

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

**Effects of chromium on some metabolic processes  
of *Chlorella pyrenoidosa***

**Hörcsik Tibor Zsolt**

Témavezetők:

*Dr. Mészáros Ilona, Dr. Lakatos Gyula és Dr. Balogh Árpád*



DEBRECENI EGYETEM  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2009



## 1. Bevezetés, célkitűzések

Az élőlények számos olyan terhelésnek vannak kitéve környezetükben, melyek aktivitásukat, fejlődési folyamataikat, lehetőségeiket korlátozzák. Ezeket a terheléseket egyrészt természetes abiotikus, másrészt biotikus, míg harmadrészt antropogén eredetű (pl. nehézfémek) tényezők váltják ki. Mindezek a hatások - összefoglaló néven a stresszorok - olyan rövid és hosszú távú válaszokat váltanak ki a szervezetekben, amelyek létrehozzák az egyed életében túlélést biztosító akklimációt és akklimatizációt; a több nemzedék során kialakuló tartós ellenálló képességet, adaptációt, és ennek eredményeként a rezisztenciát.

A különböző stresszorok által kiváltott stresszválaszok egyes esetekben teljesen specifikusak más esetekben általános válaszok következnek be. Figyelembe véve, hogy a növények esetében egy-egy generáció viszonylag hosszú életű, valamint többségük helyhez kötött, az akklimáció szerepe rendkívül fontosnak tűnik.

Mind a talaj, mind pedig a felszíni és felszín alatti vizek szennyezésében komoly gondot okoznak az oldható nehézfém ionok és ezek különböző szerves komponensekkel képzett komplex vegyületei. Az ipar által kibocsátott nehézfém szennyezőket részletesen elemezték makro-, illetve mikroökológiai szempontok alapján, kevésbé ismertek azonban a nehézfém ionok által okozott molekuláris hatásmechanizmusok. A vizekben előforduló szennyező ágensek elsősorban az algák és más mikroorganizmusok életműködését befolyásolják, bár a jól detektálható károsodásokat gyakran csak összetettebb szervezetekben vesszük észre.

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

Kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy egy lokálisan, a környezetbe gyakran nagy mennyiségben kikerülő toxikus nehézfém - a króm - milyen módon és milyen mértékben befolyásolja egy jól ismert zöldalga faj - a *Chlorella pyrenoidosa* - egyes anyagcsere folyamatait. Vizsgálatainkhoz a krómot választottuk, mert az élőlényekre gyakorolt hatásainak molekuláris mechanizmusa kevésbé ismert, feltárása jelenleg is folyamatban van. Az algák felhasználásával újabb lehetőségek kínálkoznak mind az indukció, mind pedig az akkumuláció és elimináció folyamatában. A különböző algafajok gyakran nagy mennyiségben képesek felhalmozni nehézfémeket. Ezeknek a nehézfémeknek a felvétele és megkötése közben gyakran olyan redoxfolyamatok játszódnak le bennük, amelyek az adott fémiont kevésbé oldható, élőlények számára kevésbé hozzáférhető formába alakítják át. Vizsgálataink közvetett módon választ keresnek arra is, hogy egy - nehézfémekkel szennyezett - vizes élőhely restaurációjában milyen módon használhatók fel a zöldalgák.

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

Fő célkitűzéseink a következők voltak:

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

## 2. Anyag és módszer

### 2.1. Algatenyésztés-algatenyésztés

Vizsgálatainkhoz *Chlorella pyrenoidosa* (IAM-128) zöldalgát használtunk a Tokiói Egyetem Mikrobiológiai Tanszékének gyűjteményéből. Az algasejteket módosított C-30 nevelő oldatban tenyésztettük.

### 2.2. Algatenyésztés Cr(III) és Cr(VI) – ionnal történő kezelése

Cr(III)-ként  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ -ot, míg Cr(VI) vegyületként Na-dikromátot ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) használtunk.

### 2.3. Az algasejtek szaporodásának vizsgálata

Kétféle módon történt, közvetlen sejtszámlálással (citométerrel), valamint fotometriás úton.

## 2.4. Algasejtek frakcionálása és elemösszetételének meghatározása

Az algasejtek feldolgozása során négy frakciót gyűjtöttünk (Okamura és Aoyama 1994.) Ép, teljes sejtek (1. minta), a sejtfafrakció (2. minta). A French Press roncsolás utáni felülúszót újra centrifugáltuk és az így kapott üledék (3. minta) mint membrán –, míg a felülúszó, mint citoplazmatikus frakció (4. minta).

A felülúszók víztartalmát elpárologtattuk, majd a mintákat 24 órán keresztül kezeltük koncentrált  $\text{HNO}_3$  és 30%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6:1 V/V arány) elegyében. Az így kapott mintákat szárazra pároltuk, majd a maradékot újraoldottuk 5 ml 2N  $\text{HNO}_3$  oldatban.

Az elemösszetételt Spectroflame típusú induktívan kapcsolt plazma atomemissziós spektrofotométerrel (ICP-AES) (Spectro GmbH Kleve, Németország) mértük a következő paraméterekkel: plazma gáz  $1,6 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ , nebulizáló gáz  $0,6 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ , hűtőgáz  $15 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ , gerjesztés 27 MHz, 1,05 kW keresztáramú nebulizer (Hörscik et al. 2006).

## 2.5. Fotoszintetikus pigment vizsgálatok

Az algatenyészetek és az izolált tilakoidok klorofill koncentrációját Arnon (1949.) módszerével határoztuk meg. A különböző fotoszintetikus pigmenteket és származékaikat HPLC technikával vizsgáltuk. A pigmenteket kloroform-aceton-izopropil alkohol (2:1:1 V/V) elegyével vontuk ki  $4^\circ\text{C}$ -on (Simon et al. 1988, 1989).

## 2.6. Aminosav analízis

A szabad aminosavakat a mintákból 7%-os triklór-ecetsavval, rázatással extraháltuk két órán keresztül. 200 mg frissen centrifugált alगतőmeghez 2 ml extrahálószeret használtunk. Ezután szűrőpapíron és membránszűrőn átszűrtük (Sartorius  $0,45 \mu\text{m}$ ). Az analízist a folyadékfázisból végeztük.

Az aminosav tartalmat ioncserélő folyadékkromatográfiával határoztuk meg BIOTRONIC LC 3000-típusú (Németország) aminosav analízátor segítségével. A kromatográfiás paraméterek: BTC 2410 kationcserélő töltet ( $125 \times 4 \text{ mm}$ ), reaktorhőmérséklet:  $135^\circ\text{C}$ , eluens áramlási sebessége: 0,20 ml/perc, ninhidrin áramlási sebessége: 0,20 ml  $\text{perc}^{-1}$ , detektálás: 570 és 440 nm, minta térfogata: 20  $\mu\text{l}$ , Biotronic 4-pufferrendszer (A,B,C,D) (Galiba et al. 1992).

## 2.7. Fotoszintézis vizsgálatok

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

A klorofill fluoreszcencia indukciót és paramétereit szobahőmérsékleten PAM-2000 típusú klorofill-fluorométerrel (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország)

vizsgáltuk, illetve határoztuk meg. A sötétadaptált minták  $F_0$  értékét 5-30 perc sötétadaptálás után, gyenge 1.6 kHz-cel modulált vörös fényvel mértük. Az  $F_m$  értéket  $6000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  telítési fehér fényimpulzussal határoztuk meg. A PSII maximális fotokémiai hatékonyságát az  $F_v/F_m$  aránnyal jellemeztük (ahol  $F_v = F_m - F_0$ )

A fényaklimált minták klorofill fluoreszcencia paramétereinek a meghatározásához a nevelőfényvel azonos  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  aktinikus fényvel világítottuk meg a mintát 5 percig, az  $F_0$  szint meghatározását követően. Méréseink során az  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$  és  $F_m/F_0$  értékeket vizsgáltuk.

## 2.8. Szénhidrát-anyagcsere szabályozással kapcsolatos mérések

A *Chlorella pyrenoidosa* sejteket mostuk, majd az algaszuszpenziót az adott enzimnek megfelelő puffer és kvarchomok segítségével feltártuk, a szuszpenziót centrifugáltuk, a felülúszót polietilén-glikollal (PEG) fracionáltuk, majd az így kapott oldatokat használtuk az enzimaktivitás mérésekhez.

A HPLC-s cukormeghatározáshoz a PEG-gel még nem kezelt kivonatot használtuk: Sarasep Polymer H oszlopon, Shodex RI refraktív index detektorral. Az adatok kiértékelése Chromeleon kromatográfias szoftverrel történt, a kalibrálást maltóz standardokkal végeztük.

A keményítő meghatározást Rose módszerével végeztük (Rose et al. 1991). A foszfofruktokináz (továbbiakban PFK) és a pirofoszfát-fruktóz-6-foszfát-1-foszfotranszferáz részleges tisztításához a lemerített algatömeget pufferben (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, 10 % glicerin, 1 mM EDTA, 28 mM  $\beta$ -merkaptóetanol, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Pi) 1:1 arányban feltártuk. A centrifugálás után kapott nyers kivonatot polietilén-glikollal (PEG 6000) fracionáltuk. Az így kapott részlegesen tisztított enzimeket használtuk az aktivitások méréséhez, melyeket Kiss és munkatársai (1989) szerint végeztünk.

A fruktóz-1,6-biszfoszfát részleges tisztításához a lemerített algatömeget pufferben 1:1 arányban feltártuk. A centrifugálás után kapott nyers kivonatot PEG 6000 hozzáadásával fracionáltuk. A 13-25% PEG 6000 telítés között kicsapódott anyagot centrifugálás után minimális térfogatú pufferben visszaoldottuk. Az így kapott részlegesen tisztított enzimet használtuk az enzimaktivitás mérésekhez. Az enzim aktivitását kapcsolt enzimreakcióval határoztuk meg. A reakció előrehaladását a 340 nm-en mért abszorpcióváltozás alapján követtük nyomon (Perkin-Elmer  $\lambda_2$ ).

## 2.9. A peroxidáz és a kataláz aktivitások mérése

A 0,2 g-nyi algatömeget izoláló pufferben kvarchomokkal eldörzsöltünk. Centrifugálás után a felülúszót használtuk az enzimaktivitás mérésekhez. Az enzimaktivitásokat spektrofotometriás módszerrel mértük.

Guajakol peroxidáz mérésnél a reakciók előrehaladását 480 nm-en követtük nyomon, szubsztrátként guajakolt használtunk (Simon et al. 1989).

Aszkorbát-peroxidáz mérésnél a reakció előrehaladását 290 nm-en történő méréssel követtük nyomon, szubsztrátként aszkorbinsavat használtunk (Janda et al. 2000).

Kataláz mérésnél a reakció előrehaladását 240 nm-en történő méréssel követtük nyomon.

## **2.10. Fitokelatin szintáz (PC szintáz) enzimaktivitás mérés**

PC szintáz enzimaktivitás méréséhez 0,2 g algaömeget kvarchomokkal kivonópuffer segítségével eldörzsöltünk majd a mintákat centrifugáltuk. Az enzimaktivitás méréséhez a felülúszót használtuk. A reakcióelegy (200 mM Tris-HCl puffert (pH 8,5); 0,5 mM CdCl<sub>2</sub>; 10 mM β-merkaptóetanolt; 10 mM glutationt és 0,2 ml növényi kivonatot tartalmazott, 0,3 ml végtérfogatban) egy órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, majd 0,03 ml 50 %-os szulfoszalicilsavval állítottuk le a reakciót. Kontrollmintánkat 0 időpontban, inkubálás nélkül állítottuk le. A proteinek kicsapását jégen végeztük, 10 percig. A HPLC-s vizsgálat előtt a kicsapott mintákat centrifugáltuk, méréshez a felülúszót használtuk. A fitokelatinokat Li Crospher 100 (250×4 mm) RP18 (5µm) (Merck, Darmstadt, Németország) oszlopon választottuk el, szobahőmérsékleten. Az oszlop után DTNB-vel termékeket képeztünk, amelyeket 410 nm-en detektáltuk UV/VIS detektorral. Az eredményeket glutation egyenértékben adtuk meg nmol-ban (Chen et al. 1997).

A fehérje-tartalom meghatározása Bradford módszerével történt (Bradford 1976).

## **3. Új tudományos eredmények**

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

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

A Cr(III) nem okozott lényeges változást egyik vizsgált növekedési paraméterben sem. A Cr(VI) hatására azonban minden vizsgált paraméter esetében jelentős változás következett be. Az EC<sub>50</sub> érték 2 mg dm<sup>-3</sup>-nek adódott, ami fotoszintetizáló szervezetek esetében magas értéknek számít.

### **3.2. Mikroelem összetétel, króm akkumuláció**

A mérések során 21 elem mennyiségét határoztuk meg a teljes sejtben. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a növekvő Cr(VI) kezeléssel párhuzamosan a Na, P, Fe, és Mg mennyisége csökken, a Ca és Cr mennyisége növekszik, míg a S esetében 5 mg dm<sup>-3</sup> Cr(VI) koncentrációig növekedést, ettől magasabb kezelési koncentrációk esetében csökkenést tapasztalunk. A vizsgált elemek mindegyike elsősorban a sejtfal frakcióban lokalizálódott, míg a membrán és oldható frakciók között a megoszlás azonos nagyságrendű volt.

### **3.3. Fotoszintetikus pigmentek és a szabad aminosavak mennyiségének változása**

A klorofilok mennyisége csökkenést mutat az emelkedő koncentrációjú Cr(VI) kezelést követően. Az  $\alpha$ -karotin mennyisége csökken, a  $\beta$ -karotin mennyisége nő, a Cr(VI) stressz következményeként a  $\beta/\alpha$ -karotin arány a duplájára emelkedik. Az összes szabad aminosav mennyisége 5 mg dm<sup>-3</sup> Cr(VI) kezelési koncentrációig növekszik, ezután csökkenő tendenciát mutat. A stresszfiziológiai szempontból fontos prolin mennyisége 5 mg dm<sup>-3</sup> koncentrációig növekszik a 72 órás kezelés alatt, hasonlóan az összes szabad aminosav mennyiségéhez.

### **3.4. Oxidatív stressz kivédésében fontos szerepet játszó oxidoreduktázok aktivitásának változása**

A guajakol peroxidáz esetében az előzetes kísérleteink alapján a kezelés koncentrációjának és időtartamának előrehaladásával az enzimaktivitás növekszik, magasabb koncentrációknál már az első nap végén eléri a maximumot, majd onnan csökkenést mutat. Az aszkorbinsav peroxidáz aktivitása 0,1 mg dm<sup>-3</sup> Cr(VI) koncentrációnál nem mutatott eltérést a kontrollhoz képest, a többi kezelésénél az enzimaktivitások már az első nap végére elérték maximumukat, majd csökkenni kezdenek. A kataláz aktivitásában beálló változások némileg eltérő képet mutatnak. Az alacsonyabb és a legmagasabb koncentrációk esetében az enzim aktivitása csökkent, 1-10 mg dm<sup>-3</sup> koncentrációk esetében pedig növekedett.

### **3.5. Fitokelatin szintáz aktivitásának változásai**

A vizsgálatok során először mi mutattunk ki fitokelatin szintáz aktivitást fotoszintetizáló szervezetben Cr(VI) kezelés hatására. Az enzim aktivitása már a legalacsonyabb koncentrációban is megemelkedett, aktivitásának maximumát az első nap végére érte el, ezután csökkenő tendenciát tapasztalhattunk.



### 3.6. Fotoszintetikus aktivitásban beálló változások

Alacsony ( $1 \text{ mg dm}^{-3}$ ) koncentrációjú Cr(VI) kezeléseket esetében nem volt lényeges eltérés a minták  $F_0$  és  $F_m$  értékei között, magasabb koncentrációk irányában az  $F_0$  értéke emelkedik. Ez a hatás a sejtek PS II pigmenttartalmának csökkenésével hozható kapcsolatba. Ezzel ellentétes irányban változnak meg a kezelt sejtek  $F_m$  értékei, melyek a magasabb koncentrációjú minták esetében csökkennek. Ezek a változások a PS II és a tilakoidstruktúra megváltozására utalhatnak. Az  $F_v/F_m$  értéke növekvő kezelési koncentrációval folyamatosan csökken. Az  $F_m/F_0$  értékekben beállt változások is a fotoszintézis hatékonyságának csökkenését mutatják. A fejlődött oxigén mennyisége csökken az idő és a Cr(VI) koncentráció függvényében. Fenil-p-benzokinon jelenlétében - ami a PS II mesterséges elektronakceptora - a csökkenés lassabban következik be, ami arra utal, hogy a fotoszintézis elsődlegesen a PS II mögött gátolt.

### 3.7. Szénhidrát anyagcsere

A keményítő mennyisége csökken a növekvő Cr(VI) koncentrációval, a mono- és diszaharidok esetében a csökkenés csak a magasabb koncentrációknál következik be. A glikolitikus irányú folyamatok katalíziséért felelős PFK és PFP enzimek aktivitásában nem tapasztaltunk jelentős változást, míg a glikoneogenetikus folyamatot katalizáló FBP-áz aktivitása csökken.

### 3.8. Összegzésként

Megállapíthatjuk, a *Chlorella pyrenoidosa* képes felvenni a Cr(VI)-ot és akkumulálni, bár a növekedési paramétereket csökkenti. Ugyan a *Chlorella* sejtek nem tekinthetők króm hiperakkumulátornak, vizsgáljuk, hogy milyen szerepet játszhatnának nehézfémek által szennyezett vizek fitoremediációjában. Mintegy  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  koncentrációig a sejtek hatékonyan alkalmazzák a nehézfém stresszekkel szemben védő mechanizmusokat, valamint képesek megkötni a krómot. Ettől magasabb koncentrációk azonban a sejtanyagcsere összeomlásához vezetnek.



## 1. Introduction and objectives

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

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

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

In photosynthesizing organisms, heavy metals may result in characteristic modifications in physiological and biochemical processes (plasma membrane damages, formation of oxygen radicals, appearance of free metal ions in cytosol, disorders of nutrient uptake, water balance and photosynthesis, limited growth, reduced production of flowers and seeds), which appear as a direct and/or indirect consequences of presence of contaminants.

As chromium is a toxic heavy metal, which often gets to the environment in large quantities, the aim of our researches was to determine its effects on certain metabolic processes of a well known species of green algae (*Chlorella pyrenoidosa*). Chromium was selected for analysis because molecular mechanisms of its effects on living organisms are not widely known, however these mechanisms are under investigation presently as well. Use of algae provides new opportunities to reveal the processes of indication, accumulation, and elimination. Various species of algae are often able to accumulate large amount of heavy metals. In algae, the uptake and fixation of these heavy metals usually lead to redox processes, which transform a given heavy metal ion into a less soluble form. Additionally, this form of heavy metal is less effective for

living organisms. Indirectly, our study examines the possibilities of using of green algae in the restoration of a heavy metal contaminated wetland.

During our studies, we examined the effects of Cr (VI) on the reproduction of *Chlorella pyrenoidosa* green algae species. Furthermore, alteration of main metabolic processes characterizing the heavy metal stress were also investigated.

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

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Algal cultures

The algae used in this study were *Chlorella pyrenoidosa* (strain IAM-C128) obtained from the collection of the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo (Japan). Chemicals were purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA), and Serva Fine Biochem. GmbH. (Heidelberg, Germany).

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

## 2.2. Treatment of algae with chromium compounds

Potassium dichromate was used as hexavalent chromium. The cultures were grown for 3 in some case 4 days. When cultures reached approximately  $1 \times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup> in the nutrient medium, algae were treated with 0.1 - 50 mg dm<sup>-3</sup> of chromium (VI). We used K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> as hexavalent and Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> as trivalent chromium. For each experiment a control was also prepared of untreated *Chlorella pyrenoidosa* cells kept at the same conditions. Algae were autotrophically propagated for 72 hours after chromium treatments.

## 2.3. Analysis of growth rate

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

## 2.4. Fractionation of algal cells and elemental analysis

For fractionation algal cells were harvested by centrifugation at 5000g × 10 min, were washed twice with deionized water, centrifuged, and the weight of the cells was determined. This type of sample was considered as whole cells (sample 1). These prepared cells were disrupted using French press at 1500 kgf/cm<sup>2</sup> three times. The homogenate was centrifuged at 3000g × 20 min and the pellet was allowed to stand in 1 ml of 0.5 % sodium n-dodecyl sulphate (SDS) for 30 min. The homogenate with SDS was centrifuged at 10000g × 20 min to remove the soluble component, and the pellet was boiled in 80% ethanol for 20 min. The cell wall fraction was prepared by centrifuging the ethanol boiled pellet at 10000g × 20 min (sample 2). The miscellaneous fraction was prepared as the mixed supernatant after the treatment with SDS and ethanol (sample 3). The homogenate was centrifuged 15000g × 45 min after disruption of cells. The pellet was the membrane fraction (sample 4) and the supernatant was the soluble fraction (cytoplasmic) (sample 5) (Okamura and Aoyama 1994).

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

## **2.5. Extraction of photosynthetic pigments of algae and their separation by HPLC**

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

## **2.6. Amino acid analysis**

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

## **2.7. Photosynthetic measurements**

The rate of oxygen evolution of intact algal cells was measured by using a Clark-type oxygen electrode (Hansatech, Kings Lynn, UK) at a chlorophyll concentration of 10-20 µg ml<sup>-1</sup> in a temperature controlled cell at a constant 25 °C in cultivation medium at saturating light intensity. The PS II electron transport rate was measured in the presence of 500 µM phenyl-p-benzoquinone.

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

## **2.8. Assays of carbohydrate-metabolism**

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

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

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

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

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

## **2.9. Assay of peroxidase and catalase activity**

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

Guajacol peroxidase activity was measured, by recording changes in absorbance at 480 nm. The brown colour developed due to the oxidation of guajacol as hydrogen donor in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was spectrophotometrically measured (Simon et al. 1989).

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

## **2.10. Phytochelatin synthase assay**

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

The reaction mixture (200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.5 mM CdCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM glutathion and 0.2 ml extract in 0.3 ml final volume) were incubated for an hour at 37 °C, and were terminated by 0.03 ml 50% sulphosalicylic acid. Control samples were terminated without incubation at 0 min. Proteins were precipitated on ice, for 10 minutes. After centrifugation, the supernatants were assayed by HPLC technique.

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

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

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

### **3. New scientific results**

The dissertation examines the effects of toxic heavy metal ions Cr(VI) and Cr(III) on certain metabolic processes of *Chlorella pyrenoidosa* green algae species. Since its photosynthetic apparatus is similar to that of vascular plants, *Chlorella pyrenoidosa* is a popular and common test organism of biochemical and stress-biological experiments; however it can be described by a rapid reproduction. Consequently, it allows to perform a large number of tests and repetitions. These test are easy to reproduce and control.

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

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

#### **3.2. The composition of micro-elements and the accumulation of chromium**

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

#### **3.3. Changes in the amounts of photosynthetic pigments and free amino acids**

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

#### **3.4. Changing activities of oxidoreductases as important factors of the protection against oxidative stress**

On the basis of our preliminary examinations with guajakol peroxidase, increasing concentrations and periods of treatment lead to increasing enzyme activities. In case of higher concentrations, enzyme activity reaches its maximum for the end of the first day, while later it decreases. In case of  $0.1 \text{ mg dm}^{-3}$  Cr(VI) concentrations, ascorbic acid peroxidase activity did not differ from the control. In case of the other samples, enzyme



activities reached their maximum for the end of the first day, and later they began to decrease. Activity of catalase shows slightly different alterations. The lower and the highest concentrations decreased this enzyme activity, while 1-10 mg dm<sup>-3</sup> concentration increased it.

### 3.5. Alterations in the activity of phytochelatin synthase

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

### 3.6. Changes in the photosynthetic activity

In case of low (1 mg dm<sup>-3</sup>) Cr(VI) concentrations, F<sub>0</sub> and F<sub>m</sub> values of samples did not show significant differences, but increasing concentrations led to increasing F<sub>0</sub> values. This can be explained by the declining amount of PS II pigments in cells. Oppositely, F<sub>m</sub> values of treated cells decreased with the increasing concentrations. These changes may suggest the modifications of PSII and the thylacoid structure. F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> values decreases as treatment concentrations increases. Changes of F<sub>m</sub>/ F<sub>0</sub> values also point to the declining photosynthetic effectiveness. Amount of developed oxygen decreases as a function of time and Cr(VI) concentration. In the presence of PpBQ, which is an artificial electron acceptor of PSII, this declining process is slower suggesting that photosynthesis is primarily limited behind the PS II.

### 3.7. Carbohydrate metabolism

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

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

## 4. Irodalom / References

- Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1949, 24: 1-15.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-256.
- Chen, J., Zhou, J., Goldsbrough, P.B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* 1997, 101: 165-172.
- Galiba, G., Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Salgo, A., Sutka, J. Possible chromosomal location of genes determining the osmoregulation of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1992, 85: 415-418.
- Höresik, T. Zs., Oláh, V., Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., Lakatos, G. Effect of chromium (VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biologica Szegediensis* 2006. 50 (1-2). 19-25.
- Janda, T., Szalai, G., Antunovics, Zs., Horváth, E., Páldi, E. Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 2000, 45:29-33.
- Kiss, F., Johnson, T.C., Klecan, A.L., Vincze, Gy., Buchanan, B.B., Balogh, Á. Identification of two forms of PFK and fructose-2,6-bisphosphate independent form of PFP in a green alga. *Photosynthesis Res.* 1989, 21: 123-128.
- Okamura, H., Aoyama, I. Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. *Env. Toxic. and Water Qual.* 1994, 9: 7-15.
- Rose, R., Rose, L.C., Omi, S.K., Forry, R.K., Durrel, M.D., Bigg, W.L. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food. Chem.* 1991, 39: 2-11.
- Simon L., Kiss F., Bakó A., Hajdú F., Höresik T.Zs., Balogh A., Pais I. Effect of gallium on photosynthetic pigments and peroxidase activity of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Plant Nutrition* 1989, 12: 1123-1140.
- Simon, L., Hajdu, F., Biacs, P.A. Separation and determination of *Chlorella* photosynthetic pigments by HPLC. *Proceedings of the 2nd International Conference on Biochemical Separations, Keszthely, 1988, 305-311.*

## 5. Az értekezés témakörében készült közlemények

### 5.1. Az értekezés témakörében készült folyóiratközlemények

- Simon, L., Kiss, F., Bakó, A., Hajdú, F., Höresik, T. Zs., Balogh, Á., Pais, I. Effect of gallium on photosynthetic pigments and peroxidase activity of *Chlorella pyrenoidosa* *Journal of Plant Nutrition* 1989. 12 (10). 1123-1140. **IF:0,506**

Bakó, A., Simon, L., Kiss, F., Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. A gallium hatása a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgára 2. A gallium hatása a Chlorella peroxidáz enzimére. Acta Academiae Pedagogicae Nyíregyháziensis 1991. TOM. 12/B

Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Intracellular distribution of chromium and toxicity on growth in *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biologica Szegediensis 2002. 46 (3-4). 57-58.

Hörcsik, T. Zs., Szalay, G., Pál, M., Oláh, V., Mészáros, I., Lakatos, G., Balogh, Á. Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására. Hidrológiai közlöny. 2004. 84 (5-6). 50-52.

Hörcsik, T. Zs., Szalay, G., Pál, M., Oláh, V., Mészáros, I., Lakatos, G., Balogh, Á. Szénhidrát-anyagcsere változása *Chlorella pyrenoidosa*-ban Cr(VI) és Cd stressz hatására. Hidrológiai közlöny. 2005. 85 (6) 47-49.

Hörcsik, T. Zs., Oláh, V., Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., Lakatos, G. Effect of chromium (VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biologica Szegediensis 2006. 50 (1-2). 19-25.

Hörcsik, T. Zs., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Lakatos, G., Garab, G. Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. Photosynthetica 2007. 45 (1). 65-69. **IF:0,782**

## **5.2. Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek**

Hörcsik, T. Zs., Vincze, Gy., Kiss, F., Nádas, E., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) on some oxidoreductase of *Chlorella pyrenoidosa*. Book of abstracts Stress of Life, Budapest 1997. pp.162.

Hörcsik, T. Zs., Kiss, F., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) carbohydrate-metabolism of *Chlorella pyrenoidosa*. Book of abstracts XI. International Congress on Photosynthesis. 1998. pp.180.

Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) on carbohydrate-metabolism of *Chlorella pyrenoidosa* Plant Physiology and Biochemistry 2000. vol 38. pp.186. **IF: 1,414**

Hörcsik, T. Zs., Balogh, Á. Effects of chromium (VI) on growth and elemental composition of *Chlorella pyrenoidosa* Book of abstracts, 10th International Trace Elements Conference, Budapest pp.2000. pp.21.

Hörcsik, T. Zs., Mészáros, I., Balogh, Á., Lakatos, G. Effect of chromium(VI) and cadmium on growth, photosynthetic pigment composition and oxidoreductases activity of *Chlorella pyrenoidosa*. Book of abstracts, Shallow Lakes, Dalfsen. 2005. pp.81.

## **5.3. Egyéb közlemények**

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

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

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

#### **5.4. Egyéb előadások, poszterek**

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

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

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

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

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

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

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

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