tenyészeteket egy órán keresztül teljes sötétségben előinkubáltuk, majd az oldott oxigén mennyiségét minden lombikban egy LDO szenzorral (HQ-20, Hach Lange, Németország) mértük meg. Az oldott oxigén kezdeti koncentrációjának meghatározását követően a lombikokat visszahelyeztük a fotoszintetron megfelelő celláiba, majd egy órán át megvilágítottuk őket. Ezután az oldott oxigén koncentrációkat ismételtelen megmértük. Ezeket a méréseket minden vizsgált hőmérsékleten (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 és 50°C) elvégeztük, mindig újra homogenizált algakultúrákat használva. Emellett minden alkalommal az algaminták klorofill-*a* tartalmát spektrofotometrius módszerrel határoztuk meg, dimetilszulfoxiddal (DMSO) történő extrakciót követően (Caesar és mtsai, 2018). Ismert mennyiségű tenyészetet leszűrtük üvegszál szűrőpapíron (Macherey-Nagel GF-5 - 45 mm), majd 10 mL DMSO-ot tartalmazó kémcsőbe helyeztük. A mintákat ezután vízfürdőben (Grant Instruments GD100, Egyesült Királyság) melegítettük 65°C-on 90 percen keresztül. Az inkubációt követően leszűrtük redős szűrőpapíron a mintákat, majd spektrofotométer (Dynamica Halo RB-10, Egyesült Királyság) segítségével három hullámhosszon lemértük az abszorbanciát (665, 700 és 750 nm).



8. *ábra* A fotoszintetron rendszer sematikus illusztrációja felül- (a) és oldalnézetből (b), valamint képek a rendszerről (c,d) (Forrás: saját forrás)

A fotoszintetikus és respirációs rátákat biomassa-specifikusan számítottuk ki Wetzel és Likens (2000) módszere szerint. Az így kapott fotoszintézis-fény görbék (Photosynthesis -Irradiance Curves - PI görbék) közül a telítési görbéket a Webb és mtsai (1974), míg ahol telítési fénygátlás volt megfigyelhető ott az Eilers és Peeters (1988) által leírt modellel illesztettük, amelyekből a fotoszintetikus paramétereket – mint a fényhasznosítási tényezőt (α), a fényadaptációs paramétert (I_k) és a maximális fotoszintetikus rátát (P_{max}) – határoztuk meg.

2.2.4 Fotoszintetikus aktivitás meghatározása klorofill-fluoreszcencia mérésekkel

Az oxigén tartalom mérésével egyidejűleg a *Klebsormidium* tenyészetek fotoszintetikus paramétereit klorofill-fluoreszcencia alapú módszerrel is meghatároztuk. Ennél a vizsgálatnál is az alga kultúrákat homogenizálást követően Karlsruhe-lombikokba töltöttük, majd minden vizsgált hőmérsékleten (5-50°C) 1 órán át sötétben inkubáltuk. Ezt követő mérések során gyors fénygörbéket (RLC) és fluoreszcencia indukciós görbéket rögzítettünk DUAL-PAM-100 mérőműszerrel (Heinz Walz GmbH, Németország) (9. ábra).



9. ábra A fotoszintézis mérésekhez használt DUAL-PAM-100 mérőműszer (Forrás: saját forrás)

Az RLC-k esetében lépcsőzetesen növeltük az aktinikus fényintenzitásokat 11-től 830 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ megvilágításig (logaritmikus növekedéssel, 11 fényintenzitási lépésben), minden lépésnél 30 másodperces akklimációs idővel. Az indukciós görbéket 131 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aktinikus fényintenzitás mellett vettük fel. Mindkét esetben 600 ms időtartamú, 10,000 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ intenzitású telítő fényimpulzusokat (SP) alkalmaztunk. A fotoszintézis kulcsparamétereit a méréshez használt berendezés szoftverének SP-elemzésével határoztuk meg 131 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aktinikus fényintenzitás mellett. Az RLC-k segítségével különböző fényintenzitások mellett meghatároztuk a II. fotokémiai rendszer (PSII) által közvetített relatív elektrontranszport rátákat (rETR). Az SP-elemzés alapján kiszámítottuk a fotokémiai kioltást (qP) és a nem-fotokémiai kioltást (qN) az indukciós görbék adataiból. A fényhasznosítási tényezőt (α) és a fényadaptációs paramétert (I_k) a PI görbék kezdeti lineáris szakaszának meredekségéből határoztuk meg.

2.2.5 Növekedési ráták meghatározása

A *Klebsormidium* növekedési rátáit a következő hőmérsékleteken vizsgáltuk: 10, 15, 20, 25, 30, 35 és 40°C. A kísérletet egy Binder KBWF-720 típusú tenyésztőkamrában (Németország) állítottuk be, 150 mL térfogatú batch tenyészetekkel (n=4). A tenyészeteket négy napon át vizsgáltuk, miközben naponta egyszer manuálisan felkevertük őket. Hideg fehér fénycsövek

(Narva Colorlux plus T8-865 LT 30W Cool White, Osram, Németország) biztosították a megvilátást $85 \mu\text{mol foton m}^2 \text{s}^{-1}$ intenzitással, 12:12 órás fény/sötét ciklusban. A tenyészetek optikai denzitását 750 nm-en (OD_{750}) naponta mértük Hitachi U2900 UV-Vis kétutas spektrofotométerrel (Japán), standard 1 cm-es kvarc küvettákban. A specifikus növekedési rátákat (μ) Krzemińska és mtsai (2014) módszere alapján számoltuk ki.

2.2.6 Brasszinolid meghatározás

Az LC-MS analízishez 600 mL mintát szűrtünk át Whatman GF/F szűrőn. A szűrlet szilárd fázisú extrakcióját (Solid-Phase Extraction, SPE) egy AutoTrace 280 készülékkel (Thermo Scientific), polimer gyenge kationcserélő kazetták (StrataTM-X-CW, 200 mg, 6 cm³; Phenomenex, USA) felhasználásával végeztük. A kazetták mosásához és a BR-ok eluálásához Maász és mtsai (2019) protokollját alkalmaztuk. Végül minden mintát 0,5 mL tiszta acetonitrilben (ACN) reszuszpendáltuk, majd borostyánszínű üvegfiolákban 4°C-on tároltunk az HPLC-MS analízisig. A brasszinolid (brassinolide - BL) standard-ból (Sigma Aldrich) LC-MS minőségű metanol felhasználásával $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, amelyből a következő kalibrációs sorozatot állítottuk elő: 5, 10, 100, 500 és 1000 ng L^{-1} . A kromatográfiás analízist Agilent HPLC rendszerrel (Agilent) végeztük, amelyhez Phenomenex Kinetex Polar C18 fordított fázisú HPLC oszlopot ($50 \times 4,6 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$ részecskeméret és 100 \AA pórusméret) alkalmaztunk. A gyenge mobil fázis (A eluens) 0,1% hangyasavat és 10 mM ammónium-formiátot tartalmazó vizes oldat volt, míg az erős oldószernek (B eluens) ACN-alapú oldatot használtunk. A mintából $25 \mu\text{L}$ -t injektáltunk az oszlopba, majd a következő gradiens szerint eluáltuk a B eluens alkalmazásával: 5% 2 percig, 60% 3 percig, 100% 5 percig, végül ismét 5% 3 percig. A BL detektálását Bruker amaZon SL ioncsapda tömegspektrométerrel (Bruker, Németország) végeztük. A 300°C hőmérsékletű szárítógáz áramlási sebességét 10 L perc^{-1} -re állítottuk a meghatározás során. A kapilláris feszültség és a porlasztógáz nyomása 5000 V, illetve 3,8 bar volt. A mérések ESI+ módban történtek. Az MS/MS szkennelést $0,4 \text{ m/z}$ felbontással végeztük a BL azonosítására, a 315,56 és 479,68 m/z értékek alapján, amelyek a fragment és a prekursor ionokhoz tartoznak. Az adatok kiértékelését és elemzését a Bruker Compass DataAnalysis 4.4 SR1 modul segítségével végeztük.

2.2.7 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéseket az R statisztikai szoftverrel (4.2.1 verzió, R Core Team, 2021) végeztük a ‘vegan’ (Oksanen és mtsai 2022) és az ‘nlme’ csomagok (Pinheiro és mtsai 2022) felhasználásával. A statisztikai elemzés során Welch-tesztet alkalmaztunk (1) a fotoszintetikus oxigéntermelés és a légzési oxigénfogyasztás arányának (P:R) becsült értékeinek, valamint 2)

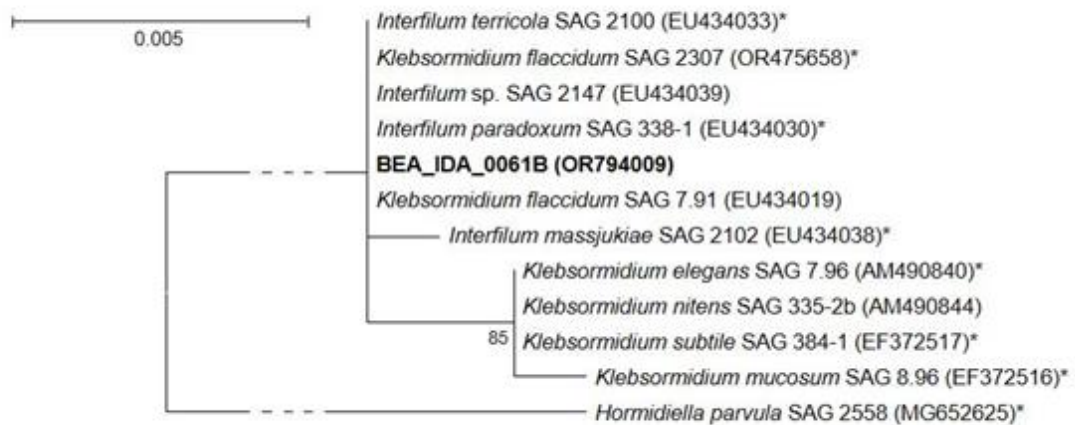
a különböző hőmérsékleten nevelt algatenyészetek brasszinolid tartalmának összehasonlításához. Lineáris regressziós modellekkel vizsgáltuk a fotoszintetikus paraméterek (α , I_k , qN , qP) kapcsolatát a hőmérséklettel.

2.3 Eredmények

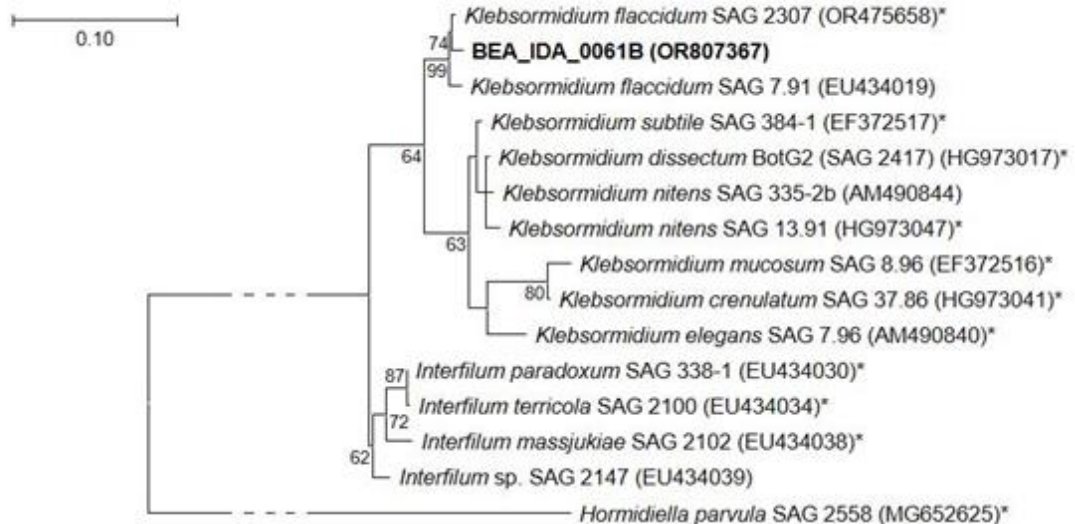
2.3.1 A *Klebsormidium* törzs taxonómiai azonosítása

A részleges 18S rRNS génszekvencia elemzése alapján a BEA_IDA_0061B törzs megkülönböztethetetlen volt (100%-os páros szekvencia hasonlóság intronok kizárásával) az autentikus *Klebsormidium flaccidum* SAG 2307, *Interfilum paradoxum* SAG 338–1 és az *Interfilum terricola* SAG 2100 törzsektől. Az ITS régió vizsgálata alapján azonban az új törzs 98,1–99,3%-os szekvencia hasonlóságot mutatott más *Klebsormidium flaccidum* törzsekkel (beleértve az autentikus SAG 2307-et is), míg kevesebb, mint 95,4%-os hasonlóságot más *Klebsormidium* és *Interfilum* fajokkal. Az új törzs taxonómiai azonosítását, mint *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) P.C.Silva, Mattox & W.H. Blackwell, a filogenetikai elemzés is alátámasztotta (10. ábra).

18S rRNA gene



ITS region



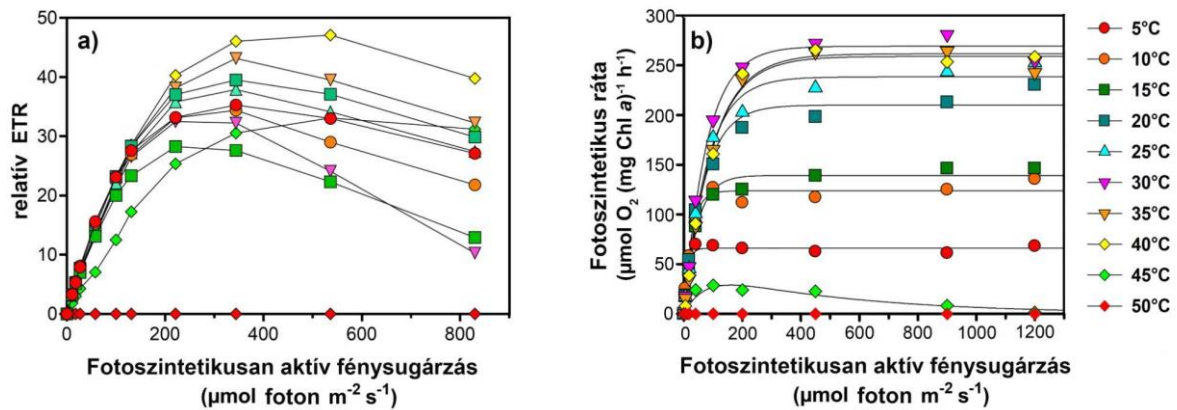
10. ábra A vizsgált fonalas zöldalga törzs (félkövérrel) 18S rRNS gén és az ITS régió maximum likelihood törzsfái. A csillagok hiteles törzseket jelölnek

2.3.2 Fotoszintetikus teljesítmény hőmérsékletfüggése

2.3.2.1 Fotoszintézis-megvilágítás görbék

Kétféle PI görbét rögzítettünk: az egyik az oxigénfejlődést, míg a másik a relatív elektrontranszport rátát (rETR) ábrázolta a fényintenzitás függvényében. Az utóbbi megközelítés alapján minden PI görbe hasonló mintázatot mutatott az 5–45°C között vizsgált hőmérsékleteken: egy kezdeti lineáris (fénylimitált szakasz) után minden görbe elérte a maximumát (fotoszintézis-korlátozott fázis) a növekvő fényintenzitással, amelyet egy látszólagos csökkenés követett (11a. ábra). A PI görbék főbb paraméterei: a kezdeti meredekség (fényhasznosítási tényező, α), az rETR maximális értéke (rETR_{max}), és a minimális fénytelítési

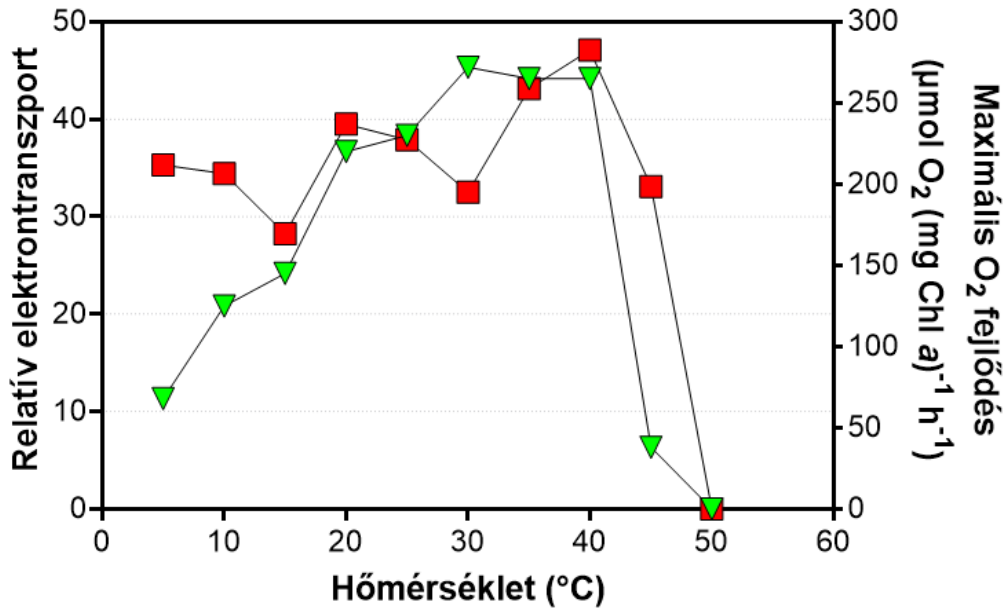
intenzitás (= fényadaptációs paraméter, I_k). Az oxigénhozam méréseken alapuló PI görbék alakja némileg eltérő: egyszerű telítődési görbét mutattak egy kezdeti fénylimitált szakasszal, valamint egy fotoszintézis-korlátozott maximummal, kivéve a 45°C-on rögzített görbét, amely magas fényintenzitásoknál fotoinhibíciót is mutatott (11b. ábra). 50°C-on egyik módszerrel sem figyeltünk meg fotoszintetikus aktivitást. A relatív szórás egyik esetben sem érte el a 10%-ot.



11. ábra *A Klebsormidium PI görbái különböző hőmérsékleteken. (a) rETR vs. fényintenzitás görbék, (b) oxigénfejlődés vs. fényintenzitás görbék ($n = 3$; az átlagértékek feltüntetve)*

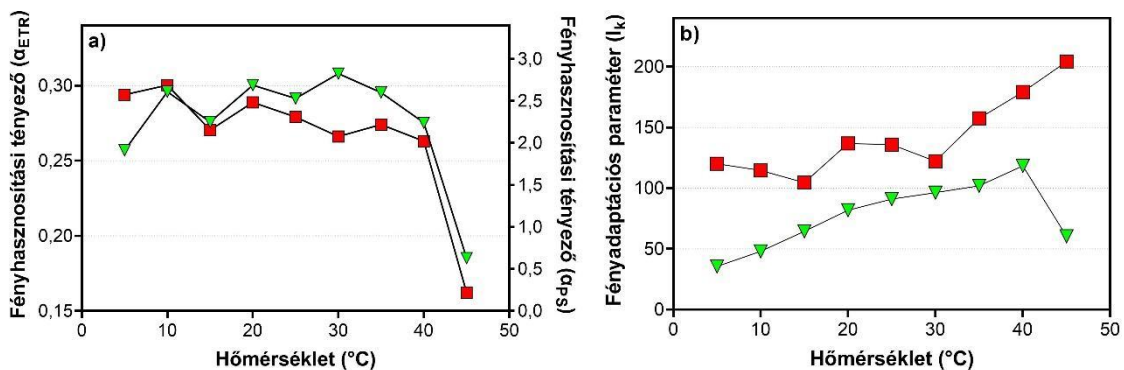
2.3.2.2 Származtatott fotoszintetikus paraméterek

Az $rETR_{\text{max}}$ és a maximális oxigénfejlődési ráták (P_{max}) nagymértékben függtek a hőmérséklettől (12. ábra). Mindkét paraméter fokozatosan növekedett, amíg el nem érte a maximumát 35–40°C-nál ($rETR_{\text{max}}$) és 30–40°C-nál (P_{max}). Az előbbi paraméterhez tartozó érték 47 (relatív egységek) volt, míg az utóbbihoz 272 $\mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl } a)^{-1} \text{h}^{-1}$. 40°C felett mindkét paraméter éles csökkenést mutatott, és 50°C-nál már nem volt mérhető aktivitás, ami összhangban van a PI görbékkel.



12. ábra Az rETR (piros négyzetek) és a maximális oxigénfejlődés (P_{max} , zöld háromszögek) hőmérsékletfüggése. Az értékek a 16. ábrából származnak ($n = 3$; az átlagértékek vannak feltüntetve)

A klorofill-fluoreszcencia és az oxigéntermelés mérésekből származó fényhasznosítási tényezők (α_{ETR} és α_{PS}) értékei nagyon hasonló hőmérsékletfüggést mutattak: 5 és 40°C között nem változtak számottevően (a lineáris regresszió alapján $p > 0,05$), majd ezen a hőmérsékleten túl számottevő csökkenést mutattak (13a. ábra).

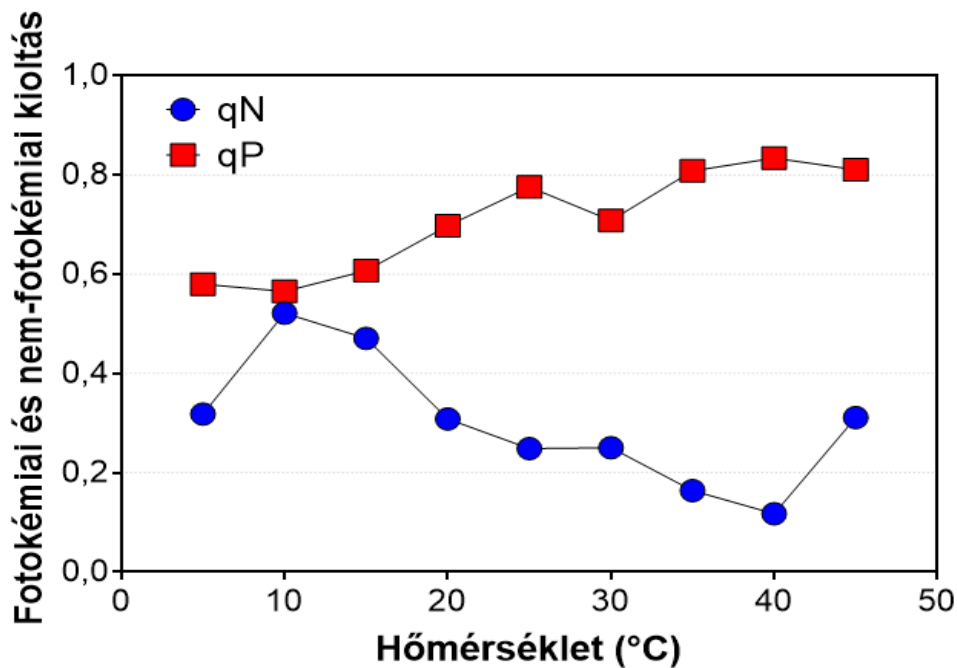


13. ábra A fényhasznosítási tényező (α , a) és a fényadaptációs paraméter (I_k , b) hőmérsékletfüggése a vizsgált *Klebsormidium* törzs esetében, az oxigénfejlődés és a fényintenzitás (zöld háromszögek), valamint az rETR és a fényintenzitás közötti görbék (piros négyzetek) alapján ($n = 3$; az átlagértékek vannak feltüntetve, a szórás kevesebb mint 10%)

Ezzel szemben a klorofill-fluoreszcencia és az oxigénhozam I_k értékei lassú növekedést mutattak egészen 45°C-ig, illetve 40°C-ig (lineáris regresszió $p < 0,001$; 13b. ábra). Az

oxigénhozam mérésekkel kapott I_k értékek 40°C felett csökkenést mutattak, szemben a klorofill-fluoreszcencia mérésekkel, ahol további növekedés volt megfigyelhető. Bár a tendencia mindkét esetben hasonló volt, a konkrét fényadaptációs paraméterek eltértek egymástól: az rETR vs. fényintenzitás esetében $104\text{--}204 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, oxigénfejlődés vs. fényintenzitás esetében pedig $36\text{--}118 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ között változtak.

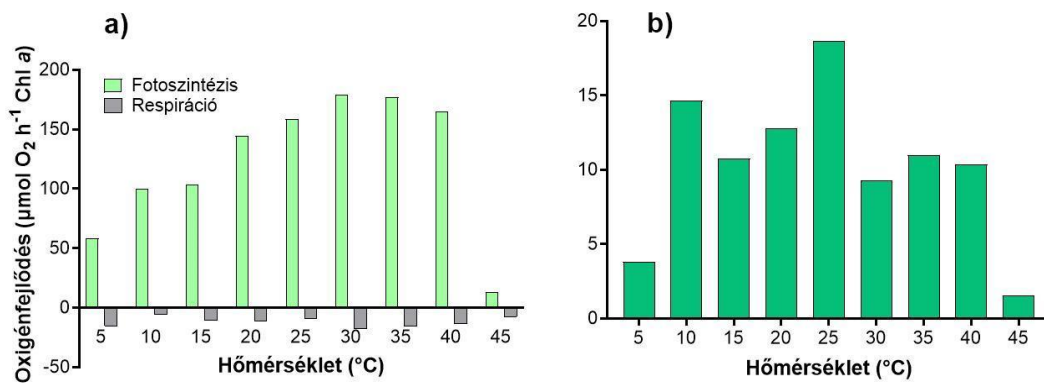
A fotokémiai kioltás (qP) $0,565$ és $0,834$ között változott, és növekvő hőmérséklettel emelkedő tendenciát mutatott (14. ábra). A szórás értékek 10% alatt maradtak. A legmagasabb értékeket 35 és 45°C között figyeltük meg, amely összhangban volt az rETR és az oxigénhozam mérésekkel. Ezzel párhuzamosan a nem-fotokémiai kioltás (qN) végig alacsonyabb volt, mint a qP (tartomány: $0,117$ és $0,522$) és csökkenő tendenciát mutatott a hőmérséklet növekedésével (14. ábra).



14. ábra A *Klebsormidium* tenyészetek fotokémiai (qP) és nem-fotokémiai kioltásának (qN) hőmérsékletfüggése. A qP és qN értékeket fluoreszcencia-indukciós görbék alapján határoztuk meg, $131 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aktinikus fényintenzitás mellett ($n = 3$, az átlagértékek vannak feltüntetve)

Az oxigénhozam méréseknél nemcsak a megvilágítás hatásaként fellépő nettó oxigénfejlődést (a mért oxigénfejlődés és a respiráció különbsége), hanem az oxigénfogyasztást (respirációt) is meghatároztuk. Az oxigénfejlődés és a légzési oxigénfogyasztás hőmérséklettől való függését a 15a. ábra mutatja be. A nettó oxigénfejlődés átlaga (a 8 érték átlaga az oxigénfejlődés vs. fényintenzitás PI görbékről, 17b. ábra) és a légzési oxigénfogyasztás 13 és

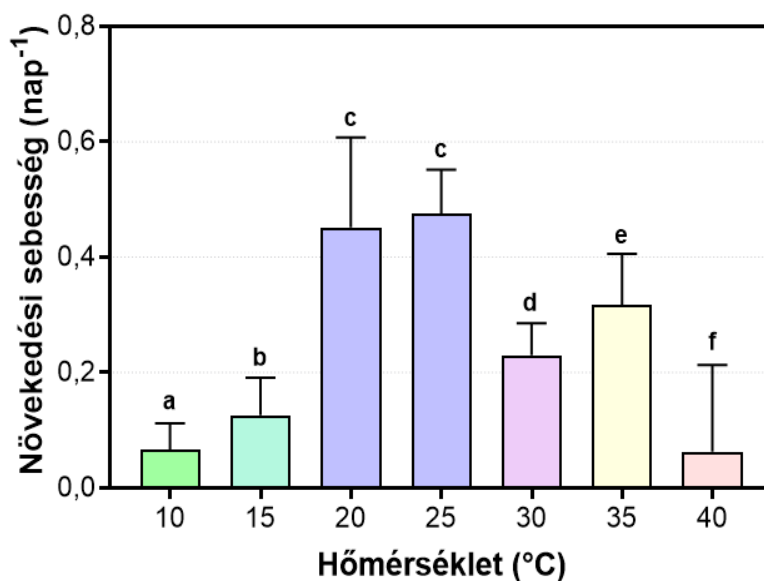
179 $\mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl } a)^{-1} \text{ h}^{-1}$, valamint -18 és -6 $\mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl } a)^{-1} \text{ h}^{-1}$ között változott (15a. ábra). Nemcsak e két paraméter önmagában, hanem azok aránya erős hőmérsékletfüggést mutatott (15b. ábra): értéke 1,54 és 18,67 között változott 25°C-os maximummal, és 5°C-os (3,81) ill. 45°C-os (1,54) minimumokkal.



15. ábra A fotoszintetikus oxigéntermelés és a respirációs oxigénfogyasztás hőmérsékletfüggése (a), valamint ezek aránya (P:R, b)

2.3.3 A tenyészetek növekedési sebességének hőmérsékletfüggése

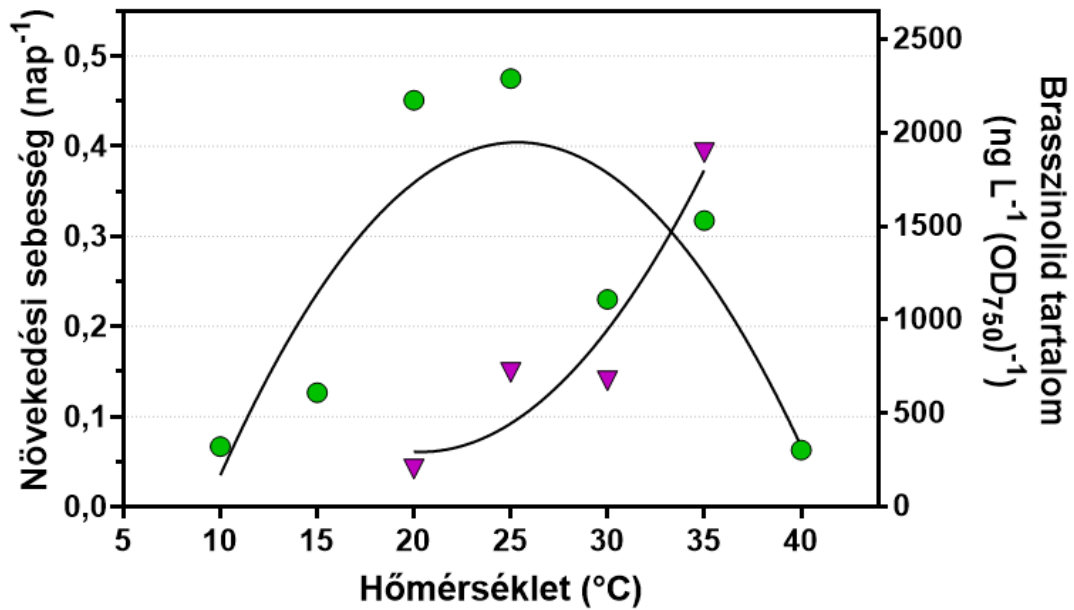
A *Klebsormidium* tenyészetek specifikus növekedési sebességeit (μ) szintén meghatároztuk a 10°C és 40°C közötti hőmérséklet tartományban. Az alga minden vizsgált hőmérsékleten képes volt növekedni (16. ábra), azonban nagyon eltérő sebességgel. A specifikus növekedési sebességei 20 és 25°C-on voltak a legmagasabbak ($0,451 \pm 0,013$ és $0,475 \pm 0,011 \text{ nap}^{-1}$), mely értékek statisztikailag nem különböztek egymástól (Welch-teszt, $p > 0,05$). 25 °C felett a növekedés jelentősen lelassult, bár még mindig számottevő maradt 30 és 35°C-on is. Ezzel szemben a tenyészetek növekedése 10, 15 és 40°C-on nagyon lassú volt ($0,067 \pm 0,016$, $0,126 \pm 0,012$ és $0,063 \text{ nap}^{-1}$).



16. ábra *Klebsormidium* tenyészetek specifikus növekedési sebessége (μ) a hőmérséklet függvényében

2.3.4 A különböző hőmérsékleten tenyésztett *Klebsormidium* tenyészetek brasszínolid tartalma

A *Klebsormidium* tenyészetek BL tartalmát 20 és 35°C közötti hőmérsékleti tartományban határoztuk meg (azaz azon a hőmérsékleti tartományon, ahol jelentősen magas növekedési sebességeket figyeltünk meg), majd a megfelelő tenyészetek biomasszájára (OD₇₅₀) normáltuk. A BL tartalom 202 és 1892 ng L⁻¹ között változott, kevesebb, mint 10%-os szórással, és erős összefüggést mutatott hőmérséklettel a Welch-teszt alapján: 20°C-on alacsony volt, 25 és 30°C-on mérsékelten magas, míg 35°C-on nagyon magas (17. ábra).



17. ábra A *Klebsormidium* fajlagos specifikus növekedési sebességének (zöld körök) és átlagos brasszinolid tartalmának (lila háromszögek) hőmérsékletfüggése. A fajlagos növekedési sebesség értékeinek illesztéséhez lognormális függvényt ($r^2 = 0,72$), míg az átlagos brasszinolid-tartalom értékeihez másodfokú polinomiális függvényt használtunk ($r^2 = 0,89$)

2.4 Diszkusszió

A *Klebsormidium* nemzetség tagjai számos potenciális biotechnológiai alkalmazással rendelkeznek, ezért vizsgálatuk kiemelt jelentőségű. Ugyanakkor fontos szempont, hogy az eltérő élőhelyekhez való alkalmazkodás igen jelentős fajok közötti, sőt fajon belüli ökológiai és fiziológiai különbségeket eredményezhet. Munkánk egy kevésbé kutatott, barlangi környezetből izolált *Klebsormidium* törzs vizsgálatára összpontosított. Bár *Klebsormidium* fajokat már korábban is izoláltak barlangi élőhelyről (Popović és mtsai, 2023), ezek mélyreható ökológiai és fiziológiai jellemzése mindeddig elmaradt. Ennek a hiánynak a pótlása érdekében egy barlangi eredetű *Klebsormidium* törzs ökológiai tulajdonságait vizsgáltuk a hőmérséklet és a fény, mint fő változók függvényében. A vizsgált ökotípus generalista stratégiát képvisel, amelyet a széles hőmérsékleti és fénytűrési tartomány jellemez. Ökológiai szempontból átfedéseket mutatott más *Klebsormidium* törzsekkel, amelyeket poláris, szárazföldi, vízi, sivatagi és alpesi környezetekből izoláltak.

2.4.1 Fényigény

A fény, amely energiát biztosít a fotoszintézis folyamataihoz, alapvető környezeti tényező minden fotoautotróf organizmus számára. A rendelkezésre álló fény intenzitása és minősége

alapvetően meghatározza ezen fajok elterjedését (Krebs, 2009). A jelen kutatásban vizsgált törzs egy alacsony fényintenzitású élőhelyről, egy turisztikailag hasznosított barlang lámpaflórájából került izolálásra. A fotoszintetizáló mikroorganizmusok ilyen fénylimitált körülményekre megemelkedett pigmenttermeléssel, a fotorendszerek abundanciájával és/vagy a fénybegyűjtő antenna-komplexek méretének növelésével akklimatizálódnak (Masojídek és mtsai, 2013). Az alacsony fényintenzitáshoz alkalmazkodott fotoautotróf organizmusok fotoszintetikus aktivitása (pl. elektron-transzport sebesség, oxigéntermelés) általában gyorsan növekszik a fényintenzitás növelésével, és viszonylag alacsony fényintenzitásnál éri el a maximális értéket (17. ábra).

A vizsgált *Klebsormidium* törzs alacsony fényintenzitáshoz való alkalmazkodását eredményeink is igazolták, nevezetesen a magas fényhasznosítási tényezők (α) és az alacsony fényadaptációs paraméterek (I_k) (19a. ábra). Az α értékei látszólag függetlenek voltak a hőmérséklettől 5 és 40°C között, ami a legtöbb eukarióta algafajra jellemző tulajdonság (Davison 1991); e hőmérsékleti tartomány felett azonban meredek csökkenést figyeltünk meg. Ezzel szemben az I_k értékek szignifikánsan növekedtek a hőmérséklettel, bár 45°C-on az oxigénhozam-módszer esetében jelentős visszaesés mutatkozott. Mind az α , mind az I_k értékei összhangban állnak irodalmi eredményekkel, amelyeket magashegyi szárazföldi és édesvízi élőhelyekről izolált *Klebsormidium* esetében kaptak (Karsten és mtsai, 2017; Pierangelini és mtsai, 2017). A szárazföldi *Klebsormidium* izolátumok fényhasznosítási tényezője alacsonyabb, míg fényadaptációs paramétere sokkal magasabb volt a vizsgált, barlangi környezetből izolált törzshöz képest (Karsten és mtsai, 2017). Ezzel szemben ellentétes tendenciák — azaz magasabb α és alacsonyabb I_k — figyeltek meg bányaterületekről izolált *Klebsormidium dissectum* (F. Gay) H. Ettl & G. Gärtner törzs, az ausztriai Ötztal-Alpokból, valamint városi falakról származó izolátumok esetében (Karsten és Rindi 2010; Karsten és Holzinger 2012; Pierangelini és mtsai, 2017).

A felvett PI görbék hasonló mintázatokat mutatnak a szakirodalomban leírtakkal (Karsten és Holzinger 2012; Pierangelini és mtsai, 2017). A klorofill-fluoreszcencia mérésekkel kapott PI görbék a tenyészet gyors fotoszintetikus válaszát („rapid light curves”) tükrözik a fokozatosan növekvő fényintenzitásokra (30 másodperces lépések), míg az oxigénhozam-mérések a fényhez való alkalmazkodást egy valamivel szélesebb időskálán (1 óra időtartam) vizsgálják. Ez utóbbi időtartam elegendően hosszú ahhoz, hogy magas fényintenzitásoknál fotoinhibíciót indukáljon. Ugyanakkor fotoinhibíciót csak 45°C-on figyeltünk meg (17b. ábra), még hozzá olyan algatenyészetek esetében, amelyek nagyon alacsony P:R aránnyal rendelkeztek. Ez a megfigyelés a vizsgált algatörzs széles hőmérsékleti toleranciájára utal.

2.4.2 Hőmérsékleti igények

A hőmérséklet fotoszintézisre gyakorolt hatása rendkívül összetett (Berry és Bjorkman, 1980; Allakhverdiev és mtsai, 2008; Yamamoto és mtsai, 2008). Például az enzimek által katalizált biokémiai reakciók exponenciális kapcsolatot mutatnak a hőmérséklettel, amely a magas hőmérsékleten bekövetkező reverzibilis vagy irreverzibilis enzim-deaktivációs folyamatokkal (azaz konformációs változásokkal és lebomlással) együtt meghatározza az adott szervezet optimális hőmérsékletét. A jelenlegi tudományos konszenzus szerint algák/növények esetében a hőkárosodás elsődleges célpontjai a PSII regenerációs rendszere, a szénmegkötés és az ATP-termelés (Allakhverdiev és mtsai, 2008).

Magas hőmérsékleten bekövetkező másodlagos vagy közvetett hatásokról is beszámoltak, például a P:R arány csökkenéséről (Bulthuis és Woelkerling 1983; Marsh és mtsai, 1986; Raven és Geider 1988; Ralph 1998), a sejten belüli pH-változásokról (Beer és Waisel 1982; Beer és mtsai, 2006), a klorofill-fehérje komplexek denaturációjáról (Briantais és mtsai 1986), valamint a fotoszintetikus oxigénfejlődési komplex inaktivációjáról (Samson és mtsai 1999).

A hőmérséklet növekedésre gyakorolt hatása is igencsak összetett: a nem optimális hőmérsékleti tartományban való növekedés csökkenti a szén-, és nitrogénfelhasználás hatékonyságát (Juneja és mtsai 2013), lassítja a fehérjeszintézist (Rhee és Gotham 1981), befolyásolja az enzimaktivitást, módosítja a fehérjéket (Ras és mtsai 2013), valamint hatással van a sejtek biokémiai összetételére (Nakamura és Miyachi 1982).

A vizsgált barlangi eredetű *Klebsormidium* törzs mind a fotoszintézis (5–45 °C), mind a növekedési képesség (10–40 °C) szempontjából széles hőmérsékleti tartományban mutatott aktivitást. Ez az eredmény összhangban van a *Klebsormidium* nemzetség ubikvista elterjedésével, ami arra utal, hogy tagjai nagy valószínűséggel ökofiziológiai generalisták, azaz széles hőmérsékleti toleranciával rendelkeznek (Borchhardt és Gründling-Pfaff 2020).

A kísérleteink során alkalmazott különböző módszerek eltérő hőmérsékleti optimumokat eredményeztek, ami arra utalhat, hogy a vizsgálatok időtartama is kulcsfontosságú tényező lehet az optimumok meghatározásánál. A legrövidebb kezelési idővel az alkalmazott vizsgálati módszerek közül az rETR meghatározás során dolgoztunk (1 óras inkubáció), ami viszonylag kis eltéréseket eredményezett széles hőmérsékleti tartományon belül. Az oxigéntermelési mérések esetében az inkubációs idő hosszabb volt (2–3 óra), így lehetőséget adott néhány hosszabb távú szabályozási folyamat aktiválására, például a sejtek makromolekuláris összetételének megváltozására. Egyértelműen a növekedési kísérletek (amelyek néhány napig tartottak) szolgáltatták a legpontosabb hőmérsékleti optimumot, mivel

ezek nemcsak a fotoszintézis, hanem az összes sejtszintű folyamat hőmérsékletfüggését tükrözték. Ennek ellenére a törzs képes volt növekedésre széles hőmérsékleti tartományban, hasonlóan a korábban vizsgált *Klebsormidium* törzsekhez, beleértve mind a szárazföldi, mind egyes sarkvidéki populációkat is (Donner és mtsai 2017; Borchhardt és Gründling-Pfaff 2020).

Bár a hőmérséklet fotoszintézisre gyakorolt rövid távú hatásait gyakran használják a hosszú távú hőmérsékleti hatások indikátoraként, azok nem minden esetben szolgáltatnak megfelelő információt a növekedés hőmérsékleti optimumáról (Davison 1991). Például sarkvidéki fajok esetében a fotoszintézis optimális hőmérséklete jelentősen magasabbnak bizonyult, mint a környezeti vízhőmérséklet, és rendszerint meghaladta a növekedés optimális hőmérsékletét is (Healey 1972; Drew 1977). Ez a jelenség azt mutatja, hogy egy adott élettani folyamat – például a fotoszintézis – hőmérsékletfüggése nem feltétlenül esik egybe a növekedés hőmérsékletfüggésével, mivel a növekedést a hőmérséklet anyagcserére gyakorolt összetett hatása befolyásolja. Ez a paradoxon rámutat a hőmérsékleti hatások bonyolult természetére, amelyet jelen vizsgálati eredményeink is alátámasztanak.

A vizsgált barlangi *Klebsormidium* törzs növekedési tulajdonságai nagy hasonlóságot mutatnak a Közép-európai gyepekről és erdőkből izolált törzsekkel (Donner és mtsai 2017), valamint számos sarkvidéki *Klebsormidium* törzssel is (Borchhardt és Gründling-Pfaff 2020). Annak ellenére, hogy ezen élőhelyek meglehetősen eltérőek, hasonló növekedési mintázatok figyelhetők meg valamennyi esetben, ami ugyancsak alátámasztja a *Klebsormidium* nemzetség generalista természetét. A PI görbék tekintetében nagyfokú hasonlóságokat kaptunk több ökotípussal; szárazföldi (Pierangelini és mtsai 2017), vízi (Karsten és mtsai 2017), sivatagi (Karsten és mtsai 2016) és alpesi (Karsten és Holzinger 2011) élőhelyekről származó törzsekkel. Ugyanakkor a szárazföldi, hegyvidéki és sivatagi *Klebsormidium* izolátumok esetében a legmagasabb P:R arányokat 5–10 °C-on figyelték meg, míg a vizsgált barlangi törzs esetében ezek az értékek 10–25 °C között voltak a legmagasabbak. A vizsgált tenyészet fotoszintetikus oxigéntermelési rátája a sivatagi és alpesi *Klebsormidium* törzsekkel mutatott hasonlóságot, míg a csökkent légzés az alpesi törzsekhez álltak legközelebb. A legújabb modellek szerint a P:R arányok döntő szerepet játszhatnak a fotoautotróf mikroorganizmusok élőhelyi differenciálódásában (Masuda és mtsai 2023).

A fitohormonok fontos szerepet játszanak a növényeket és algákat érő különböző biotikus és abiotikus stresszhatások enyhítésében. A hipotézisünkkel összhangban a sejten belüli BR-tartalom ebben a *Klebsormidium* törzsben nagymértékben függött az alkalmazott hőmérséklettől; a legmagasabb értékeket hőmérsékleti stressz alatt mutatta (összhangban a megfelelő növekedési rátákkal). Ennek lehetséges magyarázata lehet, hogy a BR-ok képesek

módosítani a HSP (hősokkfehérje) transzkripciót és növelni az abszcizinsav szintjét, ami fokozott hőtoleranciát eredményezhet (Bajguz 2009; Bajguz és Hayat 2009; Ahanger és mtsai 2018).

3. Rizslevéllemez-elhajlási bioteszt kidolgozása *Klebsormidium* algatenyészetek brasszinoszteroid tartalmának meghatározására

3.1 Bevezetés

A növényi hormonok (fitohormonok) jelátvivő molekulák, amelyek többek között alapvető szerepet játszanak a növények növekedésének szabályozásában, valamint a környezeti stresszhatásokra adott válaszaikban (Kapoore és mtsai 2021). Kémiai sokféleség jellemzi ezeket a biomolekulákat; a növényfejlődésre gyakorolt (pozitív) hatásaik alapján a mezőgazdaságban biostimulánsként alkalmazzák őket a termésminőség javítására és a terméshozam növelésére (Dhaubhadel és mtsai 1999; Hayat és mtsai 2011; Vriet és mtsai 2012; Ali 2019). Napjainkban, amikor az ökológiailag fenntartható mezőgazdasági gyakorlatok iránti igény folyamatosan növekszik, a biostimulánsok jelentősége is egyre inkább felértékelődik.

A mikroalga tenyészeteket régóta alkalmazzák a mezőgazdaságban (Gonçalves 2021). A leggyakrabban használt biostimulánsként alkalmazott fajok közé tartozik az *Acutodesmus dimorphus*, *Calothrix elenkinii*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella infusionum*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Scenedesmus quadricauda* és *Spirulina maxima* (Ronga és mtsai 2019). Számos tanulmány számolt be a mikroalgás kultúrák növekedésserkentő hatásairól, különös tekintettel azok auxin-, citokinin- és gibberellin-tartalmára (Ördög és mtsai 2004; Jirásková és mtsai 2009; Hussain és mtsai 2010; Stirk és mtsai 2002, 2011, 2013b; Noble és mtsai 2014). Ezzel szemben lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésre a szteroid típusú növényi hormonok, az úgynevezett brasszinoszteroidok előfordulásáról (Yokota 1987; Stirk és mtsai 2013a, 2014, 2018).

A BR-ok számos növényi élettani folyamat – így a növekedés, fejlődés–szabályozásához elengedhetetlenek (Hayat és mtsai 2011, Hussain és mtsai 2020). Fontos szerepet töltenek be a növények biotikus és abiotikus stresszel szembeni ellenálló képességének javításában (Chakraborty és mtsai 2025). Ennek köszönhetően a mezőgazdaságban is kiemelt jelentőséggel bírnak. Az elsőként azonosított BR vegyületet repce (*Brassica napus*) pollenből vonták ki, innen ered az elnevezése is: brasszinozolid (Grove és mtsai 1979). A BR-ok jelenleg mintegy 70 különböző polihidroxi szteroid származékot foglalnak magukban (Oklestkova és mtsai 2015), amelyek közül a BL és a kasztaszteron (CS) gyakori a mikroalgákban is (Bajguz 2009; Bajguz és Piotrowska-Niczyporuk 2013; Stirk és mtsai 2013a; Kanwar és mtsai 2017). A két szteroid közül a BL nemcsak akár 60%-kal nagyobb koncentrációban van jelen

sejtszinten, hanem hozzávetőleg ötször nagyobb biológiai aktivitással is rendelkezik, mint a CS (lásd: Stirk és mtsai 2013a; Fujioka és mtsai 1995).

A *Klebsormidium flaccidum* kultúrák különösen magas BR-tartalommal rendelkeznek más mikroalga törzsekhez viszonyítva Stirk és munkatársai szerint (2013a). Ennek köszönhetően ez a mikroorganizmus potenciális biostimulánsnak és ipari méretű biotikus BR-termelésre alkalmas jelöltnek tekinthető.

A BR-tartalom meghatározása mikroalgás kultúrákban általában érzékeny bioanalitikai módszerekkel történik, mint például az ultra-nagy teljesítményű folyadékkromatográfia tandem tömegspektrometriával kombinálva (UHPLC-MS/MS) (Stirk és mtsai 2013a, 2014). Ugyanakkor a BR-ok biológiai aktivitásának meghatározására gyakran alkalmaznak bioteszteket is (Takatsuto és mtsai 1989; Joo és mtsai 2015; Roh és mtsai 2020).

A biotesztek fő előnye, hogy a bonyolult és költséges műszerparkot igénylő analitikai eljárásokhoz képest egyszerűbb és olcsóbb lehetőséget nyújtanak a fitohormonok mennyiségének becslésére. Különböző biotesztek léteznek a különböző növényi hormonok kimutatására; például az auxin- és citokinin-szerű aktivitás uborka szikleveél bioteszttel (Fletcher és mtsai 1982; Zhao és mtsai 1992), az abszcizinsav-tartalom búza koleoptil egyenes növekedési teszttel (Zhao és mtsai 1992), a BR-koncentráció bab második internódium (Mandava 1988) és rizslevéllemez-hajlás (RLIA – rice lamina inclination assay) segítségével mérhető (Han és mtsai 1997). Az RLIA a BR-ok kimutatására jelenleg a leggyakrabban használt biológiai teszt, mivel rendkívül specifikus és érzékeny (Soto és mtsai 2021). Mikroalgák BR tartalmának biotesztalapú meghatározására azonban eddig még nem került sor.

Jelen munkánk célja egy egyszerű és költséghatékony módszer kidolgozása volt a *Klebsormidium* kultúrákban található biológiailag aktív BR-ok hozzávetőleges mennyiségének becslésére drága analitikai eszközök használata nélkül. Ehhez a legelterjedtebb és legaktívabb BR vegyületet, a brassinolidot alkalmaztuk referencia anyagként, és az RLIA segítségével becsültük a *Klebsormidium* kultúrák teljes BR tartalmát. Az eredményeket UHPLC-MS/MS méréssel validáltuk.

3.2 Anyagok és módszerek

3.2.1 Rizsfajták

Három japán típusú rizsfajtát, az 'Arsenal', a 'Hoshinoyume' és az 'M 60' fajtákat választottunk ki a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (Szarvas, Magyarország) Öntözési és Vízgazdálkodási Kutatóközpontjának Rizs Génbankjából. Mindhárom fajta jól terem a

Magyarországon megszokott éghajlati körülmények között (Székely és mtsai, 2022b). A kiválasztott törzsek összehasonlítási alapként szolgáltak a széles körben használt 'Koshihikari' fajtához képest, amelyet szintén vizsgáltunk a kísérletekben. A 'Koshihikari' rövid szemű rizsfajta, amelyet 1956-ban nemesítettek ki (Ishizaki és mtsai 2005). 2016-ban a fajtát Japán rizstermő területének 36,2%-án termesztették (Kobayashi és mtsai 2018). Rövid tenyészidejű (Mimoto és mtsai 1989), érzékeny a rizs csíkos levélfoltosságát okozó vírusra, ugyanakkor mérsékelt ellenállóképességet mutat a bakteriális levélfoltossággal szemben (Kobayashi és mtsai 2018). Az olasz 'Arsenal' japán típusú rizsfajtát 2008-ban jegyezték be (Nghí és mtsai, 2021). Magyarországon közepesen hosszú tenyészidejű (140–144 nap). Ellenáll a barnarozsda betegségnek, de mérsékelt a hidegtűrése (Székely és mtsai, 2022a). A 'Hoshinoyume' fajtát Japánban jegyezték be 1996-ban (Shinbashi és mtsai, 2003). Ezt a fajtát az 'Akitakomachi'/'Douhoku48' és a 'Kirara397' keresztezéséből hozták létre. A fajta tenyészideje rövid (130–135 nap), jól tűri a hideget, de érzékeny a barnarozsda betegségre. Az 'M 60' fajtát Magyarországon jegyezték be 2002-ben. A 'Balilla' és a 'H9 mutáns' keresztezéséből származik. Rövid tenyészidejű (128–134 nap), közepes hidegtűrésű és ellenáll a barnarozsda betegségnek.

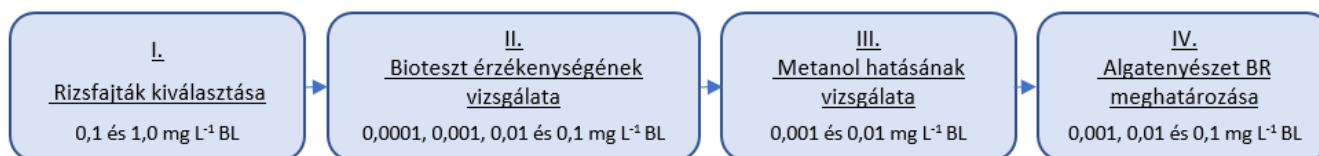
3.2.2 Rizslevéllemez-elhajlási bioteszt (RLIA)

Az előkészített minták BR tartalmának meghatározásához Han és munkatársai (1997) módszerét vettük alapul. A kísérletekben használt rizsmagokat először csapvízben áztattuk 48 órán át (18a. ábra), majd 1%-os desztillált vizes agar felületén sötétben, 30°C-on csíráztattuk. A 7 napos növények közül az azonos magasságúakat (kb. 6–8 cm) válogattuk ki. Ezek hajtáscsúcsaiból 4 cm hosszú darabokat metszettünk le, amelyek tartalmazták a második levéllemezt is. A levágott részeket desztillált vízben tartottuk 24 órán át és 30°C-on, majd a hasonló elhajlási szöggel rendelkezőkből (kb. 10°-20° dőlésszöggel) véletlenszerűen 10-10 darabot helyeztünk egy 20 mL ismert vagy ismeretlen BR tartalmú mintát tartalmazó Petri-csészébe (18b., 18c. ábra). Az inkubációs időszakot (30°C, sötét, 48 óra) követően meghatároztuk a második levéllemez és a szár közötti szöget (α) az ImageJ (Schneider és mtsai, 2012) nyílt forráskódú számítógépes szoftver segítségével (18d. ábra). A csíráztatás után minden műveletet (a mérés kivételével) halvány vörös fényben végeztünk, hogy elkerüljük a rizslevél nem kívánt elhajlását.



18. ábra A rizslevéllemez-elhajlási teszt lépései; csíráztatás (a), egyforma elhajlási szög kiválasztása (b), kezelés (c), szögmérés számítógépes szoftverrel (d) (forrás: saját)

A kísérletek során alkalmazott BL koncentrációkat a 19. ábrán foglaltam össze.

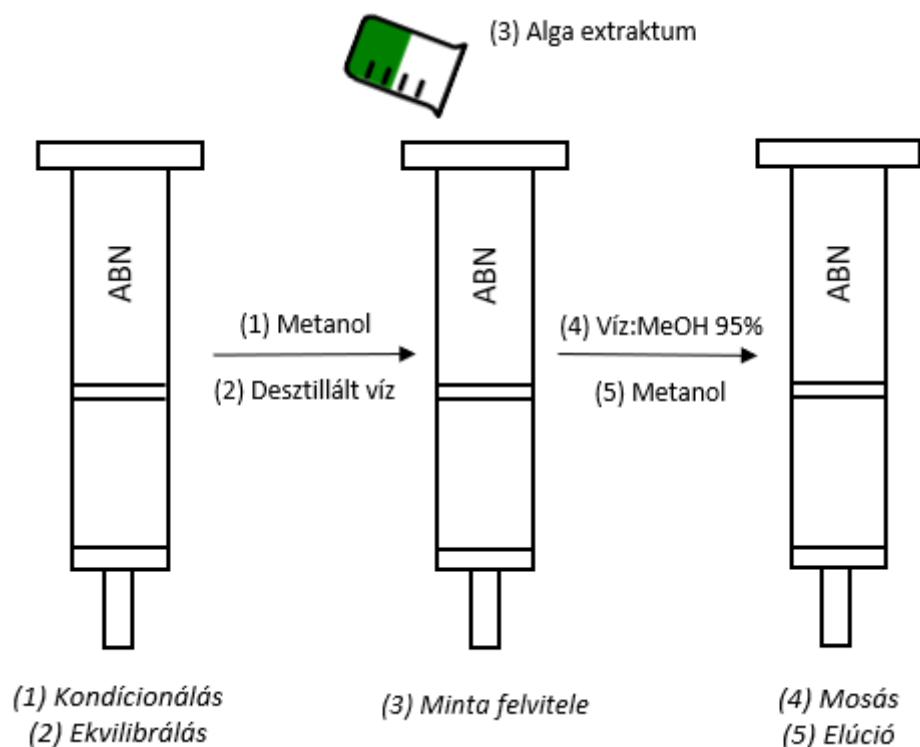


19. ábra A rizslevéllemez-elhajlási bioteszt kidolgozása során alkalmazott brassinolid (BL) koncentrációk

3.2.3 Mintaelőkészítés

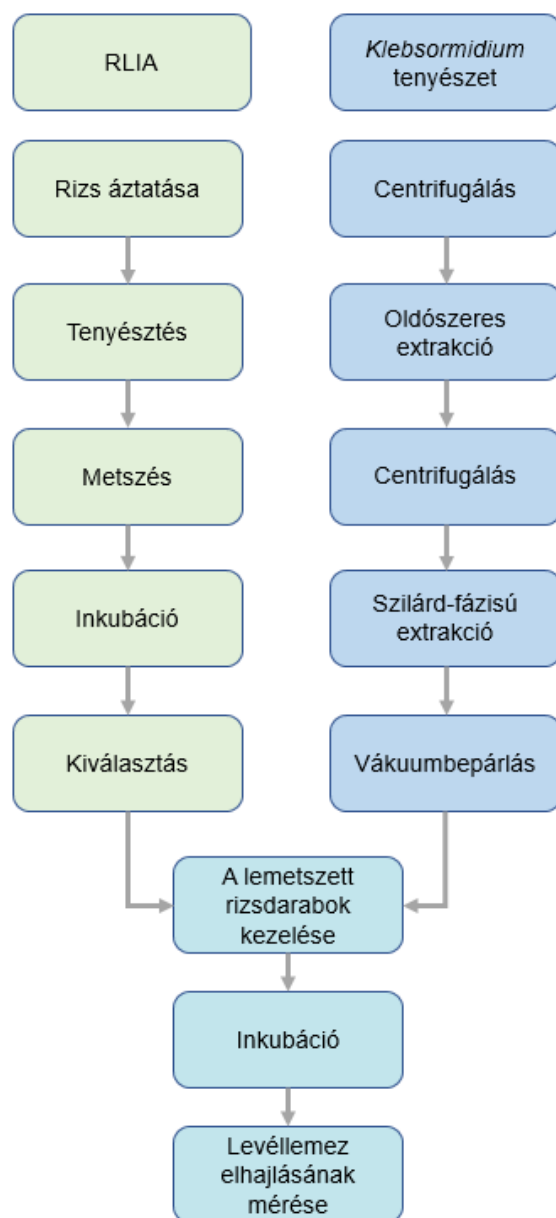
A mintaelőkészítés során 18 liter *Klebsormidium* sp. tenyészetet használtunk fel. Centrifugálást (4500 rpm, 10 perc) követően, a kapott felülúszót eltávolítottuk. Az így kapott sejtömeget négyszeres térfogatú, jéghideg, 80%-os metanollal extraháltuk 5°C-on, egy éjszakán át. Az inkubációt követően az extraktumot ismételtelen centrifugáltuk (4500 rpm, 10 perc), majd az elválasztott felülúszót hűtőszekrényben tároltuk. Az extrakciós és centrifugálási folyamatot megismételtük még egy további alkalommal.

Az elválasztott felülúszót EVOLUTE ABN™ (610-0010-H, Biotage, Uppsala, Svédország) szilárd fázisú extrakciós (SPE) oszlopon tisztítottuk (20. ábra).



20. ábra Szilárd fázisú extrakció lépései

Az így nyert eluátumot rotációs vákuumbepárlóval (Rotavapor R-114, Büchi Flawil, Svájc) szárazra pároltuk, majd végül vízben oldottuk fel 20 mL végtérfogatig. Az analitikai mérések előtt a mintákból 3-(danzilamino) fenilbórsav (Merck Millipore, USA) segítségével származékot képeztünk Gamoh és mtsai (1990) protokollja alapján. A mintaelőkészítés lépéseit a 21. ábra foglalja össze.



21. ábra Az RLIA (rizs levéllemez elhajlási teszt) és a *Klebsormidium* tenyészetekkel végzett brasszinoszteroid-meghatározás folyamatának vázlatos ábrázolása

3.2.4 UHPLC-MS/MS elemzés

Az UHPLC-MS/MS elemzést nagy felbontású tömegspektrometriával végeztük: Dionex Ultimate3000 UHPLC rendszerrel (TCC-3000RS oszloptermosztát, HPG-3400RS pumpa, SRD-3400 oldószer-telenítő, WPS-3000TRS automata mintavevő), amely egy Orbitrap Q Exactive Focus tömegspektrométerhez volt csatlakoztatva, elektropray ionizációs (ESI) forrással (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Alkalmazott oszlop: Kinetex C18 oszlop (75 × 3 mm; 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Eluensek: Eluens A: 0,1% v/v hangyasav; Eluens B: acetonitril: 0,1% v/v hangyasav (80:20, v/v). Gradiens program: 0,0

perc: 80% B; 5,0 perc: 100% B (lineáris gradiens); 10,0 perc: 100% B (izokratikus). Áramlási sebesség: 0,3 m perc⁻¹. Oszlophőmérséklet: 25°C. Injektált térfogat: 1,0–10,0 µL. Az ESI forrást pozitív módban üzemeltettük, és a működési paramétereket a beépített szoftver automatikusan optimalizálta. Az alkalmazott működési paraméterek: permetezőfeszültség: 3500 V (+); kapilláris hőmérséklet: 256°C; védő-, segéd- és tartalék gázok (N₂): 47,50, 11,25 és 2,25 önkényes egység, sorrendben. MS/MS (MS2) vizsgálatok: 70 000-es felbontással, 50 eV ütközési energiával; prekursor ion: m/z 815, termék ion: 174 (ezen termékion intenzitását használtuk a mennyiségi meghatározáshoz).

3.2.5 Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az R statisztikai szoftver 4.2.1-es verziójában (R Core Team 2021) hajtottunk végre a 'vegan' csomag (Oksanen és mtsai 2022) használatával. A rizslevél dőlésének megfigyelt mértékét kéttényezős varianciaanalízissel (multiway ANOVA) vizsgáltuk annak érdekében, hogy megállapítsuk, az alkalmazott BR koncentrációk és/vagy rizsfajták befolyásolják-e az eredményeket. A fajták közötti páronkénti különbségek összehasonlításához Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztunk. A különböző BR koncentrációk melletti rizslevél dőlésszögek közötti eltérések vizsgálatára Welch-tesztet végeztünk. A levéllemez dőlési szögek és a brasszinolid standardok közötti kapcsolat kimutatásához lineáris regressziós modellt használtunk, melynek értékeléséhez a legfontosabb standard mutatók közül az RSE-t (Residual Standard Error – reziduumok szórása) és RMSE-t (root mean square error – négyzetes gyök átlagos hiba) számoltuk ki.

3.3 Eredmények

3.3.1 Rizsfajta kiválasztása a rizs levéllemez elhajlási bioteszthez

A kéttényezős ANOVA szerint a vizsgált fajták rizslevéllemez dőlésszögét szignifikánsan befolyásolta a BR tartalom (F érték: 121,194; $p < 0,001$), valamint a rizsfajta (F érték: 10,326; $p < 0,001$). Az összes vizsgált rizsfajta pozitívan reagált (azaz sokkal nagyobb elhajlási szöget mutatott a megfelelő kontrollhoz képest) a BL-kezelésre, bár különböző mértékben. A 'Koshihikari', 'M 60' és 'Arsenal' fajtákra sokkal jobban hatott a kezelés, mint a 'Hoshinoyume' fajta esetében (2. táblázat). Mivel a 'M 60' fajta már a *Klebsormidium* koncentrált tenyészetében várható legmagasabb BL szintnél elérte a maximális lehetséges dőlésszöget (azaz 180°-ot), ezért ezt a fajtát kizártuk a további vizsgálatokból. A fennmaradó két fajta közül a 'Koshihikari' sokkal reprodukálhatóbb eredményeket adott, és jelentősen

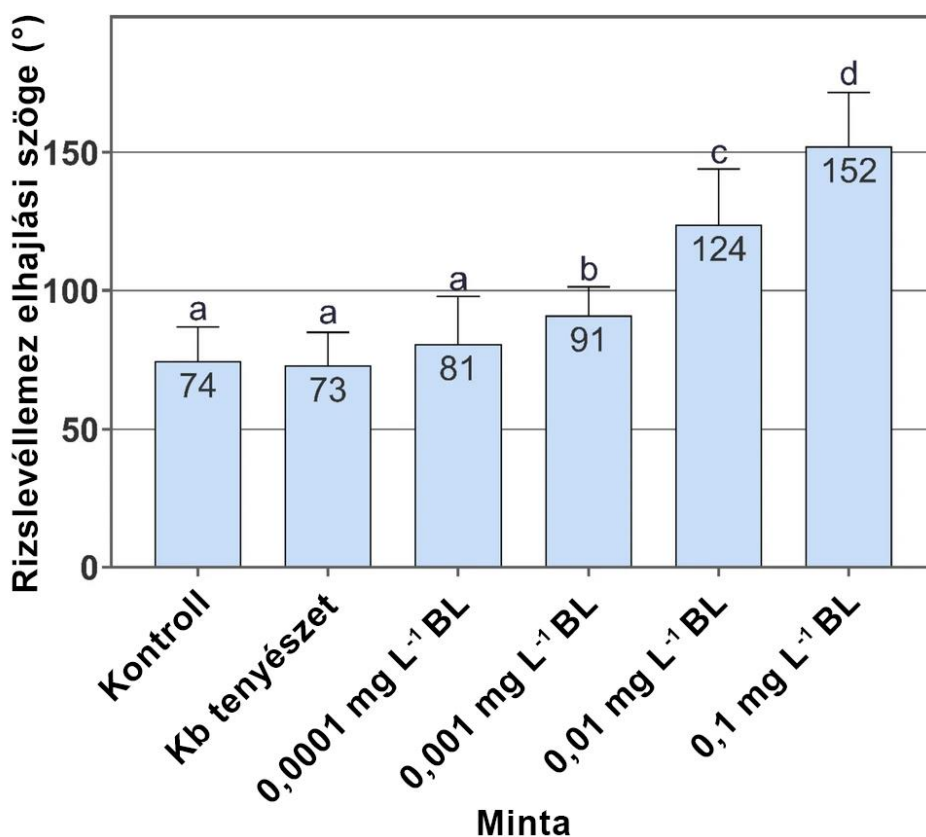
magasabb csírázási hatékonyságot mutatott, mint az 'Arsenal' fajta. Ezen megfigyelések alapján a további vizsgálatokhoz a 'Koshihikari' rizsfajtát választottuk.

2. táblázat A brasszolidkezelés hatása a levéllemez hajlásszögére különböző rizsfajták esetében (átlag és szórás)(n = 8–10). nd = nem meghatározott

Rizsfajta	Rizslevéllemez elhajlás (°)		
	Kontroll	0,1 mg L ⁻¹ BL	1,0 mg L ⁻¹ BL
Koshihikari	66±16	137±37	144±14
M 60	71±18	171±15	169±10
Arsenal	42±8	138±27	137±17
Hoshinoyume	43±12	nd.	109±20

3.3.2 Az RLIA érzékenységének meghatározása

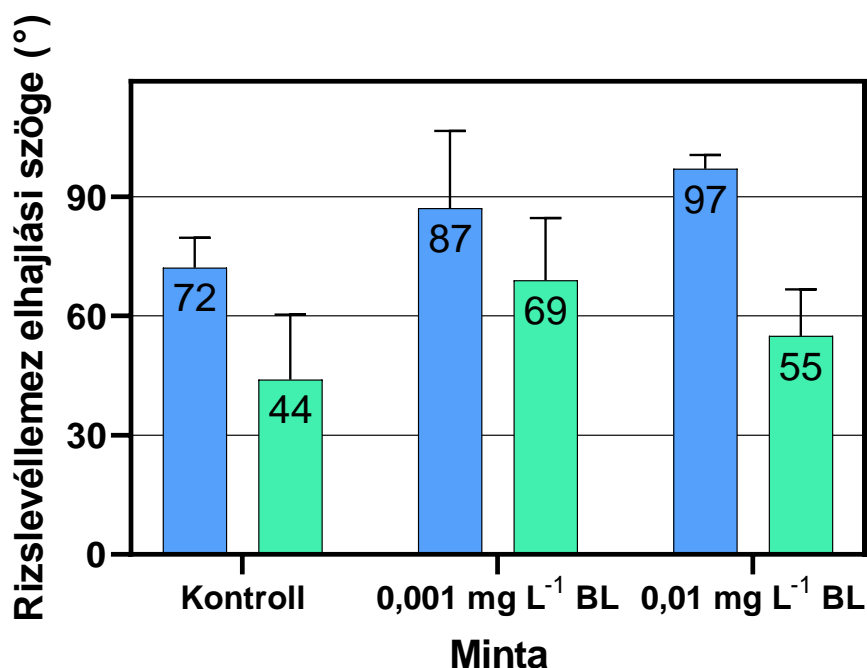
A 'Koshihikari' rizsfajta levéllemezének dőlési válaszát vizsgáltuk különböző koncentrációjú BL kezelés hatására (22. ábra). Bár már a 0,0001 mg L⁻¹ BL koncentráció is kiváltott bizonyos hormonális választ (a dőlésszög 7°-kal nőtt), a statisztikai elemzés szerint ez a változás nem volt szignifikáns ($p > 0,05$). Ezzel szemben 0,001 mg L⁻¹-es BL koncentrációtól kezdődően a BL jelenléte a teszt során szignifikáns növekedést idézett elő a rizs levéllemezének dőlési szögében ($p < 0,05$). Az RLIA során alkalmazott 0,001, 0,01 és 0,1 mg L⁻¹ BL koncentrációk rendre 17°, 50° és 78°-os növekedést eredményeztek a levéllemez dőlési szögében (22. ábra).



22. ábra A rizs levéllemez dőlési szögének brasszinolid-koncentráció-függése a „Koshihikari” rizsfajtából izolált mintákon ($n = 9$). Összehasonlításképpen feltüntetésre került a kezeletlen kontrollok, valamint az ép *Klebsormidium* tenyészzettel (Kb) kezelt rizs levéllemez dőlési szöge is. Az oszlopok felett látható betűk a Welch-teszt eredményeit jelölik: az azonos betűkkel jelölt csoportok között nincs szignifikáns különbség, míg a különböző betűkkel jelölt csoportok szignifikánsan eltérnek egymástól

3.3.3 A *Klebsormidium* BL tartalmának becslése RLIA segítségével

Ép (azaz nem roncsolt) *Klebsormidium* sejtek RLIA-ban történő alkalmazása nem idézett elő növekedést a rizs levéllemez dőlési szögében, ami arra utal, hogy a *Klebsormidium* tenyészetek brasszinoszteroid tartalma főként a sejteken belül helyezkedik el (23. ábra). E megfigyelés alapján a BR tartalom felszabadítása érdekében különböző sejtroncsolási és hormonextrakciós protokollokat teszteltünk. A kémiai módszerek közül a metanolt oldószerként alkalmazó extrakció mutatta a legmagasabb látszólagos kivonási hatékonyságot. Ugyanakkor a BL standardok és metanol együttes alkalmazása kimutatta, hogy ez az oldószer negatív hatással van a rizs levéllemez dőlési szögére, amit az adatok értékelésekor figyelembe kell venni. Amint az a 23. ábrán látható, az extrakciót követően várhatóan jelenlévő 5%-os metanol a kísérletben átlagosan 34%-os csökkenést eredményezett a rizslevéllemez dőlési szögében (kontroll esetén $p < 0,001$; $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ -nél $p = 0,048$; $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ -nél $p < 0,001$).

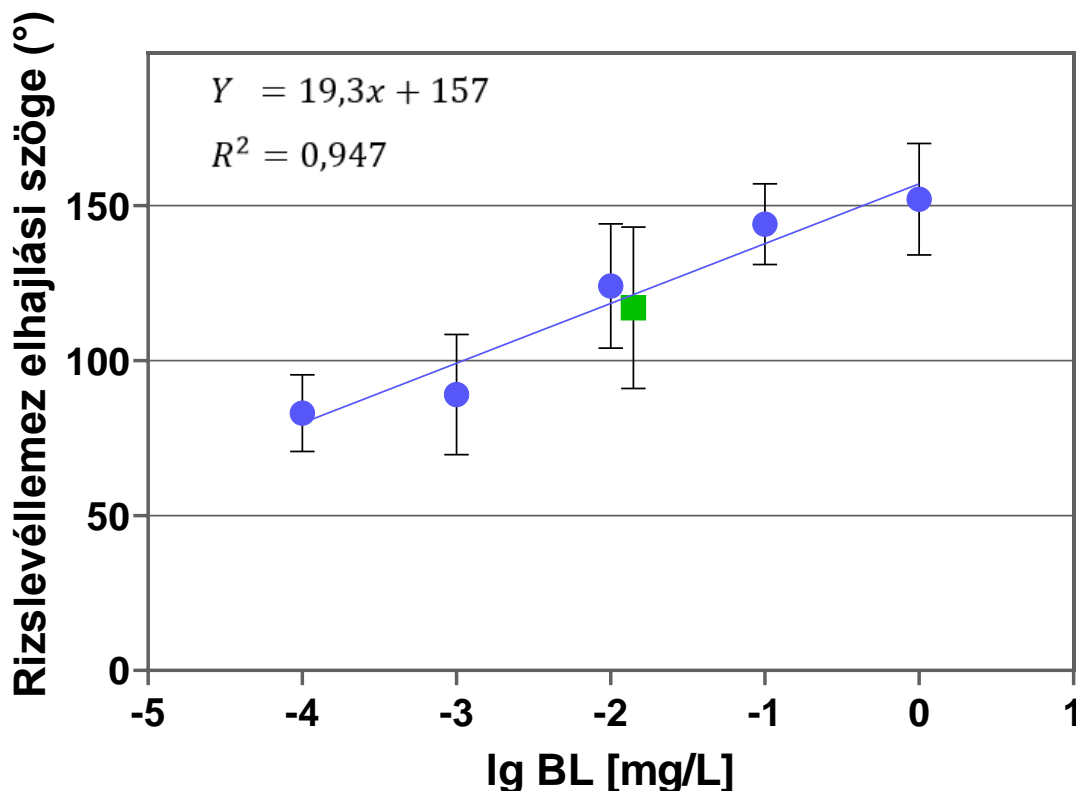


23. ábra A metanol hatása a rizs levéllemez dőlési szögére. A rizs levéllemez dőlését BL standardok jelenlétében vagy azok nélkül idéztük elő a megadott koncentrációk mellett, víz (kék) vagy 95%/5% víz–metanol keverék (zöld) oldószer alkalmazásával. A hibasávok a szórást jelzik ($n = 8$)

A probléma kiküszöbölésére metanol–víz oldószercserét alkalmaztunk SPE segítségével. Bár ez a protokoll összességében még mindig némi csökkenést eredményezett a levéllemez dőlési szögében, metanol hiányában a dőlés szöge jóval magasabb volt, mint metanol jelenlétében. Ennek megfelelően ezt a megközelítést (azaz az oldószercserét) használtuk fel a *Klebsormidium* BR tartalmának becslésére. A mikroalga minták előkészítését megelőzően előkísérletben teszteltük a mintaelőkészítési módszert BL standard felhasználásával. Ebben a kísérletben 0,05 mg L⁻¹ végső koncentrációjú BL-t alkalmaztunk, amelyet 95% víz és 5% metanol keverékében oldottunk fel. Az oldatot két részre osztottuk: az elsőt közvetlenül használtuk RLIA-ban, míg a másodikat SPE-eljárással tisztítottuk. Az így kapott eluátumot rotációs vákuumbepárlóval szárazra pároltuk, majd tiszta vízben oldottuk fel, és végül ezt is RLIA-ban vizsgáltuk. A kétféleképp előkészített BL standarddal végzett RLIA mérések között nem volt szignifikáns különbség a rizslevéllemez dőlési szögében.

A rizslevéllemez dőlési szögének BL koncentrációfüggését az 24. ábra szemlélteti. Az adatok szerint a dőlési szög és a BL koncentráció között fél-logaritmikus összefüggés figyelhető meg a 0,001–0,1 mg L⁻¹ koncentráció tartományban, amely három nagyságrendet fed le. E határérték fölött a BL koncentráció növelése már nem eredményezett jelentős hormonális választ, feltehetően térbeli (szerkezeti) korlátok miatt (figyelembe véve, hogy a maximálisan

elérhető dőlés 180° lehet). A *Klebsormidium* tenyészetek BR tartalmának becslésére való alkalmasság megerősítésére a következő lépésben meghatároztuk néhány független *Klebsormidium* tenyészet BL-tartalmát tömegspektrometriával, és az így nyert adatokat összevetettük az RLIA-val kapott eredményekkel. A módszer kimutatási határa (LOD - Limit of Detection) $38,9 \text{ ng/L}$, míg a mérési határa (LOQ - Limit of Quantification) $118,0 \text{ ng/L}$ volt. Az átlagos BL koncentráció a sűrű *Klebsormidium* kivonatokban $14,05 \pm 1,03 \mu\text{g L}^{-1}$ volt ($n = 4$). Ugyanezen kivonatok RLIA-val vizsgálva $117^\circ \pm 26^\circ$ átlagos levéllemez-dőlési szöget eredményeztek. Ezeket az értékeket az 24. ábrán ábrázolva jó egyezést mutattak az UHPLC-MS/MS és az RLIA módszerrel becsült BR-szintek között. A lineáris regresszió pontosságának meghatározására alkalmazható diagnosztikai paramétereket tekintve az RSE érték $7,3$ volt, azaz a megfigyelt RLIA értékek átlagosan körülbelül $7,3$ egységgel térnek el a becsült értékektől, ami $6,8\%$ -os hibaarányra felel meg. A modell RMSE értéke pedig $19,7$ volt ($16,8\%$). Az alacsony értéke azt jelenti, hogy a modell jobban illeszkedik az adatokhoz és pontosabb előrejelzéseket ad. Mindkét diagnosztikai paraméter a modell nagyobb pontosságát jelzik.



24. ábra A levéllemez elhajlási szöge különböző koncentrációjú brasszinolid standardok (kék pontok, $n = 8$) és *Klebsormidium* kivonatok (zöld négyzet, $n = 4$) jelenlétében (átlag és szórás). A *Klebsormidium* kivonatok esetében az x irányú hibásávok a jelölés méretén belül maradnak

3.4 Diszkusszió

Az RLIA az egyik leggyakrabban alkalmazott bioteszt a növényi anyagok és kivonatok biológiailag aktív, teljes BR tartalmának becslésére, vagy egyszerűen annak vizsgálatára, hogy biológiai mintákban a BR-ek egy bizonyos küszöbérték felett jelen vannak-e vagy sem. Például ilyen vizsgálatokat alkalmaztak a lebegő makroalga *Hydrodictyon reticulatum* (Yokota és mtsai 1987), napraforgó (*Helianthus annuus*, Takatsuto és mtsai 1989) és erdeifenyő (*Pinus sylvestris* (Kim és mtsai 1990) kivonatok biológiai aktivitásának tesztelésére. Annak ellenére, hogy az RLIA számos potenciális előnnyel rendelkezik, eddig még nem használták a BR tartalom becslésére vagy meghatározására mikroalga tenyészetekben. Napjainkban ezeket főképpen UHPLC-MS/MS eljárás és az izotóphígítási módszer kombinációjával végzik (Stirk és mtsai 2014, 2018). Bár ez a módszer nagy pontossággal szolgáltat kvantitatív adatokat, számos korlátja is van, például drága műszerparkot és vegyszereket igényel, valamint a módszer használatához magasan képzett szakemberekre van szükség. Az általunk kidolgozott módszer egy olcsó és egyszerű alternatívát kínál a BR-meghatározásra mikroalga tenyészetekből. Tudomásunk szerint ez volt az első próbálkozás arra, hogy RLIA-t használják mikroalgák BR tartalmának vizsgálatára.

Munkánk egyik alapvető része egy megfelelő rizsfajta kiválasztása volt az RLIA-hoz. Az alkalmas fajta kiválasztásának főbb kritériumai a következők voltak: (1) hatékony növekedés a közép-európai éghajlati viszonyok között, lehetőleg széles körben termesztett és könnyen hozzáférhető fajta, (2) jó csírázási hatékonyság laboratóriumi körülmények között, valamint (3) jól reprodukálható RLIA-válasz egy széles, biológiailag releváns BR-koncentrációs tartományban. E vizsgálatokhoz BL standardot használtunk, mivel relatív érzékenysége ötszöröse a második legaktívabb BR-nek, a kasztaszteronnak RLIA-ban (Fujioka és mtsai 1995). A négy vizsgált rizsfajta közül a 'Koshihikari fajta' felelt meg leginkább ezeknek a kritériumoknak, mivel adaxiális sejtjei jobban megnyúlnak a vegetatív fejlődés során, mint a levél fonákján található sejtek, ezáltal sokkal nagyobb elhajlást tapasztalhatunk, mint például a Japánban széles körben alkalmazott 'Takanari' fajtánál (San és mtsai 2018). Ez a rizsfajta log-lineáris választ mutatott RLIA-ban a 0,001–0,1 mg L⁻¹ BL-koncentrációs tartományban. Ez a tartomány tökéletesen átfedésben van a mikroalga kivonatokban mért BR-tartalommal (Stirk és mtsai 2013a).

A mikroalgák vastag sejtfa jelentősen megnehezíti a sejtek feltárását és ezzel együtt a sejten belüli BR tartalom kinyerését, így a RLIA alkalmazását. Számos hagyományos sejtroncsoló módszert kipróbáltunk, azonban egyik sem bizonyult sikeresnek. Alternatív

megoldásként a mechanikai sejtromboló módszerek helyett megkíséreltük szerves oldószerekkel kivonni a szteroid hormonokat a *Klebsormidium* sejtekből, amely megközelítés általánosan alkalmazott hidrofób biomolekulák feltárásakor. A tesztelt szerves oldószerek közül a metanol bizonyult a leghatékonyabbnak a BR-ek kivonásában, azonban egyúttal jelentős mértékben csökkentette a rizslevéllemez elhajlási szögét is. Ezt a problémát a metanol-víz oldószercsere alkalmazásával sikerült kiküszöbölnünk, amelyet SPE segítségével hajtottunk végre.

Lényeges szempont volt a módszer alkalmazhatóságának validálása, ezért a *Klebsormidium* tenyészetek BR tartalmát RLIA és UHPLC-MS/MS módszerekkel is vizsgáltuk. Ellentétben a BL standarddal végzett kísérletekkel, amelyek koncentrációja nagyon széles tartományban változtatható (több nagyságrend), a vizsgált mikroalga BR tartalma egy szűkebb tartományban helyezkedett el. Az analitikailag meghatározott átlagkoncentráció a kivonatokban (900-szoros koncentráció mellett) $14,05 \pm 1,03 \mu\text{g L}^{-1}$ BL volt, amely $117^\circ \pm 26^\circ$ rizslevéllemez elhajlási szögnek felelt meg RLIA alkalmazásával (24. ábra). Ez utóbbi $8,46 \pm 1,88 \mu\text{g L}^{-1}$ BL-nek felelt meg, azonban a két koncentráció közötti különbség statisztikailag nem szignifikáns. Ezek a BL-koncentrációk a *Klebsormidium* tenyészetekben $15,60 \pm 1,14$ és $9,40 \pm 2,09 \text{ ng L}^{-1}$ BL koncentrációnak felelnek meg. Az UHPLC-MS/MS (amely szelektív a BL-re) és az RLIA (amely minden hormonálisan aktív anyagra érzékeny) által meghatározott sejten belüli BL-koncentrációk közötti statisztikailag nem szignifikáns eltérés megerősíti a BL magas relatív mennyiségét a *Klebsormidium* kivonatokban, valamint annak erős hormonális aktivitását (Stirk és mtsai 2013a, Fujioka és mtsai 1995). Ezzel szemben az is kimutattuk, hogy a kivonatokban jelen lévő egyéb hormonálisan aktív anyagok hozzájárulása a rizslevéllemez dőlési szögéhez csekély mértékű volt. A vizsgált *Klebsormidium* törzs becsült BL-szintjei jelentősen alacsonyabbak voltak, mint a *Klebsormidium flaccidum* esetében korábban közölt koncentrációk (Stirk 2013a). Az eltérő törzsek közötti BL-szintek különbségének okának feltárása, valamint a *Klebsormidium* tenyésztésének optimalizálása például biotechnológiai célokra nem tartozott a dolgozat céljai közé. Mindazonáltal az RLIA széles koncentráció-tartományban való alkalmazhatósága lehetővé tette a BR-szint becslését még a vizsgált, viszonylag alacsony BR-tartalmú törzsben is. Említésre méltó, hogy a kidolgozott módszerrel lehetőség nyílik a magas BR-tartalmú mikroalga törzseket kiválasztására.

Természetesen, mint minden módszernek, a javasolt módszernek is vannak korlátai, amelyek közé tartozik – amint azt fentebb bemutattuk –, hogy (1) az RLIA nem képes a BR-koncentrációt akkora pontossággal meghatározni, mint az analitikai módszerek, (2)

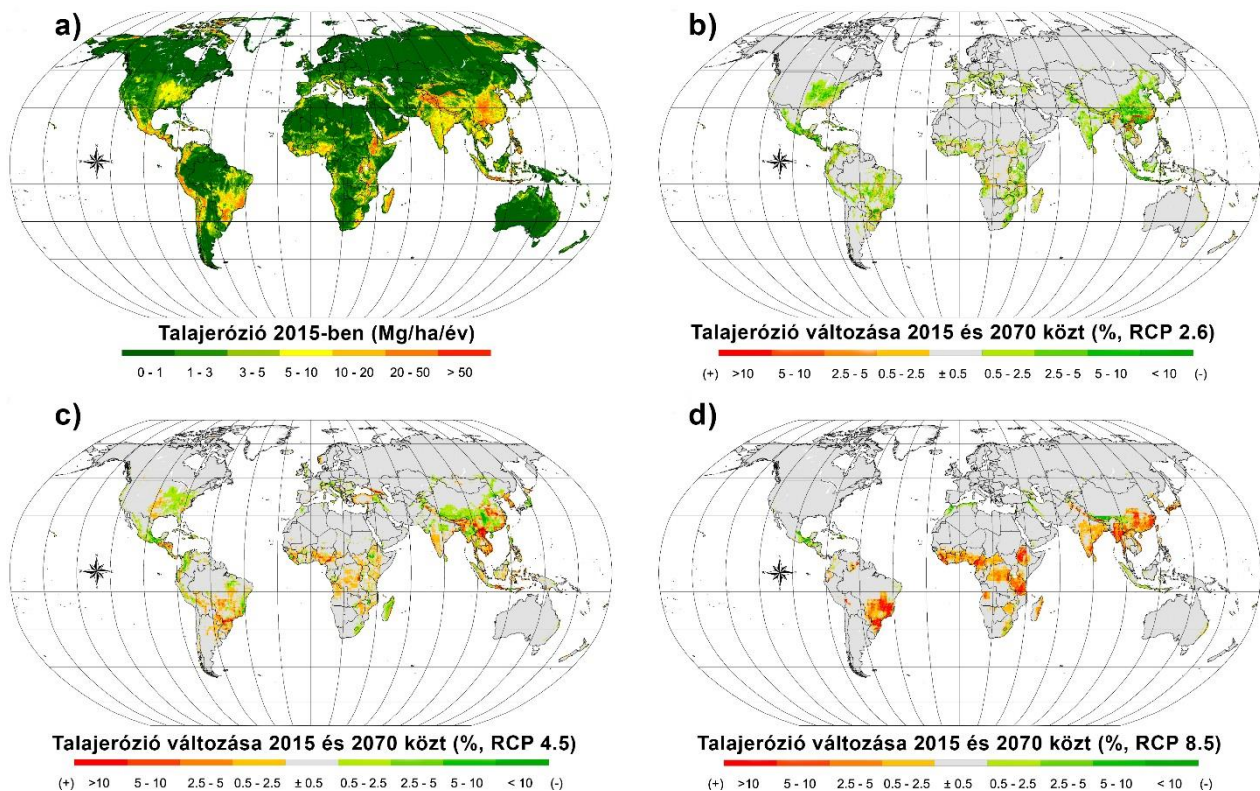
vitathatatlanul időigényesebb, és (3) nem tudja elkülöníteni a különböző RLIA-aktív vegyületeket. Ez utóbbi nemcsak a BR-ekre (például BL, CS stb.) érvényes, hanem az auxinokra is [például indol-3-ecetsav (IAA)]. Az IAA szintén képes bizonyos mértékű rizslevél-elhajlást kiváltani, azonban a vizsgált BR koncentráció-tartományban az IAA RLIA-ra gyakorolt hatása elhanyagolható (Wada és mtsai 1984; Han és mtsai 1997). Összességében a felsorolt negatívumokat jól ellensúlyozzák a módszer előnyös tulajdonságai, mint például az alacsony költség, az egyszerűség és az alacsony infrastrukturális igény, amelyek elérhetővé teszik az algaalapú mezőgazdasági termékek fejlesztését szélesebb rétegek számára is.

4. Alga-dominált biológiai talajkéreg hatása a talajra

4.1 Bevezetés

A talajerózió jelen korunk egyik legsúlyosabb környezeti problémája, ui. jelentősen rontja a termőföldek produktivitását (Pimentel 2006). Az erózióval érintett területek globális kiterjedése meghaladja a 3,4 millió km²-t, ami 33,7 millió tonnás, azaz a globális mezőgazdasági termelés 0,41%-ának megfelelő veszteséget jelent (Sartori és mtsai 2019).

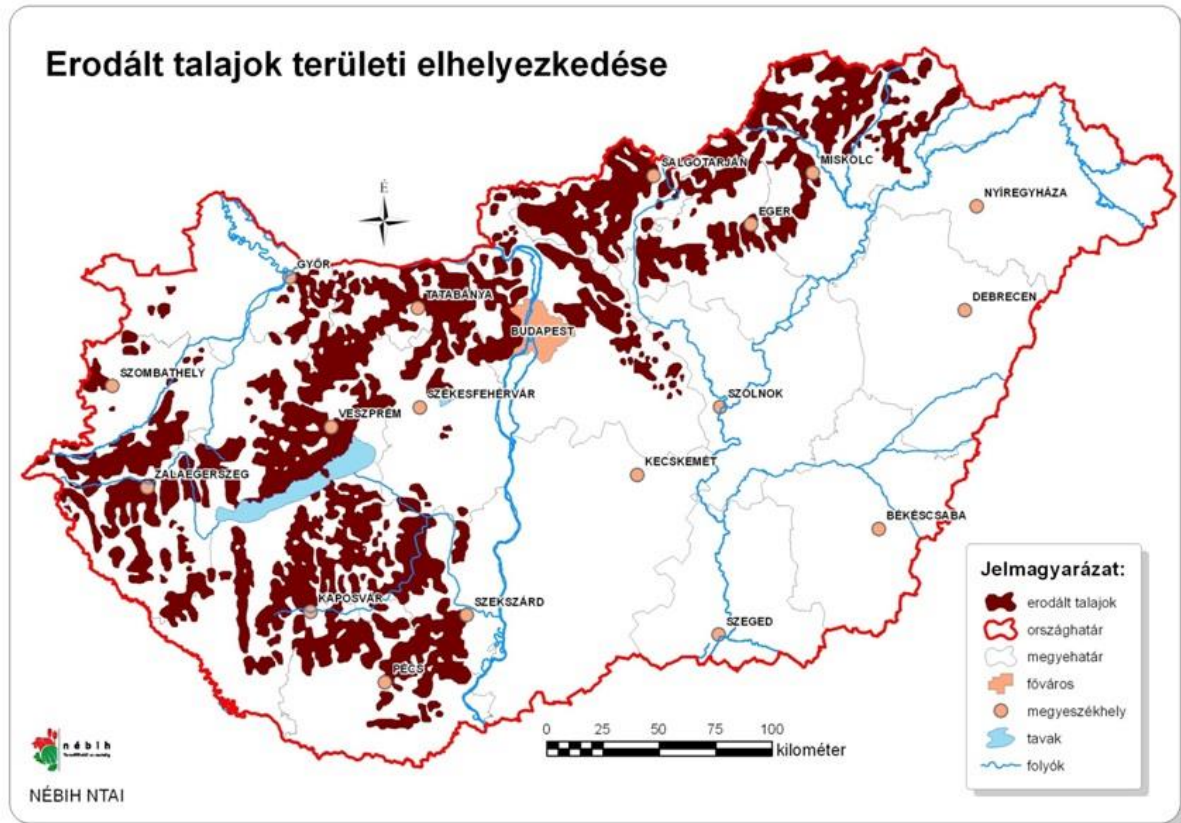
A különböző éghajlati és gazdasági forgatókönyvek kombinációi (SSPs, Shared Socioeconomic Pathways) 2070-ig 30%-tól akár 66%-ig terjedő átlagos talajerózió növekedést jósolnak világszinten (25. ábra), ami mennyiségileg 56,1 Pg/év, 64,8 Pg/év és 71,6 Pg/év értéknek felel meg az SSP1-RCP2.6, SSP2-RCP4.5 és SSP5-RCP8.5 forgatókönyvekben (Borrelli és mtsai 2020).



25. ábra A talajerózió mértékének változása 2015 és 2070 között. (A) a talajeróziós rátákat mutatja be, hét osztályba sorolva az Európai Talajügyi Hivatal (European Soil Bureau) besorolása alapján. A B-D ábrák a 2015 és 2070 közötti éves átlagos talajerózió változásait szemléltetik különböző forgatókönyvek esetén. (Forrás: Borrelli és mtsai 2020)

A legrosszabb esetet feltételező forgatókönyvben az erózióhoz köthető mezőgazdasági termelés kiesés 2070-re globálisan akár 352 millió tonnát is elérhet (Sartori és mtsai 2024). Ezek az előrejelzések jelentős mértékben függenek az éghajlati változásoktól, a társadalmi-gazdasági

fejlődéstől, az agrár-, és környezetpolitikai intézkedésektől, a földhasználatról és a termelők által alkalmazott művelési gyakorlatoktól (pl. vetésforgó, agrotechnikai megoldások). A termőtalajok pusztulása mellett az egyre növekvő terméshozam-ingadozás további terheket ró a mezőgazdaságra (Huzsvai és mtsai 2024). Magyarországon a szél-, és vízerosztó 2,3 millió hektárnyi területet érint, ami megközelítéleg hazánk területének negyedét teszi ki (26. ábra).



26. ábra Magyarországi erodált talajok térképe (Forrás: <https://portal.nebih.gov.hu>)

Ugyanakkor szerencsére számos stratégia létezik az eróziós veszteségek csökkentésére, ilyen például az ökológiai gazdálkodás, a talajművelés elhagyása (no-till), és a takarónövények alkalmazása. Emellett ígéretes megoldás a lejtős területeken biológiai talajkéreg létrehozása is, amely hozzájárulhat a talajpusztulás mérsékléséhez (Belnap és mtsai 2016).

A BSC-hez köthető mechanizmusok széles skálája képes csökkenteni a talaj erózióval szembeni kitettséget. A talajkéreg kialakulása stabilizálja az egyes talajrészecskéket; ebben kulcsszerepet játszanak a fonalas cianobaktériumok, mikroalgák és gombák által kiválasztott extracelluláris polimer anyagok (extracellular polymeric substances - EPS) (Lu és mtsai 2022). Az eróziócsökkentő hatásukon kívül számos hasznos ökológiai funkcióval rendelkeznek ezek a talajkéreg (Belnap és Büdel 2016; Adessi és mtsai 2018; Román és mtsai 2018; Rodríguez-

Caballero és mtsai 2018; Sodaeizadeh és mtsai 2025): a benne élő cianobaktériumok képesek a légköri N₂ megkötésére, támogatják a mikroorganizmusok elszaporodását, előmozdítják azok közötti információcserét, kedvezően befolyásolják a talajszerkezetet, hozzájárulnak a talaj vízmeztartó képességének növeléséhez., valamint növelik a talaj tápanyagtartalmát. Eddig elsősorban a cianobaktériumok hatásait vizsgálták ebben a témakörben (Kheirfam és mtsai 2017, 2020; Sadeghi és mtsai 2020a, b), míg a zöldalgák eróziócsökkentő hatásairól mindmáig csak igen korlátozott információ áll rendelkezésre (Metting és Rayburn 1983; Metting 1987; Lichner és mtsai 2013; Zhang és Koehler 2022).

Számos vizsgálat elemezte a BSC-k hatását különböző talajtípusokon; ezek közül kiemelkedik a *Soil Crust International Project* (SCIN), amely Németország, Svédország, Ausztria és Spanyolország természetes és félig természetes élőhelyein tanulmányozta a talajkéreg előfordulását és működését (Büdel és mtsai 2014). Emellett sok egyéb kutatás foglalkozott a BSC-k szerepével sivatagi és más extrém élőhelyeken (Smith és mtsai 2004; Chamizo és mtsai 2012; Fischer és mtsai 2013; Colica és mtsai 2014; Gao és mtsai 2017; Kheirfam és Asadzadeh 2020). A mezőgazdasági területeken található BSC-k jelenlétének különböző talajtani jellemzőkre gyakorolt hatásait szintén vizsgálták (Šimanský és mtsai 2014); ezek a kutatások azonban kizárólag természetes BSC-vel foglalkoztak.

A BSC-k kialakulása a természetben lassan valósul meg, több évig vagy akár évtizedig is eltarthat (Campbell és mtsai 1989), azonban különböző mikroorganizmusok oltásával fel lehet gyorsítani ezt a folyamatot (Liu és mtsai 2008; Hu és mtsai 2012; Lan és mtsai 2014; Mengual és mtsai 2014; Lababpour 2016). Bár több tanulmány is foglalkozott mesterséges BSC-k hatásaival, ezek döntő többsége sivatagi területekre (Tang és mtsai 2007; Liu és mtsai 2008; Wang és mtsai 2009; Rao és mtsai 2009; Bu és mtsai 2013; Wu és mtsai 2013), erdei talajokra (Eldridge és Leys 2003), vagy mesterséges laboratóriumi környezetre (Lichner és mtsai 2013; Xiao és mtsai 2015) korlátozódott. A mesterséges talajkéreg-képződés mezőgazdasági területeken jelentkező hatásairól – például a talajerózió, pórusterfogot, vagy a talajmikrobiom összetétel vonatkozásában – jelenleg még nem áll rendelkezésre elegendő tudományos ismeret.

A zöldalgák csoportján belül a *Klebsormidium* nemzetség szárazföldi képviselői a BSC-k leggyakoribb alkotói közé tartoznak (Smith és mtsai 2004; Kitzing és Karsten 2015; Belnap és mtsai 2016). A nemzetség tagjai képesek hosszan tartó száraz periódusokat túlélni, majd a nedvesebb időszakokban ismét rehidratálódni és szaporodni (Karsten és mtsai 2010; Karsten és Holzinger 2012).

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy egy *Klebsormidium* fajjal történő talajoltás milyen hatásokat képes kifejteni a talajra lejtős mezőgazdasági területen, azaz

- 1) Képes lesz-e az alkalmazott törzs biológiai talajkéreg kialakítására?
- 2) Hogyan befolyásolja a kialakuló BSC a talajnedvességet és porozitást?
- 3) Befolyásolja-e az algaoltás az eróziós veszteségeket mesterséges esőztetési szimuláció során?

4.2 Anyagok és módszerek

4.2.1 Vizsgálati terület és kísérleti beállítás

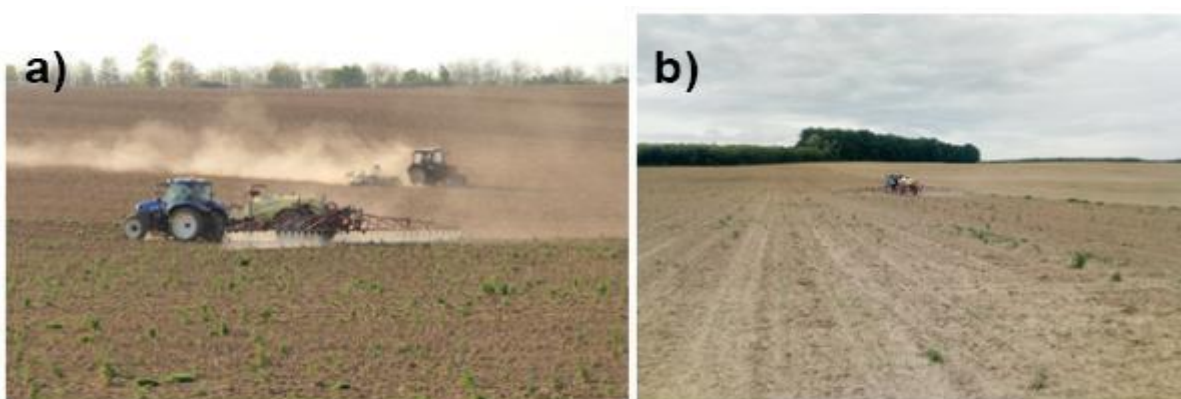
A vizsgálati terület Délnyugat-Magyarországon található, dombvidéki környezetben, a Balatontól 12 km-re nyugatra, Esztergályhorvát község közelében (46°40'55" É, 17°06'20" K, 133 m tszf.). A kutatási terület éghajlata meleg nyarú, nedves kontinentális (Rubel és mtsai 2017), a hosszú távú évi középhőmérséklete 11 °C, az éves csapadékmennyisége 700 mm (Hajósy és mtsai 1975). A vizsgált évben (2020) ezek az értékek 11,5 °C, illetve 615 mm voltak. Az év korai vegetációs időszaka száraz volt (áprilisban és májusban 26 mm, illetve 55 mm csapadék hullott), ezt követően azonban kifejezetten csapadékos volt az időjárás (júniusban 116 mm, júliusban 175 mm). A kísérleti terület lejtése 4–5% között változott (3. táblázat). A terület alapkőzete a lösz, a talaj pedig gyengén erodált, vályog mechanikai összetételű, agyagbemosódásos barna erdőtalaj [Haplic Luvisol (Loamic, Humic); IUSS Working Group (2022)]. A lejtők konvex felső részén alacsonyabb szervesanyag-tartalom, míg az alsó részeken a felhalmozódott üledék miatt kissé mélyebb talajprofil volt jellemző.

A 0,5 hektáros kísérleti területet két részre osztottuk: északi és déli parcellára. Az oltott (északi) terület szélességét az algás oltásra használt 18 méter munkaszélességű permetező határozta meg (24 kukoricásor), hossza pedig 270 méter volt. A kontroll (kezeletlen) terület ugyanekkora méretű volt, és közvetlenül az északi parcellától délre helyezkedett el (27. ábra). A vizsgált parcellarészek kijelölése során elsődleges szempont volt a területek homogenitása.



27. ábra A vizsgálati helyszínek légifotója (Forrás: HUN-REN CSFKI)

A területet 2010-ig évtizedeken át hagyományosan művelték. 2010 óta forgatás nélküli művelést alkalmaztak. A repce betakarítása után, 2019 őszén középmeley lazítást végeztek, amit 2020 tavaszán magágykészítés követett. A kukoricát április 21-én vetették (Pioneer 9718E WAXY fajta). A növényvédelmi kezelések során a területet április 23-án glifozáttal (4 L ha^{-1}) permetezték. Az algatenyészet sejtszáma: $1,7 \times 10^6$ sejt mL^{-1} volt, amit 10 L ha^{-1} dózisban május 11-én juttatták ki. (28. ábra).



28. ábra (a) Glifozátos kezelés két nappal vetés után (április 23.), illetve (b) az algakészítmény kijuttatása május 11-én a soroló kukoricában (forrás: HUN-REN CSFKI)

A kísérlet eleje (április-május) igen száraz volt, míg a júniusi és júliusi időjárás csapadékos volt (4. melléklet). A vizsgálatot megelőző napokban csapadék nem esett, a felszín igen száraz volt. Jellemző volt a felszíni 1 cm-nél kisebb repedések jelenléte.

4.2.2 *Klebsormidium* tenyészetek visszaizolálása talajmintákból

Talajmintákat gyűjtöttünk a vizsgálati területről 4,5 hónappal a kijuttatást követően. A talajmintákat a kezelt és a kontroll parcellák felső 1–2 cm-es rétegéből vettük (mindkét esetben $n = 20$). A mintavétel az adott területeken „X” alakban történt. A laboratóriumban 1 g talajmintát 10 mL steril BBM táptalajt tartalmazó kémcsőbe helyeztünk, majd a mintákat 2 héten keresztül 20°C-on inkubáltuk fehér fény alatt, 35 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, amelyet 36 W-os Polyflux fénycsövek biztosítottak. Két hét elteltével a mintákat fénymikroszkóppal vizsgáltuk (B-510PH, OPTIKA, Olaszország), hogy megállapítsuk a *Klebsormidium* jelenlétét vagy hiányát. Az eredményeket összesítettük, majd meghatároztuk, hogy a kezelt és a kontroll területekről származó minták hány százalékában volt kimutatható *Klebsormidium*.

4.2.3 *Közösségi DNS izolálása, amplifikálása és szekvenálása*

A begyűjtött talajmintákból meghatároztuk a mikrobiális közösséget molekuláris módszerekkel is. Ehhez a teljes genom DNS-t DNeasy PowerSoil Pro Kit-tel (Qiagen) izoláltuk a gyártó utasításait követve, azzal a kivétellel, hogy a sejtek feltárása 2 percig, 30 Hz rezgési frekvencián Mixer Mill MM301 készülékkel (Retsch, Németország) történt. Az izolált DNS-t –20°C-on fagyasztva tároltuk további feldolgozásig.

A minták mikrobiális közösségeinek vizsgálatához Illumina-alapú amplicon szekvenálást végeztünk, a pro- és eukarióták kis alegységű riboszomális RNS génjeit (16S és 18S) célozva. A taxonómiai markergének PCR-amplifikálását CS1/CS2 szekvenálási adaptereket tartalmazó fúziós primerekkel végeztük. A prokarióták esetében a 16S rRNS gén amplifikálásához az alábbi célspecifikus primereket használtuk: Bacteria esetén B341F (5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3'; Herlemann és mtsai 2011) és 805NR (5'- GAC TAC NVG GGT ATC TAA TCC -3'; Apprill és mtsai 2015), míg Archaea esetén PARCH519F (5'- CAG CMG CCG CGG TAA -3'; Teske és Sørensen 2008) és Arch855R (5'- TCC CCC GCC AAT TCC TTT AA -3'; Yoshida és mtsai 2005). A PCR-t három párhuzamos reakcióban végeztük, mindegyik 20 μL végső térfogatban. A reakcióelegy összetevői: 1 \times Phusion HF puffer (Thermo), 0,2 mM dNTP (Thermo), 0,4 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Bovine Serum Albumin (Fermentas), 0,4 U Phusion High-Fidelity DNS-polimeráz (Thermo), valamint 0,325 μM minden egyes primerből. Az eukarióták 18S rRNS génjének amplifikálásához a 574*f (5'- CGG TAA YTC CAG CTC YV -3') és 1132r (5'- CCG TCA ATT HCT TYA ART -3') primereket (Hugerth és

mtsai 2014) használtuk a fenti módon, három párhuzamos reakcióban. A következő hőprofilokkal dolgoztunk:

- Bacteria esetében: kezdeti denaturáció 98°C-on 5 percig, majd 25 ciklus (denaturáció 95°C-on 30 s, annealing 55°C-on 30 s, elongáció 72°C-on 1 perc), végül végső elongáció 72°C-on 10 perc.
- Archaea esetében: kezdeti denaturáció 98°C-on 5 percig, 28 ciklus (denaturáció 95°C-on 30 s, annealing 60°C-on 30 s, elongáció 72°C-on 30 s), végül végső elongáció 72°C-on 10 perc.
- Eukarióták esetében: kezdeti denaturáció 98°C-on 5 percig, 28 ciklus (denaturáció 95°C-on 30 s, annealing 51°C-on 30 s, elongáció 72°C-on 1 perc), végül végső elongáció 72°C-on 10 perc.

A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a párhuzamos reakciókat összevonva mennyiségüket Qubit dsDNA HS teszttel (Invitrogen) határoztuk meg.

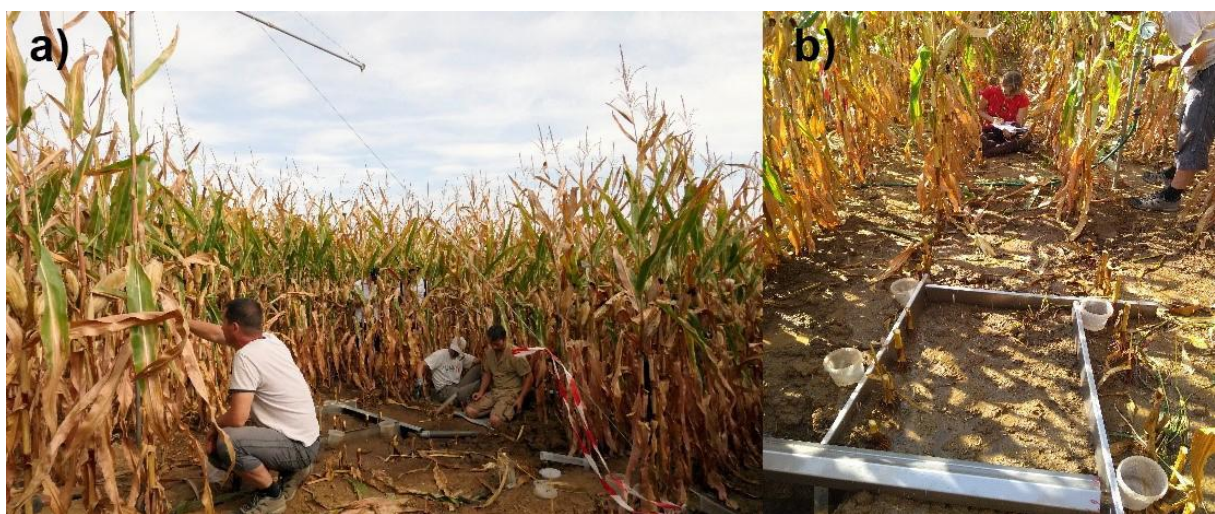
A DNS-szekvenálásra a Michigani Állami Egyetem Genomics Core Facility RTSF laboratóriumában (USA) került sor. A termékekhez Illumina-kompatibilis kiterjesztett adaptereket illesztettünk egy második PCR-rel, majd SequalPrep DNS Normalization lemezek (Invitrogen) segítségével normalizáltuk azokat. Az egyesített minták tisztítása és koncentrálása MinElute purifikációs oszlopokkal (Qiagen) történt, amit Qubit dsDNA HS, Agilent 4200 TapeStation HS DNA1000 és Illumina Library Quantification qPCR vizsgálatokkal (Kapa Biosystems) történő minőségellenőrzés és kvantifikálás követett. A szekvenálást 2×250 bp páros végű formátumban végezték MiSeq v2 500 ciklusos reagenskészlettel, szabványos MiSeq v2 flow cellán (Illumina). A szükséges egyedi szekvenáló és index primereket a reagens kazetta megfelelő kútjaiba adagolták. A bázisle hívást az Illumina Real Time Analysis (RTA) v1.18.54 szoftver végezte, az eredményt pedig Illumina Bcl2fastq v2.20.0-val alakították FastQ formátumba.

A szekvenciaelemzést a mothur v1.44.3 szoftverrel (Schloss és mtsai 2009) végeztük a MiSeq SOP protokoll alapján (Kozich és mtsai 2013, letöltve: 2022. január 17.), a „make.contigs” parancsban a deltaq értékét 10-re állítva. A primer szekvenciákat és az egyedi (singleton) olvasatokat a Kunin és mtsai (2010) szerint eltávolítottuk. A denoizálás a mothur pre.cluster parancsával történt, az alapértelmezett algoritmust és az ajánlott 4 bp különbségi küszöböt alkalmazva. A kimérák az integrált VSEARCH segítségével lettek azonosítva és eltávolítva. Az olvasatok illesztése és taxonómiai besorolása az ARB-SILVA SSU Ref NR 138 referencia-adatbázissal (Quast és mtsai 2012) történt, minimum 80-as bootstrap értéket

használva prokarióták esetében, míg eukariótákhoz a PR2 v4.10 referencia-adatbázist (Guillou és mtsai 2013) használtuk. Azokat az olvasatokat, amelyek nem a primer-specifikus taxonómiai csoportokhoz tartoztak, eltávolítottuk. Operatív taxonómiai egységeket (OTU-kat) 97%-os hasonlósági küszöbérték alapján határoztunk meg.

4.2.4 Mesterséges esőztetés és talajvizsgálatok

A helyszíni beszivárgást és erózióérzékenységet egy Meersmans-féle csapadékszimulátorral mértük, amelyet a Leuveni Katolikus Egyetemen fejlesztettek (29. ábra). A berendezés a természetes csapadék hatásainak modellezésére szolgál, kontrollált kísérleti körülményeket teremtve. Ezáltal lehetővé válik az esőztetés során keletkező lefolyó víz és erodált talaj mennyiségének mérése, valamint a talajba beszivárgó víz arányának pontos meghatározása. A szimulációs méréseket kezelésként négy ismétlésben végeztük. A vizsgálatokhoz Lechler 460.788 típusú teljes kúpos fűvókát használtunk, amely 0,4 bar nyomáson 40 mm h^{-1} csapadékin tenzitást biztosít, egyenletes eloszlásban. A képződő cseppspektrum kinetikus energiája megfelelt az azonos intenzitású természetes csapadéknak (Salles és mtsai 1999). A fűvóka három méterrel a vizsgált $0,5 \text{ m}^2$ -es parcellák fölött helyezkedett el. A parcellák köré műanyag edényeket helyeztünk a homogenitás és a felszínre elérő valós csapadékin tenzítés meghatározásához (Centeri és mtsai 2011). Az elfolyó víz és a talajvesztés mennyiségét folyamatosan gyűjtöttük. Az állandósult végső beszivárgást az idővel csökkenő beszivárgás alapján, állandó csapadékin tenzítés mellett számítottuk (Jakab és mtsai 2017, 2019). A csapadék után kialakult kéreg szerkezetét vékonycsiszolatokon keresztül, pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Jakab és mtsai 2013).



29. ábra Meersmans esőszimulátor esőztetés közben oldalról (a), és felülről (b) (Forrás: saját forrás)

A differenciált talajporozitás méréséhez a mintavételezést 100 cm³-es rézhengerrel végeztük. Kezelésenként tizenkét bolygatatlan mintát vettünk a 0–6 cm-es rétegből. A víztartalmat különböző (telített, szántóföldi vízkapacitású és 105°C-on szárított) nedvességi állapotban mért tömegek alapján határoztuk meg (Rowell, 2014). A tömegek közötti különbségek közvetlenül tükrözik a különböző pórusméreteket térfogatszázalékban, míg a száraz tömeg a térfogatsűrűséget adja meg.

A vízálló aggregátumok (WSA) arányát Eijkelkamp féle nedves szitával határoztuk meg a 250 µm < méretű aggregátumok arányának mérésével (Kemper és Koch, 1966). Kezelésenként tizenkét mintát gyűjtöttünk a felszínről (0–10 cm). A vizsgálathoz a levegőn szárított mintákból 1–2 mm-es frakciót választottunk ki (Retsch AS200, Németország).

4.2.5 Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az R statisztikai szoftverrel végeztünk (4.4.3-as verzió, R Core Team, 2024) a ‘vegan’ (Oksanen és mtsai 2025), ‘ggplot2’ (Wickham, 2016) és ‘circlize’ (Gu és mtsai 2014) csomagok felhasználásával.

A kísérlet során alkalmazott algaoltás sikerességét Fisher teszttel vizsgáltuk. Egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze a kontroll és az algával kezelt minták szekvenálás eredményeiből számolt közösségi jellemzőit (fajgazdagság és Shannon-Wiener diverzitás). ADONIS2 elemzéseket végeztünk annak vizsgálatára, hogy az algával kezelt és a kontroll területek talaj közösségi összetétele (pro- és eukarióták esetében) szignifikánsan eltérő-e. Az elemzés során 999 permutációt alkalmaztunk. SIMPER tesztet használtuk azoknak a taxonómiai csoportoknak az azonosítására, amelyek a hozzájárultak hozzá a kontroll és a kezelt minták közötti szignifikáns különbségekhez. Egyutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk az algakezelések talajparaméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatára, amit GLM (Generalized linear model) modell segítségével ellenőriztük. Redundanciaanalízist (RDA) alkalmaztunk annak értékelésére, hogy a talajváltozók és a közösségösszetétel között milyen kapcsolat áll fenn, különös tekintettel azokra a taxonómiai egységekre, amelyek pozitív összefüggést mutatnak a kezeléssel. Az RDA-ban szereplő egyes kényszertényezők szignifikanciáját szintén ANOVA-val vizsgáltuk, 999 permutáció alkalmazásával.

4.3 Eredmények

4.3.1 Az algaoltás sikerességének vizsgálata

Az újraizolálás során a kontroll területről származó minták közül csak 20-ból 2-ben (10%) találtunk *Klebsormidium*-szerű morfológiát, míg az algával oltott területen ez az arány 20-ból

13 minta volt, ami 65%-os előfordulást jelent ($p=0,005$). Ez utóbbi esetben, a mintavétel időpontjában a talajfelszín jelentős részét már újonnan kialakult biológiai talajkéreg borította (30. ábra).



30. ábra *Klebsormidium* alkotta biológiai talajkéreg a kezelt talajfelszínen (forrás: saját)

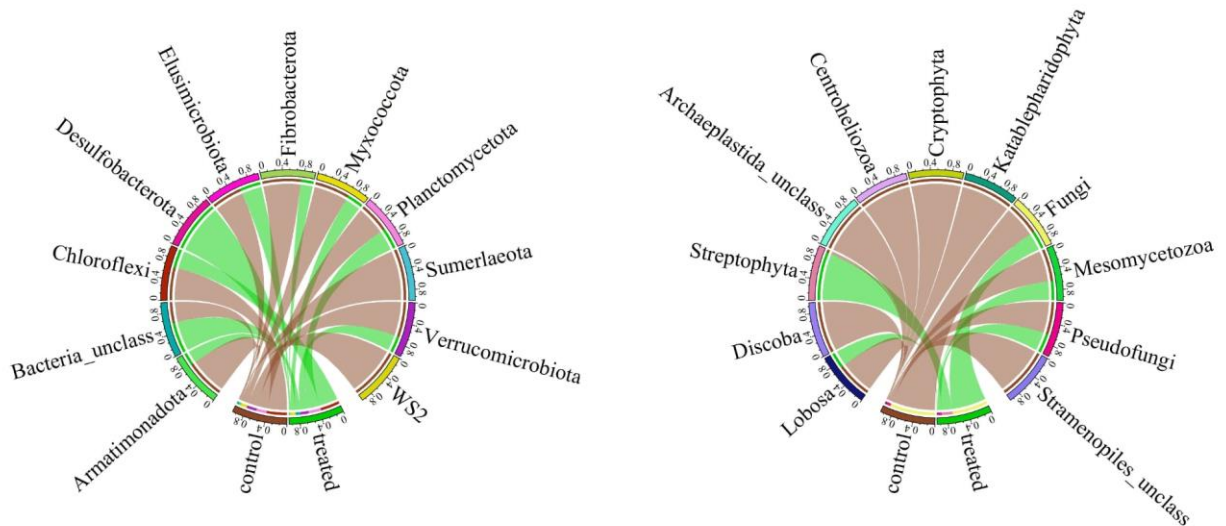
Az Illumina amplicon szekvenálás alapján a mintákban mindhárom ország - Bacteria, Archaea és Eukaryota – képviselői jelen voltak. A közösséget jellemző metrikákat tekintve az algával történt kezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást a Bacteria, Archaea és Eukaryota fajgazdagságára és diverzítására (3. táblázat).

3. táblázat A mikrobiális közösség különböző paramétereit Illumina amplitikon szekvenálással határoztuk meg a kontroll- és a kezelt területről származó talajminták alapján. A fajgazdagság és a Shannon–Wiener diverzitás esetében a 95%-os konfidenciaintervallumok zárójelben szerepelnek

	Kontroll	Kezelt	ANOVA	
			<i>F érték</i>	<i>p érték</i>
<i>Bacteria</i>				
Olvasások száma	13 957	18 062		
Lefedettség	0,993	0,989		
Fajszám	1064 (1050-1184)	1034 (1008-1069)	0,455	0,455
Diverzitás	5,65 (5,62-5,68)	5,45 (5,42-5,48)	2,574	0,140
<i>Archaea</i>				
Olvasások száma	485	346		
Lefedettség	0,995	0,997		
Fajszám	28 (25-34)	30 (29-34)	0,145	0,712
Diverzitás	1,66 (1,56-1,78)	1,79 (1,67-1,92)	2,864	0,121
<i>Eukaryota</i>				
Olvasások száma	10 499	10 494		
Lefedettség	0,998	0,997		
Fajszám	379 (374-390)	357 (351-369)	1,353	0,271
Diverzitás	4,14 (4,11-4,18)	3,94 (3,90-3,98)	1,800	0,210

A közösség összetételét tekintve azonban szignifikáns különbségek mutatkoztak a kontroll és a kezelt minták között (ADONIS2, $p = 0,004$). A SIMPER teszt alapján összesen 22 törzs esetében mutatkozott eltérés (11. ábra, 4a. és 4b. melléklet). A főbb baktérium törzsek, úm. az Actinobacteriota (az összes baktérium 33,9%-os átlagos relatív abundanciájával) és a Proteobacteria (25,9%) relatív arányában nem volt kimutatható szignifikáns eltérés ellentétben néhány kisebb abundanciájú (0,5% és 5% közötti átlagos relatív gyakoriság) baktérium törzssel (például a Chloroflexi, Myxococcota, Planctomycetota és Verrucomicrobiota törzsek esetében (31a. ábra). A legtöbb esetben a kezelés hatására csökkentek a törzsek abundanciái, ami alól csupán a *Desulfobacterota* és az osztályozatlan baktériumok képeztek kivételt, amelyek mennyiségére pozitívan hatott az algakezelés. Az eukariótákat tekintve, azon divíziók közül, amelyek legalább 1%-os átlagos relatív abundanciával rendelkeztek, egyedül a Streptophyta mutatott szignifikáns pozitív összefüggést a kezeléssel (31b. ábra). A vizsgált mintákban a Streptophyta tagjai kizárólag a Klebsormidiophyceae családba tartoztak, azonban nemzetség

szintű azonosításuk sajnos nem volt lehetséges, feltehetően a referencia-szekvenciák hiányos adatbázisban való reprezentációja miatt. Összességében az oltás sikerét az is megerősíti, hogy a Klebsormidiophyceae relatív abundanciája szignifikánsan magasabb volt a kezelt területen (2,87–12,21%), mint a kontroll területen (0,43–0,57%) ($p < 0,001$).



31. ábra A baktériumok (a) és az eukarióták (b) közösségi összetételében mutatkozó szignifikáns különbségek. A csomópontok a taxonómiai egységeket és az alkalmazott kezeléseket jelölik. A szalagok szélessége a taxonómiai egységek átlagos relatív abundanciájának arányát mutatja a kontroll (barna) és a kezelt (zöld) minták között. A baktériumok esetében a törzs-, míg az eukarióták esetében az osztály (divízió) szintű egységek szerepelnek.

4.3.2 A felszín morfológiájának változása a talajoltás hatására

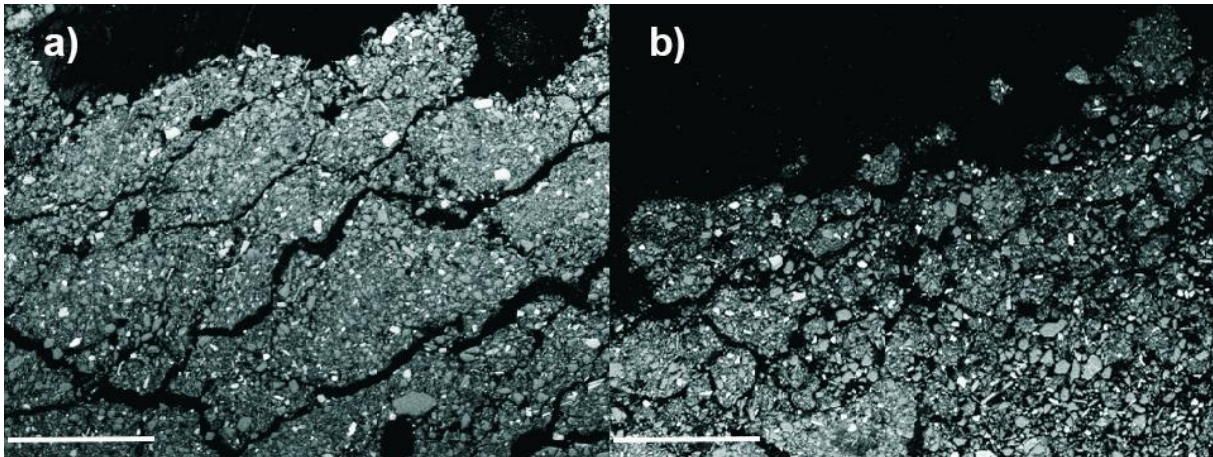
A vizsgálati területet tömörödött, erodált, megrepedezett talaj jellemezte szakértői megfigyelés alapján. Az alkalmazott nagy intenzitású mesterséges csapadék (3. táblázat) jelentősen csökkentette a felszín érdességét azáltal, hogy a kiemelkedő részeket lesimította, míg a mélyebb pontokon üledékekkel töltötte fel. A kontroll parcellán az esőcseppek hatására szétestek az aggregátumok, majd a létrejövő üledék hatására vízzáró fizikai kéreg képződött (32a, 32b ábra). Az algával kezelt parcellán a stabil felszíni szerkezet miatt a levált részecskék jellemzően aggregátumként ülepedtek le, így beszivárgást elősegítő szerkezetet alakítottak ki (32c ábra). Mindkét üledékképződési folyamat jelen volt valamennyi vizsgált parcellán, de a kezelt területeken magasabb arányban jelentek meg stabil aggregátumok megfigyeléseink alapján.



32. ábra A talajfelszín jellemzői esőzést követően: (a) a kezelt területen, ahol a fehér és sárga nyilak rendre az aggregált és az egyedi szemcsés üledékképződést jelzik; (b) aggregátumok nélküli talajfelszín a kontroll parcellán; (c) aggregátumok az algával kezelt parcellán. (Forrás: HUN-REN CSFKI)

Ezeket a megfigyeléseinket elektronmikroszkópos vizsgálatok is megerősítették, A kontroll területeken nagyobb arányban jelent meg az elemi szemcsék alkotta tömörödött agyag

bevonat a felszínen, míg az algával kezelt területeken az aggregált formában szállított hordalék és annak lerakódása dominált (33. ábra).



33. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek a tömörödött, szerkezet nélküli kontroll rétegről (a), valamint az aggregált, algával kezelt felszíni talajkéreg felületéről (b). Skála: 1 mm (Forrás: HUN-REN CSFKI)

4.3.3 Az algakezelés hatása a felszíni beszivárgási sebességre és a talajvesztésre

Összesen nyolc esőszimulációt végeztünk a vizsgált szántóföldi parcellákon. A kontroll és a kezelt parcellák végső beszivárgási és lefolyási sebességei nem mutattak szignifikáns eltéréseket (3. táblázat). Az esőszimuláció során azonban szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a talajvesztésben az algával kezelt parcellán ($0,276 \pm 28\%$, $\text{g mm}^{-1} \text{m}^{-2}$, $p = 0,013$), szemben a kontrollal ($0,399 \pm 19\%$, $\text{g mm}^{-1} \text{m}^{-2}$). Az ANOVA eredményeket a GLM modell is megerősítette, miszerint az adott paraméterek közül csupán a talajvesztés mutatkozott szignifikánsnak ($p = 0,001991$).

3. táblázat Az esőszimulációk főbb beállított paramétereit, valamint a meghatározott hidrológiai jellemzők és talajvesztés a kezeletlen (kontroll) és az algával kezelt területen ($0,05 > p > 0,01$; CV: variációs együttható)

Paraméter	Mértékegység	Kontroll				Kezelt				ANOVA
		Min.	Max.	Átlag	CV	Min.	Max.	Átlag	CV	p érték
Területe mérete	cm ²	6431	7266	6740	0,05	6464	7239	6684	0,06	0,836
Terület meredeksége	fok	5,00	5,00	5,00	0,00	4,00	5,00	4,75	0,11	0,356
Esőztetés intenzitása	mm h ⁻¹	39,50	54,30	44,33	0,15	36,60	47,30	41,00	0,11	0,447
Esőztetés hossza	s	1712	2339	1934	0,14	1526	2539	2091	0,21	0,570
Eső mennyisége	mm	18,60	26,20	22,93	0,15	19,20	27,50	22,80	0,15	0,961
Tócsásodás ideje	s	297	445	381	0,16	302	541	383	0,36	0,973
Végleges lefolyási intenzitás	mm h ⁻¹	14,04	21,60	16,65	0,21	12,60	22,68	16,20	0,28	0,880
Végleges beszivárgás intenzitása	mm h ⁻¹	22,60	32,70	27,70	0,15	21,20	27,30	24,83	0,11	0,296
Lefolyás ideje	s	457	1073	667	0,41	467	764	624	0,24	0,788
Talajvesztés	g mm ⁻¹ m ⁻²	0,399	0,707	0,549	0,28	0,276	0,382	0,315	0,19	0,013*

4.3.4 A talaj porozitásának és aggregátum-stabilitásának változása az algakezelés hatására

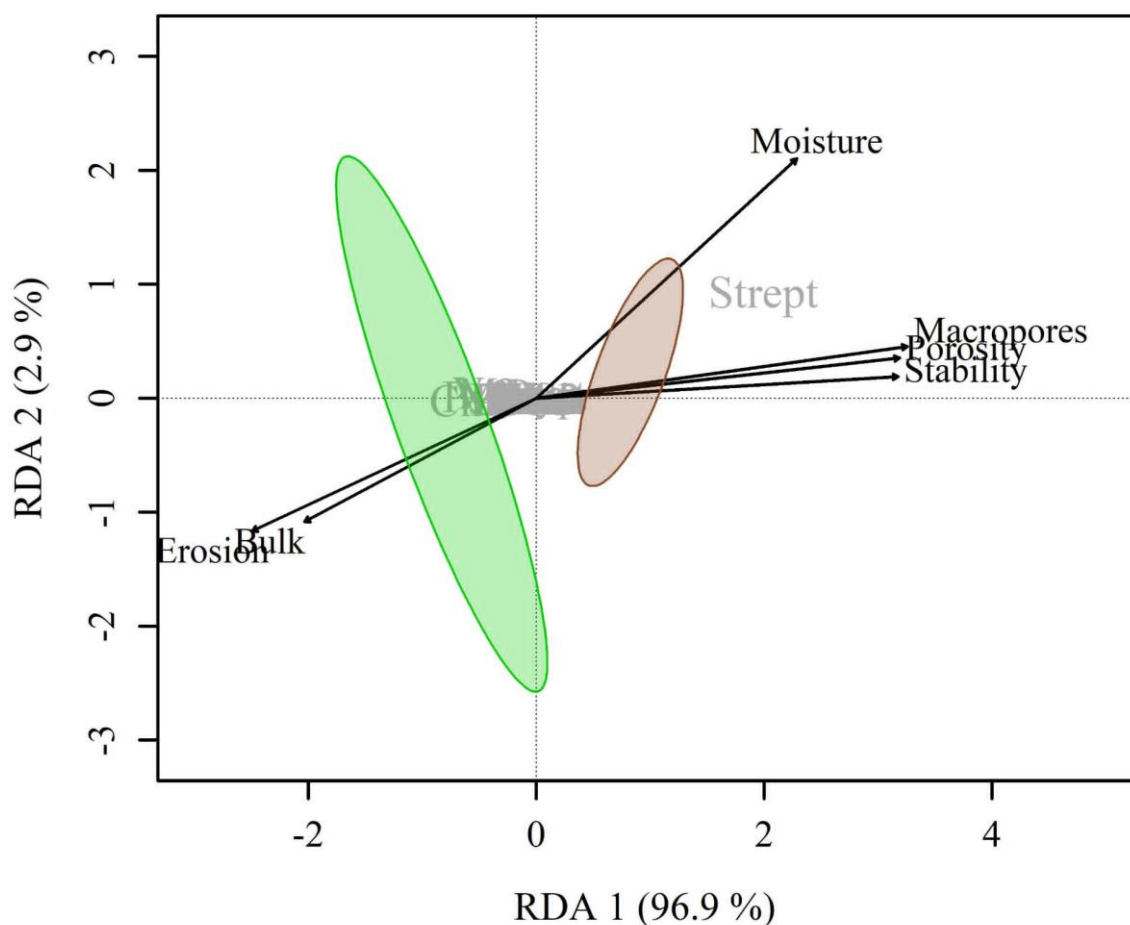
A talajparaméterekre vonatkozó részletes eredményeket az 4. táblázatban foglaltam össze. Az algával kezelt felső talajréteg teljes porozitása ($49,6 \pm 11,4\%$, v/v) szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll mintáké ($42,4 \pm 9,1\%$, $p=0,002$). Ez az eltérés összhangban volt a mért térfogattömeg értékekkel is, amelyek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kezelt területen ($1,33 \pm 10,8\%$ g cm⁻³) a kezeletlenhez képest ($1,44 \pm 5,1\%$ g cm⁻³, $p=0,048$). A fokozott porozitás elsősorban a makropórusok nagyobb arányának volt köszönhető a kezelt területen ($15,5 \pm 42,3\%$), szemben a kontroll értékkel ($10,2 \pm 22,7\%$, $p=0,020$). A mikropórusok térfogata nem változott jelentősen ($p=0,163$). A talaj nedvességtartalma szintén szignifikánsan magasabb volt a kezelt területeken ($6,4 \pm 0,2\%$, v/v), mint a kezeletleneken ($6,3 \pm 0,6\%$, $p=0,048$). Az algakezelés hatására megnőtt a vízstabil aggregátumok aránya is, átlagosan $23,7 \pm 9,3\%$ -ról $34,3 \pm 7,3\%$ -ra ($p=0,016$).

4. táblázat A kontroll- és kezelt területről származó talajminták porozitási paramétereit (*0,01<p<0,05, **0,001<p<0,01, ***p<0,001, CV: variációs együttható)

Parameter	Mértékegység	Kontroll				Kezelt				% különbség	ANOVA p érték
		Min.	Max.	Átlag	CV	Min.	Max.	Átlag	CV		
Mikropórusok	% (v/v)	23,22	35,52	32,17	0,10	27,71	36,30	34,06	0,08	6%	0,163
Makropórusok	% (v/v)	7,87	15,33	10,22	0,23	9,07	29,25	15,50	0,42	52%	0,020*
Porozitás	%	32,76	48,01	42,39	0,10	40,50	56,96	49,56	0,11	17%	0,002**
Térfogattömeg	g cm ⁻³	1,32	1,56	1,44	0,05	1,13	1,51	1,33	0,11	-8%	0,048*
Aggregátum-stabilitás	%	13,50	41,70	23,76	0,39	21,50	40,00	34,32	0,21	44%	0,016*
Talajnedvesség	%	6,05	6,54	6,27	2,49	6,07	6,76	6,41	3,16	2%	0,048*

4.3.5 Az RDA eredményei

A redundancia analízis eredményeit a 34. ábra foglalja össze, szürkével jelölve azon taxonokat, amelyek szignifikánsan megváltoztak a kezelés hatására. Az 1. és a 2. tengelyek együttesen a paraméterek varianciájának 99,8%-át magyarázzák. Látható, hogy a kontroll és kezelt minták jól elkülönülnek az 1. tengely mentén (96,9%), és hogy a kezelés szignifikánsan korrelál a Streptophyta abundanciájával (p=0,007). Az algakezelés szignifikánsan összefügg a magasabb makropórus arány, porozitás, aggregátum-stabilitás, nedvességtartalom, ill. alacsonyabb tömörség és talajerózió értékekkel.



34. ábra A redundancia analízis (RDA) kétdimenziós ábrája, amely a legjelentősebb prokarióta és eukarióta taxonómiai egységei, valamint különböző talajparaméterek közötti kapcsolatot mutatja be (barna: kontroll minták, zöld: algakezelt minták, Strept: Streptophyta, Erosion: talajvesztés, Bulk: tömörség, Moisture: talajnedvesség, Macropores: makropórusok, Micropores: mikropórusok, Stability: aggregátum-stabilitás, Porosity: porozitás)

4.4 Diskusszió

4.4.1 A mesterséges algaoltás sikere

Természetes körülmények között a BSC-k kialakulása általában több évet, extrém esetekben akár évtizedeket is igénybe vehet (Weber és mtsai 2016). Bebizonyosodott, hogy a talaj mikroalgákkal történő oltása jelentősen felgyorsíthatja ezt a folyamatot (Lababpour, 2016). Ezt még száraz körülmények között is kimutatták, amikor homokos felső talajréteget

cianobaktérium-keverékkel (*Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Phormidium* sp., *Scytonema* sp. és *Tolypothrix* sp.) inokuláltak. Annak ellenére, hogy az adott vizsgálati helyszíneken nem történt öntözés, 80 napos inkubációt követően akár 50%-os BSC-fedettséget is megfigyeltek (Zhao és mtsai 2021). Ezekkel az irodalmi adatokkal jó egyezésben eredményeink azt mutatták, hogy 4,5 hónap alatt *Klebsormidium*-dominanciájú BSC alakult ki szántóföldi körülmények között, és mindez jelentős hatást gyakorolt a talaj porozitására és nedvességtartalmára. A legjellemzőbb korai BSC-képző mikroorganizmusok a cianobaktériumok, zöldalgák, gombák és baktériumok (Guida és mtsai 2023). Az RDA-analízis során megerősítést nyert, hogy a vizsgált csoportok közül a Streptophyta-k gyakorolták a legjelentősebb hatást a különböző talajparaméterekre. A kontroll területen megfigyelt *Klebsormidium* jelenléte magyarázható egyrészt a szél általi terjedéssel, másrészt azzal, hogy ezek az algák természetes módon is előfordulhatnak a vizsgálati terület talajában.

4.4.2 *A talaj porozitálásában és aggregátum-stabilitásában bekövetkezett változások algakezelés hatására*

A biokéreg-képző mikroorganizmusok hozzájárulnak a talaj aggregálódásához (Gholamhosseinian és mtsai 2021). A porozitást tekintve a kontroll területeken alacsonyabb szórást mértünk, ami ezeknek a területeknek a kisebb heterogenitására utal, összehasonlítva a kezelt területekkel, ahol – feltételezhetően a megnövekedett biológiai aktivitás következtében – a térfogattömeg nagyobb mértékben változott. A kísérleteink során a mikropórusok száma nem változott az algával kezelt területen, míg a makropórusok száma nőtt. Ez összhangban van Al-Maliki és Ebreesum megfigyelésével (2020), akik szerint az algás kezelés növelte a makroaggregátumok képződését, de nem volt hatással a mikroaggregátumok mennyiségére. A talajnedvesség-tartalom jellemzően a mikroporozitással van összefüggésben, ami nem változott, ugyanakkor a biofilmek EPS-tartalma szintén befolyásolhatja a talaj víztartalmát (Rossi és mtsai 2012; Colica és mtsai 2014; Adessi és mtsai 2018). A *Klebsormidium* nemzetség tagjai képesek EPS-t kiválasztani (Halaj és mtsai 2018; Blanco és mtsai 2019), ami – a növekvő porozitással és csökkenő térfogatsűrűséggel együtt – valószínűsíthetően hozzájárult a kezelt talaj jobb vízmegtartásához. Ezt a jelenséget korábban természetes BSC-k esetében is megfigyelték (Xiao és mtsai 2019; Zheng és mtsai 2021; Sun és mtsai 2022, 2023; Li és mtsai 2024). A BSC-k felszíni párolgás csökkentő hatása is elősegítheti a talaj magasabb nedvességtartalmát, azonban az ezzel kapcsolatos kutatások eredményei nem egyértelműek, mivel vannak olyan eredmények, amik megerősítik ezt a hipotézist (George és mtsai 2003), míg vannak kutatások melyek nem számolnak be számottevő hatásról (Chamizo és mtsai 2013).

Bár az algák a talajfelszínen telepednek meg, jelentős hatással vannak a talajfelszín alatti talajparaméterekre is (Chatterjee és mtsai 2017). A kontroll és a kezelt területekről vett talajminták egyaránt rossz aggregátum stabilitást, degradált szerkezetet és kedvezőtlen hidrológiai viszonyokat mutattak, valószínűleg a konvencionális szántásos művelés miatt (Bartlová és mtsai 2015; Juhos és mtsai 2023). Ugyanakkor még ezek között a kedvezőtlen körülmények között is a kezelt terület talaja a felső 10 cm-es rétegében emelkedett aggregátum-stabilitást mutatott, ami nagy valószínűséggel az algás kezelés közvetett hatása. A megváltozott felszíni viszonyok ugyanis növelték a porozitást és a nedvességtartalmat még 10 cm mélységben is, ami fokozott biológiai aktivitást és jobb talajállapotot eredményezett. Ezek a hatások kapcsolatban állhatnak az algafonalak stabilizáló hatásával, valamint a biofilmek EPS-tartalmával. Ennek eredményeképp az algakezelés a felszín alatt is jelentősen javítja a talaj állapotát.

4.4.3 Az algakezelés hatása az erózióra

A betakarítás utáni talajállapot – amelyet növényzetmentes, tömörödött, kéreggel borított felszín jellemez – különösen kritikus időszakot jelent a csapadék-visszatartás és a talajvédelem szempontjából, mivel általában az ebben az időszakban bekövetkező eróziós események okozzák a legsúlyosabb talajpusztulást (Stathopoulos és mtsai 2017). A kísérlet 4,5 hónapos időtartama lefedi ezt a kritikus időszakot is. A BSC-k három fő mechanizmuson keresztül javíthatják a talajstabilitást ill. csökkenthetik az eróziót: (1) a csapadékcseppek felfogásával és a talaj esőcseppekkel szembeni ellenállásának növelésével, (2) a felszíni lefolyás térfogatának és sebességének csökkentésével a felszín érdességének és porozitásának növelésével, és (3) a talajaggregátumok stabilizálásával (Guida és mtsai 2023). A csapadékszimuláció során a csapadék intenzitását 40 mm óra^{-1} értékre állítottuk be. Ilyen intenzitású, 15 perces csapadékhullás átlagosan néhány évente fordul elő a vizsgálati területen, míg hasonló, egyórás események visszatérési valószínűsége körülbelül 15 év Magyarországon (Lakatos és mtsai 2020). Fontos megjegyezni, hogy a vizsgált talajfelszínen heterogenitások – repedések és érdességek – voltak megfigyelhetők. Eredményeink szerint a repedések elsősorban a korai infiltrációt segítették, majd néhány tíz percen belül záródtak, ahogy a csapadékhullás folytatódott. Így ezek nem gyakoroltak jelentős hatást a végső infiltrációs rátákra. Ezek a tulajdonságok befolyásolták a "lefolyás kezdetéig eltelt idő" paramétert is, amely inkább a felszín morfológiájához, mintsem a talajállapothoz kapcsolódik. Egyes tanulmányok beszámoltak a BSC miatti beszivárgás csökkenésről is (Li és mtsai 2016). Azonban a jelen vizsgálatban az algakezelés nem csökkentette a beszivárgást.

Eredményeink megerősítik azokat az irodalmi adatokat, amelyek az algák által előidézett biológiai kéregképződés hatására bekövetkező talajvesztés-csökkenésről számoltak be (Gao és mtsai 2017, 2020). Ez magyarázható az algafonalak stabilizáló szerepével, amely potenciálisan nagyobb szerepet játszik a talaj stabilizálásában, mint az általuk kiválasztott EPS (Bowker és mtsai 2008). Ezt a feltételezést tovább erősítik Lichner és munkatársai (2013) eredményei, akik szerint a fonalas *Klebsormidium subtile* jelentősebb hatást gyakorolt a talaj hidrológiai tulajdonságaira, mint a nem fonalas algatörzsek. Megfigyelték azt is, hogy a *K. subtile* elsősorban a talajfelszín kolonizálja, sokkal sűrűbb réteget képezve, mint más törzsek. A szerzők feltételezték, hogy a kialakuló BSC jelentős mértékben hozzájárul a tápanyag-visszatartáshoz és a párolgási veszteségek csökkentéséhez száraz időszakokban. Ugyanakkor megjegyezték azt is, hogy nedvesebb körülmények között ezek a kéregképződések fokozhatják a felszíni lefolyást és csökkenthetik a szivárgást.

4.4.4 Gyakorlati alkalmazhatóság

A vizsgált megközelítés, amely BSC-képző algakultúrák használatát javasolja a talajjavításra, zöld technológiának tekinthető, amelynek nincsenek ismert káros környezeti mellékhatásai. A kísérlet tervezése során a vizsgált algatenyészetten alapuló kereskedelmi forgalomban kapható termék engedélyokiratában rögzített alkalmazási dózissal dolgoztunk. Lényeges, hogy már nagyon alacsony kijuttatási dózis (10 L ha^{-1}) mellett is hatékony, így nem jelent számottevő anyagi terhet a végfelhasználók számára más talajjavító technológiákhoz képest (Sadeghi és mtsai 2020a). Laboratóriumi kísérletek igazolták, hogy az inokulációs dózis növelése mellett a *K. flaccidum* sivatagi homokon történő inokulációjának sikeressége tovább fokozható bioszén és agyag hozzáadásával (Zhang és Koehler 2022). A növények és fűvek termesztése árnyékot biztosíthat a BSC számára, mérsékelve a nedvességvesztését, megakadályozhatja az algasejtek kiszáradását (Meng és mtsai 2018). Az algatenyészet hatását olyan mezőgazdasági művelésbe bevont területen vizsgáltuk, amelyen talajkímélő művelést alkalmaznak, és amely a globális metaanalízisek alapján 80%-kal képes mérsékelni a mezőgazdasági területeken jelentkező átlagos talajpusztulást (Du és mtsai 2022). Szentgyörgyváron még ennél is nagyobb különbségeket mértek hét év talajpusztulásának az átlagát figyelembe véve a talajkímélő ($0,12 \text{ t ha}^{-1}$) és a konvencionális ($3,05 \text{ t ha}^{-1}$) talajműveléssel művelt szántóföldi területeken (Madarász és mtsai 2011). Megjegyezendő, hogy az algakezelés hatása ilyen mértékű eróziócsökkentő hatás mellett is jelentkezett. A talajra gyakorolt hatásaik mellett érdemes megemlíteni, hogy az algák jelentős mennyiségben tartalmaznak növényi hormonokat is, amelyek elősegíthetik a növények növekedését, növelhetik a termés hozamot és fokozhatják a

stressztűrést (González-Pérez és mtsai 2021). Az algák alkalmazásakor azonban kerülni kell a herbicidek és más, algaövekedést gátló vegyszerek használatát a kijuttatás idején. Továbbá hatásuk nem azonnali – a BSC réteg kialakulása jelentős időt vesz igénybe –, és fizikai bolygatás után a kéreg védőhatása jelentősen csökken, időre van szükség az újraképződéshez (Williams és mtsai 1995). A BSC kialakulására hatással vannak a talaj tulajdonságai, a rendelkezésre álló nedvesség és fény, a hőmérséklet, valamint a mikrobiális közösség összetétele is (Bu és mtsai 2014). A mintaterületre kijuttatott glifozát *Klebsormidium* tenyésztetre vonatkozott pontos hatásait nem ismerjük, ezért további vizsgálatok kellenek ennek felderítésére. Az algatenyésztet hosszú távú hatásainak, valamint a különböző környezeti tényezők (például talaj és éghajlat) és talajművelési módok szerepének vizsgálatára a jövőben további kísérleteket tervezünk.

5. Konklúzió

Munkám során egy kevésbé kutatott és ismert, barlangi környezetből izolált *Klebsormidium* törzs különféle tulajdonságait vizsgáltam elsősorban biotechnológiai szempontból. Először felmértem a törzs szántóföldi körülmények közötti potenciális alkalmazhatóságát, majd ezt követően meghatároztam a fotoszintézisnek és növekedésének hőmérsékleti és fény optimumát, végül kidolgoztam egy olyan módszert, amely alkalmas az alga tenyészetének BR (brassinoszteroid) tartalmának meghatározására.

A szántóföldi vizsgálatok során a *Klebsormidium* ill. a segítségével létrehozott BSC talajparaméterekre gyakorolt kedvező hatását figyeltem meg. A kéreg jelenlétében számottevő növekedés volt tapasztalható a talaj aggregátum-stabilitásában, porozitásában és víz megtartó képességében. Mindemellett, a talajeróziót is szignifikánsan csökkentti. A *Klebsormidium* tenyészet alkalmazása szántóföldi körülmények között ígéretes “zöld” biotechnológiai megoldás lehet az erózió sújtott talajok rehabilitációja során. Fontos kiemelni, hogy a módszer már nagyon alacsony alkalmazási dózis (10 L/ha) mellett is pozitív hatásokat idézhet elő, így a hasonló célú talajvédelmi technikákhoz képest lényegesen olcsóbb megoldást jelenthet.

A vizsgált barlangi eredetű *Klebsormidium* törzs tenyésztete széles hőmérsékleti tartományban képes fotoszintézisre és növekedésre, és tolerálja a magas fényintenzitásokat anélkül, hogy fotoinhibíciót szenvedne. Megállapítottam, hogy fotoszintézisének hőmérsékleti maximuma eltér a tenyésztési vizsgálatok során megállapított tenyésztési optimumtól, hasonlóan egyes sarkvidéki algafajokhoz. Bizonyítottam továbbá, hogy a sejten belüli brasszinoszteroid-szintek ebben a törzsben nagymértékben függenek az alkalmazott hőmérséklettől: a legmagasabb BR értékeket hőmérsékleti stressz alatt kaptam.

Rizs levéllemez elhajlási biotesztet (RLIA) alkalmaztam a vizsgált *Klebsormidium* tenyészet brasszinoszteroid tartalmának meghatározására. Eredményeim alapján a módszer közelítő becslést adhat a celluláris brasszinoszteroid-szintről, amit UHPLC-MS/MS analízissel validáltam. Noha a módszer pontossága elmarad a korszerű analitikai módszerekétől, az RLIA egyszerű és olcsó alternatívát nyújt a brasszinoszteroidok mennyiségi meghatározására.

Összeségében elmondható, hogy a vizsgált törzs biotechnológiai szempontból számos ígéretes tulajdonsággal rendelkezik: jól tenyészhető, magas a brasszinoszteroid tartalommal rendelkezik, és a segítségével létrehozott biológiai kéreg pozitív hatást fejt ki a degradált talajra –, ami alátámasztja alkalmazhatóságát, mint talajoltó, és talajjavító anyag.

6. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Bernát Gábornak és Dr. Lengyel Edinának, akik munkámat nemcsak szakmailag, hanem emberileg is segítették. Külön köszönöm türelmüket, támogatásukat és iránymutatásukat, amelyek nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm Dr. Kutasi Józsefnek, külső témavezetőmnek, hogy bevezetett a mikroalgák lenyűgöző világába, és szakmai támogatásával hozzájárult munkám fejlődéséhez.

Köszönöm Prof. Dr. Padisák Juditnak, hogy értékes tanácsaival és támogatásával hozzájárult szakmai fejlődésemhez.

Köszönöm testvéremnek és egyben munkatársamnak, Futó Máténak a végtelen türelmet, odaadást és támogatást, amit a képzés évei során tanúsított irányomba.

Hálás köszönet illeti munkahelyemet az Albitech Biotechnológiai Kft-t, amiért támogatta tanulmányaimat. Köszönöm Daoda Zoltán ügyvezetőnek, valamint a cég dolgozóinak (Dr. Murvai Nikoletta) a segítségét és a biztatást.

Köszönettel tartozom a Pannon Egyetem Limnológia Kutatócsoport (Zsuga-Biró Rita), a HUN-REN Balatoni Limnológiai Kutatóintézet (Dr. Pirger Zsolt, Németh Zoltán, Dr. Komáromy András, Burányi Máté) a HUN-REN Csillagászati és Földtudományi Kutatóközpont (Dr. Madarász Balázs, Dr. Jakab Gergely), Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezettudományi Intézet (Dr. Jancsó Mihály), a HUN-REN Ökológiai Kutatóközpont (Dr. Felföldi Tamás, Dr. Szabó Attila) munkatársainak is, akik hozzájárultak munkám megvalósításához.

Szívből szeretném megköszönni Szüleimnek, Nagyszüleimnek a feltétlen szeretetet, támogatást, amelyet kaptam tőlük. Külön szeretném megköszönni sógornőmnek Futóné Németh Dórának, valamint keresztlányomnak Futó Rékának és unokaöcsémnek Futó Máté Samunak a támogatásukat, és a derűs perceket.

7. Hozzájárulás

A dolgozat elkészítése során az összes kísérlethez szükséges algatenyészetet saját magam állítottam elő, továbbá aktívan részt vettem a kísérletek tervezésében, az adatok elemzésében és az eredmények kiértékelésében. A további hozzájárulásaim az alábbi témakörök szerint foglalhatók össze:

- **Barlangból izolált *Klebsormidium* törzs ökofiziológiai vizsgálata:**
 - klorofill fluoreszcencia és oxigéntermelésen alapuló fotoszintetikus vizsgálatok,
 - klorofill mérés tenyészetekből,
 - tenyészetek extrakciója,
 - mintaelőkészítés analitikai mérésekhez.

- **Rizslevéllemez-elhajlási bioteszt kidolgozása *Klebsormidium* algatenyészetek brasszinoszteroid tartalmának meghatározására**
 - biotesztek végrehajtása,
 - mintaelőkészítés analitikai vizsgálatokhoz,
 - tenyészetek extrakciója,
 - oldószercsere szilárd fázisú extrakcióval.

- **Alga-dominált biológiai talajkéreg hatása a talajra**
 - talajmintavétel,
 - visszaizolálási vizsgálatok.

8. Tézis pontok

1. Barlangból izolált *Klebsormidium* törzs ökofiziológiai vizsgálata

A vizsgált barlangi eredetű *Klebsormidium* törzs széles hőmérséklettartományban képes fotoszintézisre (5-45°C) és növekedésre (10-40°C). A törzs fotoszintetikus optimuma [30-40°C (P_{max}), illetve 35-40°C ($rETR_{max}$)] magasabb, mint a növekedési optimuma (20-25°C). A törzs magas fényhasznosítási tényezővel (α), és alacsony fényadaptációs paraméterrel (I_k) rendelkezik. Az optimális tenyésztési hőmérséklet, valamint a tenyészetek intracelluláris brasszinoszteroid tartalma között negatív korreláció figyelhető meg.

2. Rizslevéllemez teszt kidolgozása *Klebsormidium* algatenyészetek brasszinoszteroid tartalmának kimutatására

A rizslevéllemez-elhajlási bioteszthez (RLIA) a vizsgált rizsfajták közül – 'Arsenal', 'Hoshinoyume', 'M 60', 'Koshihikari' – a 'Koshihikari' bizonyult a legjobban alkalmazhatónak a 0,001-0,1 mg L⁻¹ brasszínolid tartományban. Az alga sejttömegből kivont metanolos minta, metanol-víz oldószercserét követően alkalmazható RLIA-ban. A kidolgozott módszer segítségével becsültük meg a vizsgált *Klebsormidium* tenyészet brasszinoszteroid (BR) tartalmát. Pontos és megbízható összefüggést mutattam ki a RLIA és BR koncentrációk közt [(R²: 0,947; RSE: 6,8% (Residual Standard Error – reziduumok szórása) és RMSE: 16,8% (root mean square error – négyzetes gyök átlagos hiba)].

3. Alga-domináns biológiai talajkéreg hatása a talajra

A kísérlet során a kijuttatott *Klebsormidium* algatenyészet a kezdetben száraz időjárási feltételek mellett is életképes maradt, és biológiai talajkéreget képezett mezőgazdasági termelésbe bevett gyengén erodált, vályog mechanikai összetételű, agyagbemosódásos barna erdőtalajon. A kialakult *Klebsormidium*-domináns biológiai talajkéreg hatására szignifikánsan javult az erodált talaj szerkezete, amit a porozitás (+17%), a makropórusok (+52%) és stabil aggregátumok arányának növekedése (+44%), valamint a talaj térfogattömegének csökkenése (-8%) is alátámasztott. A kijuttatott *Klebsormidium* talajoltó tenyészet képes az eróziós veszteségek csökkentésére (-43%).

9. Key Results in Thesis Points

1. Ecophysiological Investigation of a Cave-Isolated *Klebsormidium* Strain

The investigated cave-origin *Klebsormidium* strain is capable of photosynthesis over a wide temperature range (5–45°C) and growth between 10–40°C. Its photosynthetic optimum [30–40°C (P_{\max}) and 35–40°C ($rETR_{\max}$)] is higher than its growth optimum (20–25°C). The strain exhibits high light-use efficiency (α) and a low light adaptation parameter (I_k). A negative correlation was observed between the optimal cultivation temperature and the intracellular brassinosteroid content of the cultures.

2. Development of Rice lamina inclination Test for Detecting Brassinosteroid Content in *Klebsormidium* Cultures

Among the rice varieties tested for the rice lamina inclination bioassay (RLIA) – ‘Arsenal’, ‘Hoshinoyume’, ‘M 60’, and ‘Koshihikari’ – ‘Koshihikari’ proved to be the most suitable for the 0.001–0.1 mg L⁻¹ BL range. Methanolic samples extracted from algal biomass can be applied in the RLIA after a methanol-water solvent exchange. Using the developed method, the brassinosteroid content of the investigated *Klebsormidium* cultures was estimated. I demonstrated a precise and reliable correlation between RLIA and BR concentrations [R²: 0.947; RSE: 6.8% (Residual Standard Error) and RMSE: 16.8% (Root Mean Square Error)].

3. Effect of Alga-Dominated Biological Soil Crust on Soil

In the experiment, the applied *Klebsormidium* culture remained viable even under initially dry conditions and formed a biological soil crust on weakly eroded, loamy, clay-illuvial brown forest soil commonly used in agricultural production. The resulting *Klebsormidium*-dominated crust significantly improved the structure of the eroded soil, as indicated by increases in porosity (+17%), macropores (+52%), and the proportion of stable aggregates (+44%), along with a decrease in bulk density (-8%). The inoculated *Klebsormidium* culture was also able to reduce erosion losses by 43%.

10. Publikációs lista

1. Futó Péter, Lengyel Edina, Futó Máté, Németh Zoltán, Pirger Zsolt, Komáromy András, Padiák Judit, Felföldi Tamás, Kutasi József, Bernát Gábor: Ecophysiological characterisation of a *Klebsormidium* strain isolated from a cave environment *Journal of Applied Phycology* 36, 1197–1208 (2024)
2. Futó Péter, Kutasi József, Lengyel Edina, Futó Máté, Murvai Nikoletta, Jancsó Mihály, Bernát Gábor: Straightforward method for brassinosteroid detection in microalgae. *Acta Physiologiae Plantarum*: 46, 25 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11738-024-03649-5>
3. Futó Péter, Kutasi József, Lengyel Edina, Bernát Gábor: *Klebsormidium* sp. BEA_IDA_0061B fonalas zöldalga fotoszintetikus aktivitásának fény és hőmérsékleti optimuma. *HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY* (0018-1323): 102 1 pp 43-47 (2022)
4. Zsigrai György, Futó Péter, Kovács Tibor, Daoda Zoltán, Kutasi József: Egy talajalgakészítmény erózióvédelmi potenciáljának vizsgálata a Tokaji borvidéken *BORÁSZATI FÜZETEK* 32 : 3 pp. 31-36. , 6 p. (2022)
5. Futó Péter, Kutasi József, Zsigrai György, Daoda Zoltán: A biológiai talajbevonatok jelentősége és talajvédelmi szerepe. *SZŐLŐ-LEVÉL* 10: 36-44. (2020)

11. Konferencia részvételek

Hazai konferencia

1. Futó Péter, Lengyel Edina, Futó Máté, Németh Zoltán, Pirger Zsolt, Komáromy András, Padisák Judit, Felföldi Tamás, Kutasi József, Bernát Gábor: Egy biotechnológiai jelentőségű *Klebsormidium* törzs ökofiziológiai vizsgálata, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2024. évi Nagygyűlése, Siófok 2024. október 16-18.
2. Futó Péter, Lengyel Edina, Futó Máté, Németh Zoltán, Pirger Zsolt, Komáromy András, Padisák Judit, Felföldi Tamás, Kutasi József, Bernát Gábor: Ecophysiological characterisation of a *Klebsormidium* strain isolated from a cave environment, poszterelőadás, FIBOK 2024 - Fiala Biotechnológusok VI. Országos Konferenciája, Martonvásár, 2024. április 4-5.
3. Futó Péter, Kutasi József, Lengyel Edina, Bernát Gábor *Klebsormidium* sp. fonalas zöldalga fény-, és hőmérsékleti optimumának meghatározása LXII. Hidrobiológus Napok, Tihany 2021. október 6-8.
4. Futó Péter, Madarász Balázs, Bernát Gábor, Futó Máté, Jakab Gergely, Kutasi József: A talajpusztulás és talajszerkezet összehasonlító vizsgálata biológiai talajkéreget képző alga készítménnyel kezelt erózió és talajszáradás sújtotta termőterületeken. Első Országos Interdiszciplináris Éghajlatváltozási Tudományos Konferencia, online, 2021. április 12-15.
5. Futó Péter: *Klebsormidium* sp. BEA IDA_0061B algatenyészet brasszinoszteroid tartalmának kimutatása HPLC fluorimetriás eljárással, rizslevéllemez elhajlási bioteszt optimalizálása. Tavaszi Szél Konferencia, online, 2020. október 16.

Nemzetközi konferencia

1. Futó Péter, Madarász Balázs, Zsigrai György, Bernát Gábor, Futó Máté, Jakab Gergely, Daoda Zoltán, Kutasi József: The importance of biological soil crust forming microalgal cultures on soil in croplands and vineyards vulnerable to erosion, Budapest Soil Health Forum, Budapest 2024. december 4.
2. Futó Péter, Madarász Balázs, Zsigrai György, Bernát Gábor, Futó Máté, Jakab Gergely, Daoda Zoltán, Kutasi József: Investigating the effect of biological soil crust forming microalgal cultures on soil in erosion-prone croplands and vineyards, International Conference and TUDI Workshop on Alternatives to Reduce Soil Degradation, Budapest 2024. május 7.

3. Futó Péter, Madarász Balázs, Bernát Gábor, Futó Máté, Jakab Gergely, Kutasi József: Comparative analysis of soil degradation and soil structure in croplands affected by erosion and soil dehydration treated with a biological soil crust forming algal culture, AlgaEurope 2022, Róma, Olaszország 2022. december 13-15.
4. Futó Péter, Madarász Balázs, Bernát Gábor, Futó Máté, Jakab Gergely, Kutasi József Comparative analysis of soil degradation and soil structure in croplands affected by erosion and soil dehydration treated with a biological soil crust forming algal culture: A talajpusztulás és talajszerkezet összehasonlító vizsgálata biológiai talajkérget képző alga tenyésztéssel kezelt erózió és talajszáradás sújtotta termőterületeken, V. Kriptogám Konferencia, Eger 2021. november 25 – 26.

12. Irodalomjegyzék

- Adessi A, Cruz de Carvalho R, De Philippis R, és mtsai (2018) Microbial extracellular polymeric substances improve water retention in dryland biological soil crusts. *Soil Biol Biochem* 116:67–69. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.002>
- Ahanger MA, Ashraf M, Bajguz A, Ahmad P (2018) Brassinosteroids regulate growth in plants under stressful environments and crosstalk with other potential phytohormones. *J Plant Growth Regul* 37:1007–1024. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9855-2>
- Albitech Biotechnológiai Kft, Alga oltóanyag. Kutasi J, Futó P, Bencsik A, és mtsai (2018), Magyarország HU1800183A2, 2018.12.28.
- Ali B (2019) Brassinosteroids: The promising plant growth regulators in horticulture. In: *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*. Springer Singapore, Singapore, pp 349–365
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, és mtsai (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* 98:541–550. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0>
- Al-Maliki S, Ebreesum H (2020) Changes in soil carbon mineralization, soil microbes, roots density and soil structure following the application of the arbuscular mycorrhizal fungi and green algae in the arid saline soil. *Rhizosphere* 14:100203. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100203>
- Altman A, Hasegawa PM (2012) Introduction to plant biotechnology 2011: Basic aspects and agricultural implications. In: *Plant Biotechnology and Agriculture*. Elsevier, pp xxix–xxxviii
- Alvarez AL, Weyers SL, Goemann HM, és mtsai (2021) Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Res* 54:102200. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>
- Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 75:129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Bajguz A (2009) Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). *J Plant Physiol* 166:1946–1949. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.003>
- Bajguz A, Hayat S (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem* 47:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
- Bajguz A, Piotrowska-Niczyporuk A (2013) Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris*

- (Trebouxiophyceae). *Plant Physiol Biochem* 71:290–297.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.003>
- Baron NC, Rigobelo EC (2022) Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology* 13:39–55.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>
- Bartlová J, Badalíková B, Pospíšilová L, és mtsai (2015) Water stability of soil aggregates in different systems of tillage. *Soil Water Res* 10:147–154.
<https://doi.org/10.17221/132/2014-swr>
- B-Béres V, Stenger-Kovács C, Buczkó K, és mtsai (2023) Ecosystem services provided by freshwater and marine diatoms. *Hydrobiologia* 850:2707–2733.
<https://doi.org/10.1007/s10750-022-04984-9>
- Beer S, Mtolera M, Lyimo T, Björk M (2006) The photosynthetic performance of the tropical seagrass *Halophila ovalis* in the upper intertidal. *Aquat Bot* 84:367–371.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.11.007>
- Beer S, Waisel Y (1982) Effects of light and pressure on photosynthesis in two seagrasses. *Aquat Bot* 13:331–337. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(82\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0304-3770(82)90068-7)
- Beigbeder J-B, Lavoie J-M (2022) Effect of photoperiods and CO₂ concentrations on the cultivation of carbohydrate-rich *P. kessleri* microalgae for the sustainable production of bioethanol. *J CO₂ Util* 58:101934. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.101934>
- Beijerinck MW (1890) Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niedere. *Algen Bot Ztg* 48:781–788, 1890. <https://doi.org/725-772>
- Belnap J (2016) Biological Crusts. In: *Encyclopedia of Soil Science, Third Edition*. CRC Press, pp 216–219
- Belnap J, Büdel B (2016) Biological soil crusts as soil stabilizers. In: *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*. Springer International Publishing, Cham, pp 305–320
- Ben Mrid R, Benmrid B, Hafsa J, és mtsai (2021) Secondary metabolites as biostimulant and bioprotectant agents: A review. *Sci Total Environ* 777:146204.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146204>
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:11–18.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Berry J, Bjorkman O (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 31:491–543.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.002423>

- Bhattacharya D, Medlin AL (1998) Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol* 116:9–15. <https://doi.org/10.1104/pp.116.1.9>
- Björn LO és Govindjee (2009) The Evolution of Photosynthesis and Chloroplasts. *Curr Sci* 96: 1466–74. <http://www.jstor.org/stable/24104775>
- Blanco Y, Rivas LA, González-Toril E, és mtsai (2019) Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments. *Sci Total Environ* 650:384–393. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.440>
- Borchhardt N, Gründling-Pfaff S (2020) Ecophysiological response against temperature in *Klebsormidium* (Streptophyta) strains isolated from biological soil crusts of arctic and Antarctica indicate survival during global warming. *Front Ecol Evol* 8:153 <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00153>
- Borrelli P, Robinson DA, Panagos P, és mtsai (2020) Land use and climate change impacts on global soil erosion by water (2015-2070). *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:21994–22001. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001403117>
- Borowitzka MA (2013) Energy from microalgae: A short history. In: *Algae for Biofuels and Energy*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 1–15
- Bowker MA, Belnap J, Bala Chaudhary V, Johnson NC (2008) Revisiting classic water erosion models in drylands: The strong impact of biological soil crusts. *Soil Biol Biochem* 40:2309–2316. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.008>
- Briantais J-M, Vernotte C, Krause GH, Weis E (1986) Chlorophyll a fluorescence of higher plants: Chloroplasts and leaves. In: *Light Emission by Plants and Bacteria*. Elsevier, pp 539–583
- Bu C, Wu S, Xie Y, Zhang X (2013) The study of biological soil crusts: Hotspots and prospects. *Clean (Weinh)* 41:899–906. <https://doi.org/10.1002/clen.201100675>
- Bu C, Wu S, Yang Y, Zheng M (2014) Identification of factors influencing the restoration of cyanobacteria-dominated biological soil crusts. *PLoS One* 9:1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090049>
- Bud R (1989) History of “biotechnology.” *Nature* 337:10. <https://doi.org/10.1038/337010a0>
- Büdel B, Colesie C, Green TGA, és mtsai (2014) Improved appreciation of the functioning and importance of biological soil crusts in Europe: the Soil Crust International Project (SCIN). *Biodivers Conserv* 23:1639–1658. <https://doi.org/10.1007/s10531-014-0645-2>
- Bulthuis DA, Woelkerling WJ (1983) Biomass accumulation and shading effects of epiphytes on leaves of the seagrass, *Heterozostera tasmanica*, in Victoria, Australia. *Aquat Bot* 16:137–148. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(83\)90089-x](https://doi.org/10.1016/0304-3770(83)90089-x)

- Caesar J, Tamm A, Ruckteschler N, és mtsai (2018) Revisiting chlorophyll extraction methods in biological soil crusts – methodology for determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *a + b* as compared to previous methods. *Biogeosciences* 15:1415–1424. <https://doi.org/10.5194/bg-15-1415-2018>
- Campbell SE, Seeler J-S, Golubic S (1989) Desert crust formation and soil stabilization. *Arid Soil Res Rehabil* 3:217–228. <https://doi.org/10.1080/15324988909381200>
- Centeri C, Jakab G, Szalai Z, és mtsai (2011) Rainfall simulation studies in Hungary. In: Fournier AJ (ed) *Soil Erosion: Causes, Processes and Effects*. Nova Science, New York, NY, pp 177–217
- Chakraborty N, Ganguly R, Sarkar A, és mtsai (2025) Multifunctional role of brassinosteroids in plant growth, development, and defense. *J Plant Growth Regul* 44:2627–2640. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11593-4>
- Chamizo S, Adessi A, Mugnai G, és mtsai (2019) Soil type and Cyanobacteria species influence the macromolecular and chemical characteristics of the polysaccharidic matrix in induced biocrusts. *Microb Ecol* 78:482–493. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1305-y>
- Chamizo S, Cantón Y, Domingo F, Belnap J (2013) Evaporative losses from soils covered by physical and different types of biological soil crusts. *Hydrol Process* 27:324–332. <https://doi.org/10.1002/hyp.8421>
- Chamizo S, Cantón Y, Miralles I, Domingo F (2012) Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. *Soil Biol Biochem* 49:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.02.017>
- Chatterjee A, Singh S, Agrawal C, és mtsai (2017) Role of Algae as a Biofertilizer. In: *Algal Green Chemistry*. Elsevier, pp 189–200
- Chen B, Wan C, Mehmood MA, és mtsai (2017) Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review. *Bioresour Technol* 244:1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.170>
- Choi Y-K, Kim H-J, Kumaran RS, és mtsai (2017) Enhanced growth and total fatty acid production of microalgae under various lighting conditions induced by flashing light. *Eng Life Sci* 17:976–980. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700001>
- Colica G, Li H, Rossi F, és mtsai (2014) Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soils. *Soil Biol Biochem* 68:62–70. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.017>
- Dahoumane SA, Djediat C, Yéprémian C, és mtsai (2012) Recycling and adaptation of *Klebsormidium flaccidum* microalgae for the sustained production of gold nanoparticles. *Biotechnol Bioeng* 109:284–288. <https://doi.org/10.1002/bit.23276>

- Dauda WP, Zarafi A (2019) Exploring the importance of fungi in agricultural biotechnology. *Int J Appl Res Vet Med* 7:(1)
- Davison IR (1991) Environmental effects on algal photosynthesis. *Journal of Phycology* 27:2–8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x>
- Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson KF, Krishna P (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol Biol* 40:333–342. <https://doi.org/10.1023/a:1006283015582>
- Dineshkumar R, Subramanian J, Gopalsamy J, és mtsai (2019) The impact of using microalgae as biofertilizer in maize (*Zea mays* L.). *Waste Biomass Valorization* 10:1101–1110. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0123-7>
- Döbereiner J, Day JM (1976) Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Newton, W, E, Nyman, C, J (eds) *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press, Pullman, Washington, pp 518–538
- Donner A, Glaser K, Borchhardt N, Karsten U (2017) Ecophysiological response on dehydration and temperature in terrestrial *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests. *Microb Ecol* 73:850–864. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0917-3>
- Drew E (1977) The physiology of photosynthesis and respiration in some Antarctic marine algae. *Br Antarct Surv Bull* 46:59–76
- Du X, Jian J, Du C, Stewart RD (2022) Conservation management decreases surface runoff and soil erosion. *Int Soil Water Conserv Res* 10:188–196. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2021.08.001>
- Eilers PHC, Peeters JCH (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Modell* 42:199–215. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(88\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0304-3800(88)90057-9)
- Eldridge DJ, Leys JF (2003) Exploring some relationships between biological soil crusts, soil aggregation and wind erosion. *J Arid Environ* 53:457–466. <https://doi.org/10.1006/jare.2002.1068>
- Fang H, Zhuang Z, Huang L, és mtsai (2022) Dietary *Klebsormidium* sp. Supplementation improves growth performance, antioxidant and anti-inflammatory status, metabolism, and mid-intestine morphology of *Litopenaeus vannamei*. *Front Nutr* 9:857351. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.857351>
- Ferreira A, Bastos CRV, Marques-dos-Santos C, és mtsai (2023) Algaeculture for agriculture: from past to future. *Front Agron* 5: 1064041. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1064041>

- Fischer T, Yair A, Veste M, Geppert H (2013) Hydraulic properties of biological soil crusts on sand dunes studied by ^{13}C -CP/MAS-NMR: A comparison between an arid and a temperate site. *Catena* 110:155–160. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.06.002>
- Fletcher RA, Kallidumbil V, Steele P (1982) An improved bioassay for cytokinins using cucumber cotyledons. *Plant Physiol* 69:675–677. <https://doi.org/10.1104/pp.69.3.675>
- Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, és mtsai (1995) Biological activities of biosynthetically-related congeners of brassinolide. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:1973–1975. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1973>
- Gaffron H, Rubin J (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol* 26:219–240. <https://doi.org/10.1085/jgp.26.2.219>
- Gamoh K, Okamoto N, Takatsuto S, Tejima I (1990) Determination of traces of natural brassinosteroids as dansylaminophenylboronates by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal Chim Acta* 228:101–105. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)80484-5](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)80484-5)
- Gao L, Bowker MA, Xu M, és mtsai (2017) Biological soil crusts decrease erodibility by modifying inherent soil properties on the Loess Plateau, China. *Soil Biol Biochem* 105:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.009>
- Gao L, Sun H, Xu M, Zhao Y (2020) Biocrusts resist runoff erosion through direct physical protection and indirect modification of soil properties. *J Soils Sediments* 20:133–142. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02372-w>
- Garcia-Gonzalez J, Sommerfeld M (2016) Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J Appl Phycol* 28:1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>
- George DB, Roundy BA, St. Clair LL, et al (2003) The effects of microbiotic soil crusts on soil water loss. *Arid Land Res Manage* 17:113–125. <https://doi.org/10.1080/15324980301588>
- Gholamhosseinian A, Sepehr A, Asgari Lajayer B, és mtsai (2021) Biological soil crusts to keep soil alive, rehabilitate degraded soil, and develop soil habitats. In: *Microbial Polymers*. Springer Singapore, Singapore, pp 289–309
- Glaser K, Baumann K, Leinweber P, és mtsai (2018) Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences* 15:4181–4192. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4181-2018>
- Glaser K, Donner A, Albrecht M, és mtsai (2017) Habitat-specific composition of morphotypes with low genetic diversity in the green algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests. *Eur J Phycol* 52:188–199. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1235730>

- Goldman JC (1979) Outdoor algal mass cultures—I. Applications. *Water Res* 13:1–19. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(79\)90249-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90249-5)
- Gonçalves AL (2021) The use of microalgae and Cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: A review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. *Appl Sci (Basel)* 11:871. <https://doi.org/10.3390/app11020871>
- González-Pérez BK, Rivas-Castillo AM, Valdez-Calderón A, Gayosso-Morales MA (2021) Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 38:4. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03192-2>
- Grama SB, Liu Z, Li J (2022) Emerging trends in genetic engineering of microalgae for commercial applications. *Mar Drugs* 20:285. <https://doi.org/10.3390/md20050285>
- Greipel E, Kutasi J, Solymosi K, és mtsai (2023) Hidden diversity of *Chlorococcum* (Chlorophyta) in a shallow temporary freshwater lake: description of *Chlorococcum szentendrense* sp. nov. *Eur J Phycol* 58:110–120. <https://doi.org/10.1080/09670262.2022.2076291>
- Grobbelaar JU (2012) Microalgae mass culture: the constraints of scaling-up. *J Appl Phycol* 24:315–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9728-6>
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, és mtsai (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281:216–217. <https://doi.org/10.1038/281216a0>
- Gu Z, Gu L, Eils R, és mtsai (2014) circlize Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30:2811–2812. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu393>
- Guida G, Nicosia A, Settanni L, Ferro V (2023) A review on effects of biological soil crusts on hydrological processes. *Earth Sci Rev* 243:104516. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2023.104516>
- Guillou L, Bachar D, Audic S, és mtsai (2013) The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res* 41:D597-604. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>
- Guiry MD, Guiry GM, Morrison L, és mtsai (2014) AlgaeBase: An on-line resource for algae. *Cryptogam Algal* 35:105–115. <https://doi.org/10.7872/crya.v35.iss2.2014.105>
- Habig J, Hassen AI, Swart A (2015) Application of microbiology in conservation agriculture. In: *Conservation Agriculture*. Springer International Publishing, Cham, pp 525–557
- Hagh-Doust N, Färkkilä SMA, Hosseyni Moghaddam MS, Tedersoo L (2022) Symbiotic fungi as biotechnological tools: Methodological challenges and relative benefits in agriculture and forestry. *Fungal Biol Rev* 42:34–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.06.001>

- Hajósy F, Kakas J, Kéri M (1975) Sum of Monthly and Annual Precipitation Data in Hungary – From the Beginning of the Measurement to 1970. Országos Meteorológiai Szolgálat, Budapest, Magyarország
- Halaj M, Chvátlová B, Cepák V, és mtsai (2018) Searching for microalgal species producing extracellular biopolymers. *Chem Pap* 72:2673–2678. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0517-4>
- Han K-S, Ko K-W, Nam S-J, és mtsai (1997) Optimization of a rice lamina inclination assay for detection of brassinosteroids: I. effect of phytohormones on the inclination activity. *J Plant Biol* 40:240–244. <https://doi.org/10.1007/bf03030454>
- Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2011) Brassinosteroids: under biotic stress. In: *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 345–360
- Healey FP (1972) Photosynthesis and respiration of some Arctic seaweeds. *Phycologia* 11:267–271. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-11-3-267.1>
- Hellriegel H, Wilfarth H (1888) Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Buchdruckerei der Post Kayssler, Berlin
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, és mtsai (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5:1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Hoppe HA (1979) Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In: Vol. 1. De Gruyter, Berlin, Boston, pp 25–120
- Hu C, Gao K, Whitton BA (2012) Semi-arid regions and deserts. In: *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 345–369
- Hugerth LW, Muller EEL, Hu YOO, és mtsai (2014) Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 9:e95567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095567>
- Hussain A, Krischke M, Roitsch T, Hasnain S (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Curr Microbiol* 61:361–369. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9620-7>
- Hussain MA, Fahad S, Sharif R, és mtsai (2020) Multifunctional role of brassinosteroid and its analogues in plants. *Plant Growth Regul* 92:141–156. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00647-8>
- Huzsvai L, Juhász C, Seddik L, és mtsai (2024) The future probability of winter wheat and maize yield failure in Hungary based on long-term temporal patterns. *Sustainability* 16:3962. <https://doi.org/10.3390/su16103962>

- Ishizaki K, Hoshi T, Abe S-I, és mtsai (2005) Breeding of blast resistant isogenic lines in rice variety “Koshihikari” and evaluation of their characters. *Breed Sci* 55:371–377. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.55.371>
- IUSS Working Group (2022) World Reference Base for Soil Resources. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps (4th ed.). International Union of Soil Sciences, Bécs, Ausztria
- Jakab G, Dobos E, Madarász B, és mtsai (2019) Spatial and temporal changes in infiltration and aggregate stability: A case study of a subhumid irrigated cropland. *Water (Basel)* 11:876. <https://doi.org/10.3390/w11050876>
- Jakab G, Madarász B, Szabó J, és mtsai (2017) Infiltration and soil loss changes during the growing season under ploughing and conservation tillage. *Sustainability* 9:1726. <https://doi.org/10.3390/su9101726>
- Jakab G, Német T, Csepinszky B (2013) The influence of short term soil sealing and crusting on hydrology and erosion at Balaton uplands. *Carpathian* 147–155
- Jiang W, Brueggeman AJ, Horken KM, és mtsai (2014) Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 13:1465–1469. <https://doi.org/10.1128/EC.00213-14>
- Jirásková D, Pouličková A, Novák O, és mtsai (2009) High-throughput screening technology for monitoring phytohormone production in microalgae. *J Phycol* 45:108–118. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00615.x>
- Joo S-H, Jang M-S, Kim MK, és mtsai (2015) Biosynthetic relationship between C₂₈-brassinosteroids and C₂₉-brassinosteroids in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Phytochemistry* 111:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.006>
- Joseph J, Ray JG (2024) A critical review of soil algae as a crucial soil biological component of high ecological and economic significance. *J Phycol* 60:229–253. <https://doi.org/10.1111/jpy.13444>
- Juhos K, Nugroho PA, Jakab G, és mtsai (2023) A comprehensive analysis of soil health indicators in a long-term conservation tillage experiment. *Soil Use Manag.* 40: e12942. <https://doi.org/10.1111/sum.12942>
- Juneja A, Ceballos R, Murthy G (2013) Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies* 6:4607–4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>
- Kafarski P (2012) Rainbow code of biotechnology. *Chemik* 66:811–816
- Kanwar MK, Bajguz A, Zhou J, Bhardwaj R (2017) Analysis of Brassinosteroids in Plants. *J Plant Growth Regul* 36:1002–1030. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9732-4>

- Kaplan F, Lewis LA, Wastian J, Holzinger A (2012) Plasmolysis effects and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (Streptophyta). *Protoplasma* 249:789–804. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0324-z>
- Kapooore RV, Wood EE, Llewellyn CA (2021) Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnol Adv* 49:107754. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107754>
- Karsten U, Herburger K, Holzinger A (2016) Living in biological soil crust communities of African deserts-Physiological traits of green algal *Klebsormidium* species (Streptophyta) to cope with desiccation, light and temperature gradients. *J Plant Physiol* 194:2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.002>
- Karsten U, Herburger K, Holzinger A (2017) Photosynthetic plasticity in the green algal species *Klebsormidium flaccidum* (Streptophyta) from a terrestrial and a freshwater habitat. *Phycologia* 56:213–220. <https://doi.org/10.2216/16-85.1>
- Karsten U, Holzinger A (2012) Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microb Ecol* 63:51–63. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9924-6>
- Karsten U, Lütz C, Holzinger A (2010) Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *J Phycol* 46:1187–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00921.x>
- Karsten U, Rindi F (2010) Ecophysiological performance of an urban strain of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium* sp. (Klebsormidiales, Klebsormidiophyceae). *Eur J Phycol* 45:426–435. <https://doi.org/10.1080/09670262.2010.498587>
- Kemper WD, Koch EJ (1966) Aggregate stability of soils from western portions of the United States and Canada. US dep agric 1355
- Kheirfam H, Asadzadeh F (2020) Stabilizing sand from dried-up lakebeds against wind erosion by accelerating biological soil crust development. *Eur J Soil Biol* 98:103189. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103189>
- Kheirfam H, Sadeghi SH, Homae M, Zarei Darki B (2017) Quality improvement of an erosion-prone soil through microbial enrichment. *Soil Tillage Res* 165:230–238. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.08.021>
- Kheirfam H, Sadeghi SH, Zarei Darki B (2020) Soil conservation in an abandoned agricultural rain-fed land through inoculation of cyanobacteria. *Catena* 187:104341. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104341>
- Kim SK, Abe H, Little CH, Pharis RP (1990) Identification of two brassinosteroids from the cambial region of Scots pine (*Pinus silverstris*) by gas chromatography-mass

- spectrometry, after detection using a dwarf rice lamina inclination bioassay. *Plant Physiol* 94:1709–1713. <https://doi.org/10.1104/pp.94.4.1709>
- Kitzing C, Karsten U (2015) Effects of UV radiation on optimum quantum yield and sunscreen contents in members of the genera *Interfilum*, *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Eur J Phycol* 50:279–287. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1031190>
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885–886. <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Kobayashi A, Hori K, Yamamoto T, Yano M (2018) Koshihikari: a premium short-grain rice cultivar - its expansion and breeding in Japan. *Rice (N Y)* 11:15. <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0207-4>
- Koide RT, Mosse B (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145–163. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0307-4>
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, és mtsai (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79:5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Krebs CJ (2009) *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance* 6th ed. Pearson Education Limited, Harlow
- Krishna P (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J Plant Growth Regul* 22:289–297. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0058-z>
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 12:118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x>
- Lababpour A (2016) Potentials of the microalgae inoculant in restoration of biological soil crusts to combat desertification. *Int J Environ Sci Technol (Tehran)* 13:2521–2532. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1074-4>
- Lakatos M, Izsák B, Szentes O, és mtsai (2020) Return values of 60-minute extreme rainfall for Hungary. *Idojaras* 124:143–156. <https://doi.org/10.28974/idojaras.2020.2.1>
- Lan S, Zhang Q, Wu L, és mtsai (2014) Artificially accelerating the reversal of desertification: cyanobacterial inoculation facilitates the succession of vegetation communities. *Environ Sci Technol* 48:307–315. <https://doi.org/10.1021/es403785j>
- Leliaert F, Smith DR, Moreau H, és mtsai (2012) Phylogeny and molecular evolution of the Green algae. *CRC Crit Rev Plant Sci* 31:1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>

- Lengyel E, Barreto S, Padisák J, és mtsai (2023) Contribution of silica-scaled chrysophytes to ecosystems services: a review. *Hydrobiologia* 850:2735–2756. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-05075-5>
- Lepossa A (2003) Talajalgák mennyiségi vizsgálata a Balaton-felvidéki Nemzeti Parkban, valamint talajból izolált algatenyészetek növényi növekedést befolyásoló hatásainak kimutatása. PhD disszertáció, Pannon Egyetem
- Leu S, Boussiba S (2014) Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind Biotechnol (New Rochelle N Y)* 10:169–183. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039>
- Li B, Gao J, Wang X, és mtsai (2016) Effects of biological soil crusts on water infiltration and evaporation Yanchi Ningxia, Maowusu Desert, China. *Int J Sediment Res* 31:311–323. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2016.05.005>
- Li C, Liang Y, Miao Q, és mtsai (2024) The influence of microalgae fertilizer on soil water conservation and soil improvement: Yield and quality of potted tomatoes. *Agronomy (Basel)* 14:2102. <https://doi.org/10.3390/agronomy14092102>
- Lichner L, Hallett PD, Drongová Z, és mtsai (2013) Algae influence the hydrophysical parameters of a sandy soil. *Catena* 108:58–68. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2012.02.016>
- Liu J, Danneels B, Vanormelingen P, Vyverman W (2016) Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water Res* 92:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.049>
- Liu J, Gerken H, Li Y (2014) Single-tube colony PCR for DNA amplification and transformant screening of oleaginous microalgae. *J Appl Phycol* 26:1719–1726. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0220-3>
- Liu Y, Cockell CS, Wang G, és mtsai (2008) Control of Lunar and Martian dust--experimental insights from artificial and natural cyanobacterial and algal crusts in the desert of Inner Mongolia, China. *Astrobiology* 8:75–86. <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0122>
- Lu Q, Xiao Y, Lu Y (2022) Employment of algae-based biological soil crust to control desertification for the sustainable development: A mini-review. *Algal Res* 65:102747. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102747>
- Madarász B, Bádony K., Csepinszky B, és mtsai. (2011). Conservation tillage for rational water management and soil conservation. *Hungarian Geographical Bulletin*, 60(2), 117-133. Retrieved from <https://ojs3.mtak.hu/index.php/hungeobull/article/view/3037>
- Mandava NB (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:23–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.000323>

- Marsh JA, Dennison WC, Alberte RS (1986) Effects of temperature on photosynthesis and respiration in eelgrass (*Zostera marina* L.). *J Exp Mar* 257–267.
- Masojídek J, Torzillo G, Koblížek M (2013) Photosynthesis in Microalgae. In: *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, pp 21–36.
- Masuda T, Inomura K, Gao M, és mtsai (2023) The balance between photosynthesis and respiration explains the niche differentiation between *Crocospaera* and *Cyanothece*. *Comput Struct Biotechnol J* 21:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.029>
- Meng Z, Dang X, Gao Y, és mtsai (2018) Interactive effects of wind speed, vegetation coverage and soil moisture in controlling wind erosion in a temperate desert steppe, Inner Mongolia of China. *J Arid Land* 10:534–547. <https://doi.org/10.1007/s40333-018-0059-1>
- Mengual C, Schoebitz M, Azcón R, Roldán A (2014) Microbial inoculants and organic amendment improves plant establishment and soil rehabilitation under semiarid conditions. *J Environ Manage* 134:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.008>
- Metting B (1987) Dynamics of wet and dry aggregate stability from a three-year microalgal soil conditioning experiment in the field. *Soil Sci* 143:139–143. <https://doi.org/10.1097/00010694-198702000-00009>
- Metting B, Rayburn WR (1983) The influence of a microalgal conditioner on selected Washington soils: An empirical study. *Soil Sci Soc Am J* 47:682–685. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700040015x>
- Míguez F, Holzinger A, Fernandez-Marin B, és mtsai (2020) Ecophysiological changes and spore formation: two strategies in response to low-temperature and high-light stress in *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta)1. *J Phycol* 56:649–661. <https://doi.org/10.1111/jpy.12971>
- Mimoto H, Yanase M, Chujo H (1989) Varietal differences of juvenile phase duration and photoperiodic sensitivity in paddy rice. *Jpn J Crop Sci* 58:628–634. <https://doi.org/10.1626/jcs.58.628>
- Mishra B, Tiwari A, Mahmoud AED (2022) Microalgal potential for sustainable aquaculture applications: bioremediation, biocontrol, aquafeed. *Clean Technol Environ Policy* 25(2), 675–687. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02254-1>
- Monagail MM, Cornish L, Morrison L, és mtsai (2017) Sustainable harvesting of wild seaweed resources. *Eur J Phycol* 52:371–390. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365273>
- Moon-van der Staay SY, van der Staay GWM, Guillou L, és mtsai (2000) Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnol Oceanogr* 45:98–109. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.1.0098>

- Mosse B (1953) Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. *Nature* 171:974. <https://doi.org/10.1038/171974a0>
- Murata MM, Ito Morioka LR, Da Silva Marques JB, és mtsai (2021) What do patents tell us about microalgae in agriculture? *AMB Express* 11:154. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01315-4>
- Nakamura Y, Miyachi S (1982) Effect of temperature on starch degradation in *Chlorella vulgaris* 11h cells. *Plant cell physiology* 23:333–341. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076354>
- Naohiko M (1982) Promotor for synthesizing plant hormone. *Japán Szabadalom* JP6212282A <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DJPS58180404A>
- Naselli-Flores L, Padisák J (2023) Ecosystem services provided by marine and freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia* 850:2691–2706. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04795-y>
- Nghi KN, Tagliani A, Mariotti L, és mtsai (2021) Auxin is required for the long coleoptile trait in japonica rice under submergence. *New Phytol* 229:85–93. <https://doi.org/10.1111/nph.16781>
- Nguyen HN, Kisiala AB, Emery RJN (2020) The roles of phytohormones in metal stress regulation in microalgae. *J Appl Phycol* 32:3817–3829. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02271-5>
- Noble A, Kisiala A, Galer A, és mtsai (2014) *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) produces abscisic acid and cytokinins and responds to their exogenous application singly and in combination with other growth regulators. *Eur J Phycol* 49:244–254. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.911353>
- Nozaki T, Fukushima Y, Okada S, és mtsai (2024) In situ gold adsorption experiment at an acidic hot spring using a blue-green algal sheet. *Sci Rep* 14:5739. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56263-3>
- Nunes T, Melo P (2025) The selective bioherbicide action of a microalgae isolated from a Portuguese soil. <https://doi.org/10.48797/SL.2025.384>
- Oberholster PJ, Cheng P-H, Botha A-M, Genthe B (2014) The potential of selected macroalgal species for treatment of AMD at different pH ranges in temperate regions. *Water Res* 60:82–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.031>
- Occhipinti PS, Russo N, Foti P, és mtsai (2025) An indigenous microalgal pool containing *Klebsormidium* sp. K39 as a stable and efficacious biotechnological strategy for *Escherichia coli* removal in urban wastewater treatment. *J Sci Food Agric* 105:1288–1297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13918>

- Oklestkova J, Rárová L, Kvasnica M, Strnad M (2015) Brassinosteroids: synthesis and biological activities. *Phytochem Rev* 14:1053–1072. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9446-9>
- Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, és mtsai (2022) *Vegan: community ecology package*
- Oncel SS, Kose A, Vardar F, Torzillo G (2015) From the ancient tribes to modern societies, microalgae evolution from a simple food to an alternative fuel source. In: *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier, pp 127–144
- Ördög V, Stirk WA, Van Staden J, és mtsai (2004) Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta1. *J Phycol* 40:88–95. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03046.x>
- Paddock M (2019) *Microalgae Wastewater Treatment: A Brief History*. Preprints
- Pathania P, Rajta A, Singh PC, Bhatia R (2020) Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. *Biocatal Agric Biotechnol* 30:101842. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101842>
- Pimentel D (2006) Soil erosion: A food and environmental threat. *Environ Dev Sustain* 8:119–137. <https://doi.org/10.1007/s10668-005-1262-8>
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, és mtsai (2022) Package ‘nlme’: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models
- Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Kotowska U, és mtsai (2018) Growth, metabolite profile, oxidative status, and phytohormone levels in the Green alga *Acutodesmus obliquus* exposed to exogenous auxins and cytokinins. *J Plant Growth Regul* 37:1159–1174. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9816-9>
- Popović SS, Nikolić NV, Pečić MN, és mtsai (2023) First report on a 5-year monitoring of lampenflora in a famous show cave in Serbia. *Geoheritage* 15:14. <https://doi.org/10.1007/s12371-022-00771-z>
- Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28:1823–1829. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, és mtsai (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team (2021) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, 4.2.1-es verzió Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- R Core Team (2024) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 4.4.3-as verzió Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ralph PJ (1998) Photosynthetic response of laboratory-cultured *Halophila ovalis* to thermal stress. *Mar Ecol Prog Ser* 171:123–130. <https://doi.org/10.3354/meps171123>
- Ramakrishnan B, Maddela NR, Venkateswarlu K, Megharaj M (2023) Potential of microalgae and cyanobacteria to improve soil health and agricultural productivity: a critical view. *Env Sci Adv* 2:586–611. <https://doi.org/10.1039/d2va00158f>
- Rao B-Q, Liu Y-D, Hu C-X, és mtsai (2009) The technology of man-made algal crust and its applications in control of desertification. *Acta Hydrobiol Sin* 33:756–761. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1035.2009.40756>
- Ras M, Steyer J-P, Bernard O (2013) Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12:153–164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Raven JA, Geider RJ (1988) Temperature and algal growth. *New Phytol* 110:441–461. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00282.x>
- Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, és mtsai (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol Adv* 36:1255–1273. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.004>
- Rhee G-Y, Gotham IJ (1981) The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation1. *Limnol Oceanogr* 26:635–648. <https://doi.org/10.4319/lo.1981.26.4.0635>
- Righini H, Roberti R (2019) Algae and Cyanobacteria as biocontrol agents of fungal plant pathogens. In: *Plant Microbe Interface*. Springer International Publishing, Cham, pp 219–238
- Rindi F, Guiry MD, López-Bautista JM (2008) Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *J Phycol* 44:1529–1540. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00593.x>
- Rindi F, Mikhailyuk TI, Sluiman HJ, és mtsai (2011) Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol Phylogenet Evol* 58:218–231. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.030>
- Rodríguez-Caballero E, Castro AJ, Chamizo S, és mtsai (2018) Ecosystem services provided by biocrusts: From ecosystem functions to social values. *J Arid Environ* 159:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.09.005>

- Roh J, Moon J, Youn J-H, és mtsai (2020) Establishment of biosynthetic pathways to generate castasterone as the biologically active brassinosteroid in *Brachypodium distachyon*. *J Agric Food Chem* 68:3912–3923. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07963>
- Román JR, Roncero-Ramos B, Chamizo S, és mtsai (2018) Restoring soil functions by means of cyanobacteria inoculation: Importance of soil conditions and species selection. *Land Degrad Dev* 29:3184–3193. <https://doi.org/10.1002/ldr.3064>
- Ronga D, Biazzi E, Parati K, és mtsai (2019) Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy (Basel)* 9:192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Rossi F, Potrafka RM, Pichel FG, De Philippis R (2012) The role of the exopolysaccharides in enhancing hydraulic conductivity of biological soil crusts. *Soil Biol Biochem* 46:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.10.016>
- Rowell DL (2014) *Soil science Methods & Applications*. Routledge, New York
- Rubel F, Brugger K, Haslinger K, Auer I (2017) The climate of the European Alps: Shift of very high resolution Köppen-Geiger climate zones 1800–2100. *Meteorol Z* 26:115–125. <https://doi.org/10.1127/metz/2016/0816>
- Sadeghi SH, Kheirfam H, Zarei Darki B (2020a) Controlling runoff generation and soil loss from field experimental plots through inoculating cyanobacteria. *J Hydrol* 585:124814. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124814>
- Sadeghi SH, Sadeghi Satri M, Kheirfam H, Zarei Darki B (2020b) Runoff and soil loss from small plots of erosion-prone marl soil inoculated with bacteria and cyanobacteria under real conditions. *Eur J Soil Biol* 101:103214. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103214>
- San NS, Yamashita M, Adachi S, és mtsai (2018) Differences in lamina joint anatomy cause cultivar differences in leaf inclination angle of rice. *Plant Prod Sci* 21:302–310. <https://doi.org/10.1080/1343943x.2018.1500488>
- Salles C, Poesen J, Borselli L (1999) Measurement of simulated drop size distribution with an optical spectro pluviometer: sample size considerations. *Earth Surf Process* 24:545–556. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9837\(199906\)24:6<545::aid-esp3>3.3.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9837(199906)24:6<545::aid-esp3>3.3.co;2-4)
- Samolov E, Mikhailyuk T, Lukešová A, és mtsai (2019) Usual alga from unusual habitats: Biodiversity of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts. *Mol Phylogenet Evol* 133:236–255. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.018>
- Samson G, Prášil O, Yaakoubd B (1999) Photochemical and Thermal Phases of Chlorophyll a Fluorescence. *Photosynthetica* 37:163–182. <https://doi.org/10.1023/a:1007095619317>

- Sartori M, Ferrari E, M'Barek R, és mtsai (2024) Remaining loyal to our soil: A prospective integrated assessment of soil erosion on global food security. *Ecol Econ* 219:108103. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2023.108103>
- Sartori M, Philippidis G, Ferrari E, és mtsai (2019) A linkage between the biophysical and the economic: Assessing the global market impacts of soil erosion. *Land Use Policy* 86:299–312. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.05.014>
- Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, és mtsai (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* 50:D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, és mtsai (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schneider, CA; Rasband, WS; Eliceiri, KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Selvaraj D, Arivazhagan M (2025) Performance of blue green algae in mitigation of reactive dye industrial wastewater. *Algal Res* 86:103898. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2025.103898>
- Setthamongkol P, Kulert W, Wanmanee S, és mtsai (2023) *In Vitro* characterization and assessment of a potential cosmetic cream containing phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis* BUUC1503 blue-green algae. *J Appl Phycol* 35:1685–1697. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-02988-z>
- Shinbashi N, Maeda H, Kunihiro Y, Tanno H (2003) A new rice variety “Hoshinoyume.” *Bull Hokkaido Prefect Agric Exp Station* 1–12
- Škaloud P (2006) Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Nova Hedwigia* 83:533–550. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2006/0083-0533>
- Škaloud P, Lukešová A, Malavasi V, és mtsai (2014) Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Plant Ecol Evol* 147:333–345. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2014.989>
- Škaloud P, Rindi F (2013) Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *J Eukaryot Microbiol* 60:350–362. <https://doi.org/10.1111/jeu.12040>
- Sluiman HJ, Guihal C (2008) Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *J Phycol* 44:183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00442.x?g>

- Smith SM, Abed RMM, Gercia-Pichel F (2004) Biological soil crusts of sand dunes in Cape Cod National Seashore, Massachusetts, USA. *Microb Ecol* 48:200–208. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0254-9>
- Sodaeizadeh H, Hokmollahi F, Ghasemi S, és mtsai (2025) Cyanobacteria inoculation mitigates salinity stress by regulating plant growth, photosynthetic performance, elemental concentrations and yield in wheat. *S Afr J Bot* 180:857–869. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2025.04.006>
- Somogyi B, Felföldi T, Solymosi K, és mtsai (2013) One step closer to eliminating the nomenclatural problems of minute coccoid green algae: *Pseudochloris wilhelmii*, gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur J Phycol* 48:427–436. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.854411>
- Soto N, Ferrer K, Díaz K, és mtsai (2021) Synthesis and biological activity of new brassinosteroid analogs of type 24-nor-5 β -cholane and 23-benzoate function in the side chain. *Int J Mol Sci* 22:4808. <https://doi.org/10.3390/ijms22094808>
- Stanier RY, Van Niel CB (1962) The concept of a bacterium. *Arch Mikrobiol* 42:17–35. <https://doi.org/10.1007/bf00425185>
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of phycology* 23:1–47. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x>
- Stathopoulos N, Lykoudi E, Vasileiou E, és mtsai (2017) Erosion vulnerability assessment of sperchios river basin, in East Central Greece—A GIS based analysis. *Open J Geol* 07:621–646. <https://doi.org/10.4236/ojg.2017.75043>
- Stenberg JA, Sundh I, Becher PG, és mtsai (2021) When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *J Pest Sci* 94:665–676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, és mtsai (2013a) Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiol Biochem* 70:348–353. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.037>
- Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, és mtsai (2018) Endogenous brassinosteroids in microalgae exposed to salt and low temperature stress. *Eur J Phycol* 53:273–279. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1441447>
- Stirk WA, Ördög V, Novák O, és mtsai (2013b) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J Phycol* 49:459–467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>
- Stirk WA, Ördög V, Van Staden J, Jäger K (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J Appl Phycol* 14:215–221. <https://doi.org/10.1023/A:1019928425569>

- Stirk WA, Tarkowská D, Turečová V, és mtsai (2014) Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *J Appl Phycol* 26:561–567. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0062-z>
- Stirk WA, van Staden J (2020) Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 44:107612. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107612>
- Stirk WA, van Staden J, Novák O, és mtsai (2011) Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (Chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle. *J Phycol* 47:291–301. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00952.x>
- Sun F, Xiao B, Kidron GJ, Heitman JL (2022) Insights about biocrust effects on soil gas transport and aeration in drylands: Permeability, diffusivity, and their connection to hydraulic conductivity. *Geoderma* 427:116137. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116137>
- Sun F, Xiao B, Li S, és mtsai (2023) Direct evidence and mechanism for biocrusts-induced improvements in pore structure of dryland soil and the hydrological implications. *J Hydrol (Amst)* 623:129846. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2023.129846>
- Székely Á, Szalóki T, Lantos C, és mtsai (2022a) Data of selected set of rice accessions at the germination stage under cold stress. *Data Brief* 41:107929. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.107929>
- Székely Á, Szalóki T, Pauk J, és mtsai (2022b) Salinity tolerance characteristics of marginally located rice varieties in the northernmost rice-growing area in Europe. *Agronomy (Basel)* 12:652. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030652>
- Takatsuto S, Yokota T, Omote K, és mtsai (1989) Identification of Brassinolide, Castasterone and Norcastasterone (Brassinone) in Sunflower (*Helianthus annuum* L.) Pollen. *Agricultural and biological* 53:2177–2180. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869607>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tang D-S, Wang W-B, Li D-H, és mtsai (2007) Effects of artificial algal crust on soil enzyme activities of Hopq desert, China. *Acta Hydrobiol Sin* 31:339–344. <https://doi.org/10.3724/issn1000-3207-2007-3-339-k>
- Teske A, Sørensen KB (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J* 2:3–18. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.90>
- Tran Q-G, Le TT, Choi D-Y, és mtsai (2025) Progress and challenges in CRISPR/Cas applications in microalgae. *J Microbiol* 63:e2501028. <https://doi.org/10.71150/jm.2501028>

- Turbat A, Rakk D, Vigneshwari A, és mtsai (2020) Characterization of the plant growth-promoting activities of endophytic fungi isolated from *Sophora flavescens*. *Microorganisms* 8:683. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050683>
- Üveges V, Vörös L, Padisák J, Kovács AW (2011) Primary production of epipsammic algal communities in Lake Balaton (Hungary). *Hydrobiologia* 660:17–27. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0396-3>
- von Berg K-HL, Hoef-Emden K, Melkonian BMM (2012) *Der Kosmos-Algenführer*. Arvato Media GmbH, Stuttgart
- Vriet C, Russinova E, Reuzeau C (2012) Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* 24:842–857. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094912>
- Wada K, Marumo S, Abe H, és mtsai (1984) A rice lamina inclination test—A micro-quantitative bioassay for brassinosteroids. *Agric Biol Chem* 48:719–726. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866208>
- Wall LG, Gabbarini LA, Ferrari AE, és mtsai (2019) Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. *Acta Oecol (Montrouge)* 95:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.02.001>
- Wang W, Liu Y, Li D, és mtsai (2009) Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area. *Soil Biol Biochem* 41:926–929. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.001>
- Webb WL, Newton M, Starr D (1974) International association for ecology carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. A mathematical model. *Oecologia* 281–291
- Weber B, Burkhard B, Belnap J (2016) Biological soil crusts as an organizing principle in drylands. In: *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*. Springer International Publishing, Cham, pp 3–13
- Wetzel RG, Likens GE (2000) *Limnological Analyses*. Springer-Verlag, New York
- Wickham H (2016) Ggplot2: Elegant graphics for data analysis. *Biometrics* 67:678–679. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2011.01616.x>
- Williams JD, Dobrowolski JP, West NE (1995) Microphytic crust influence on interrill erosion and infiltration capacity. *Trans ASAE* 38:139–146. <https://doi.org/10.13031/2013.27822>
- Wu Y, Rao B, Wu P, és mtsai (2013) Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant Soil* 370:115–124. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1611-6>

- Xiao B, Sun F, Hu K, Kidron GJ (2019) Biocrusts reduce surface soil infiltrability and impede soil water infiltration under tension and ponding conditions in dryland ecosystem. *J Hydrol* 568:792–802. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2018.11.051>
- Xiao B, Zhao Y, Wang Q, Li C (2015) Development of artificial moss-dominated biological soil crusts and their effects on runoff and soil water content in a semi-arid environment. *J Arid Environ* 117:75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.02.017>
- Yamamoto Y, Aminaka R, Yoshioka M, és mtsai (2008) Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Res* 98:589–608. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9372-4>
- Yokota T, Kim SK, Fukui Y, és mtsai (1987) Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon reticulatum*: Configuration at C-24. *Phytochemistry* 26:503–506. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)81442-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)81442-9)
- Yoshida N, Yagi K, Sato D, és mtsai (2005) Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *J Biosci Bioeng* 99:143–149. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.143>
- Zhang B, Zhang Y, Zhao J, és mtsai (2009) Microalgal species variation at different successional stages in biological soil crusts of the Gurbantunggut Desert, Northwestern China. *Biol Fertil Soils* 45:539–547. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0364-0>
- Zhang X, Koehler H (2022) Soil algae for combating soil degradation – greenhouse experiment with different soil amendments. *Soil Res* 61:70–82. <https://doi.org/10.1071/sr22074>
- Zhao Y, Wang N, Zhang Z, és mtsai (2021) Accelerating the development of artificial biocrusts using covers for restoration of degraded land in dryland ecosystems. *Land Degrad Dev* 32:285–295. <https://doi.org/10.1002/ldr.3714>
- Zhao ZR, Wu ZL, Huang GQ, Li GR (1992) An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. *J Plant Growth Regul* 11:209–213. <https://doi.org/10.1007/bf02115479>
- Zheng Z, Xiong K, Rong L, Chi Y (2021) Effects of biological crust on soil properties under different Karst rocky desertification habitats. *Pol J Environ Stud* 30:3405–3418. <https://doi.org/10.15244/pjoes/130339>
- Zhu F, Massana R, Not F, és mtsai (2005) Mapping of picoeukaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS microbiol* 52:79–92. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.006>

13. Függelék

1. Melléklet

Mezőgazdasági célokra alkalmazott mikroalgák leírói és új taxonómiai nevei (amennyiben eltérő)

<i>Régi forma</i>			<i>Jelenleg elfogadott forma</i>		
Fajnév	Fajleíró	Publikálva	Fajnév	Fajleíró	Publikálva
<i>Anabaena azotica</i>	Ley	1959	-	-	-
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	P.M.Tsarenko	2001	<i>Tetradasmus dimorphus</i>	M.J.Wynne	2016
<i>Amphora coffeaeformis</i>	Kützing	1844	<i>Halamphora coffeiformis</i>	Mereschkowsky, C.	1903
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Brébisson ex Bornet & Flahault	1886	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	Wacklin, P., Hoffmann, L. & Komárek, J.	2009
<i>Anabaena laxa</i>	A. Braun	1886	-	-	-
<i>Anabaena variabilis</i>	Kützing ex Bornet & Flahault	1886	<i>Trichormus variabilis</i>	Komárek, J. & Anagnostidis, K.	1989
<i>Arthrospira platensis</i>	Gomont	1892	<i>Limnospira platensis</i>	Santos, K.R.S., Hentschke	2023
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Le Jolis, A.	1863	-	-	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Shihira & R.W.Krauss	1965	-	-	-
<i>Chlorella variabilis</i>	Shihira & R.W.Krauss	1965	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	Beijerinck	1980	-	-	-
<i>Chlorella fusca</i>	Shihira & R.W.Krauss	1965	<i>Desmodesmus abundans</i>	Hegewald, E.[H.]	2000
<i>Dunaliella salina</i>	Teodoresco, E.C.	1905	-	-	-
<i>Ecklonia maxima</i>	Papenfuss, G.F.	1940	-	-	-
<i>Euglena gracilis</i>	G.A.Klebs	1883	-	-	-
<i>Gracilaria edulis</i>	P.C.Silva	1952	-	-	-
<i>Microcoleus vaginatus</i>	Gomont, M.	1892	-	-	-
<i>Neochloris conjuncta</i>	P.A.Archibald	1973	-	-	-
<i>Nostoc carneum</i>	Bornet, É. & Flahault, C.	1886	-	-	-
<i>Nostoc muscorum</i>	Bornet, É. & Flahault, C.	1886	<i>Desmonostoc muscorum</i>	Hrouzek, P., Lukešová, A., Mareš, J. & Ventura, S.	2013
<i>Oscillatoria chlorina</i>	Gomont, M.	1892	<i>Kamptonema chlorinum</i>	Strunecký, O., Komárek, J. & Smarda, J.	2014
<i>Padina gymnospora</i>	Sonder, O.G.	1871	-	-	-

<i>Parachlorella kessleri</i>	Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T. & Wolf, M.	2004	-	-	-
<i>Phormidium ambiguum</i>	Gomont	1892	-	-	-
<i>Sargassum latifolium</i>	Agardh, C.A.	1820	-	-	-
<i>Scenedesmus acutus</i>	Meyen, F.J.F.	1829	<i>Tetradesmus obliquus</i>	Wynne, M.J. & Hallan, J.K	2015
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Kützing, F.T.	1833	<i>Tetradesmus obliquus</i>	Wynne, M.J. & Hallan, J.K	2015
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Brébisson, L.A. de & Godey, L.L.	1835	-	-	-
<i>Scenedesmus rubescens</i>	Kessler, E., Schäfer, M., Hümmer, C., Kloboucek, A. & Huss, V.A.R.	1997	<i>Halochlorella rubescens</i>	Tsarenko, P.M.	2011
<i>Scytonema javanicum</i>	Bornet, É. & Flahault, C.	1886	-	-	-
<i>Spirulina platensis</i>	Geitler, L.	1925	<i>Limnospira platensis</i>	Santos, K.R.S., Hentschke, G.S., Ferrari, G., Andreote, A.P.D., Fiore, M. de F., Vasconcelos, V. & Sant'Anna, C.L	2023
<i>Tetraselmis chui</i>	Butcher, R.W.	1959	-	-	-

2. Melléklet

Bold's tápközeg összetétele (Starr és Zeikus 1993)

BBM	
<i>Komponens</i>	<i>Koncentráció (mg L⁻¹)</i>
KNO ₃	250
K ₂ HPO ₄	75
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25
Vas oldat	1 ml L ⁻¹
Mikroelem oldat	1 ml L ⁻¹

Mikroelem oldat	
<i>Komponens</i>	<i>Koncentráció (mg L⁻¹)</i>
H ₃ BO ₃	61
(NH ₄) ₆ Mo ₇ x 4 H ₂ O	38
CuSO ₄	6
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	6
ZnCl ₂	2
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	4

Vas oldat	
<i>Komponens</i>	<i>Koncentráció (mg L⁻¹)</i>
Na ₂ EDTA	189
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	244

3. Melléklet

A vizsgált időszak csapadék adatai (Dióskál) (mm)

	március	április	május	június	július	augusztus	szepember
1			14				30
2	7		7				
3	4			2	2	43	
4	4			2			
5			2			6	
6	6			20		6	
7					8	5	
8							
9							
10				18			
11					8	7	
12			5				
13			1				
14		4				14	
15				4		17	
16				4		3	
17			9	14	11		
18				17		18	
19		1	2	10	1	1	
20		4					
21	1			5			
22					4		
23							
24	5		4		13		
25			11		128		5
26				11			18
27							8
28		9					
29		6		9			
30		2					
Összesen	27	26	55	116	175	120	61

4a. Melléklet

Baktérium taxonómia egységek átlagos abundanciája és szórása a kontroll és a kezelt területen, illetve a SIMPER teszt eredménye (+ = volt szignifikáns különbség, - = nem volt szignifikáns különbség)

Baktérium taxonómia egység	Kontroll		Kezelt		SIMPER
	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás	
Alveolata_unclassified	0,035	0,025	0,111	0,084	-
Apicomplexa	0,164	0,232	0,679	0,750	-
Ciliophora	6,967	2,387	4,400	4,012	-
Amoebozoa_unclassified	0,185	0,201	0,072	0,004	-
Conosa	1,791	0,486	2,207	1,484	-
Lobosa	0,896	0,191	0,397	0,245	+
Apusomonadidae	0,011	0,015	0,009	0,012	-
Archaeplastida_unclassified	0,009	0,012	0,000	0,000	+
Chlorophyta	22,073	18,095	43,499	13,913	-
Streptophyta	0,503	0,098	7,589	6,675	+
Eukaryota_unclassified	2,055	0,307	1,829	0,919	-
Discoba	0,009	0,012	0,000	0,000	+
Centroheliozoa	0,011	0,015	0,000	0,000	+
Cryptophyta	0,035	0,049	0,000	0,000	+
Katablepharidophyta	0,011	0,015	0,000	0,000	+
Choanoflagellida	0,037	0,052	0,011	0,015	-
Fungi	45,628	11,048	24,925	6,980	+
Mesomycetozoa	0,093	0,027	0,056	0,019	+
Metazoa	0,641	0,160	0,314	0,383	-
Opisthokonta_unclassified	0,185	0,127	0,152	0,140	-
Cercozoa	8,310	5,389	6,471	1,700	-
Ochrophyta	5,383	2,576	4,195	2,386	-
Opalozoa	0,009	0,012	0,048	0,067	-
Pseudofungi	4,781	0,815	2,849	0,467	+
Sagenista	0,169	0,104	0,188	0,034	-
Stramenopiles_unclassified	0,011	0,015	0,000	0,000	+

4b. Melléklet

Eukarióta taxonómia egységek átlagos abundanciája és szórása a kontroll és a kezelt területen, illetve a SIMPER teszt eredménye (+ = volt szignifikáns különbség, - = nem volt szignifikáns különbség)

Eukarióta taxonómia egység	Kontroll		Kezelt		SIMPER
	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás	
Alveolata_unclassified	0,035	0,025	0,111	0,084	-
Apicomplexa	0,164	0,232	0,679	0,750	-
Ciliophora	6,967	2,387	4,400	4,012	-
Amoebozoa_unclassified	0,185	0,201	0,072	0,004	-
Conosa	1,791	0,486	2,207	1,484	-
Lobosa	0,896	0,191	0,397	0,245	+
Apusomonadidae	0,011	0,015	0,009	0,012	-
Archaeplastida_unclassified	0,009	0,012	0,000	0,000	+
Chlorophyta	22,073	18,095	43,499	13,913	-
Streptophyta	0,503	0,098	7,589	6,675	+
Eukaryota_unclassified	2,055	0,307	1,829	0,919	-
Discoba	0,009	0,012	0,000	0,000	+
Centroheliozoa	0,011	0,015	0,000	0,000	+
Cryptophyta	0,035	0,049	0,000	0,000	+
Katablepharidophyta	0,011	0,015	0,000	0,000	+
Choanoflagellida	0,037	0,052	0,011	0,015	-
Fungi	45,628	11,048	24,925	6,980	+
Mesomycetozoa	0,093	0,027	0,056	0,019	+
Metazoa	0,641	0,160	0,314	0,383	-
Opisthokonta_unclassified	0,185	0,127	0,152	0,140	-
Cercozoa	8,310	5,389	6,471	1,700	-
Ochrophyta	5,383	2,576	4,195	2,386	-
Opalozoa	0,009	0,012	0,048	0,067	-
Pseudofungi	4,781	0,815	2,849	0,467	+
Sagenista	0,169	0,104	0,188	0,034	-
Stramenopiles_unclassified	0,011	0,015	0,000	0,000	+