

Mikrolevät ja syanobakteerit kasvien biostimulantteina

LuK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemian tutkinto-ohjelma

maaliskuu 2024

Ella Andersin

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

ANDERSIN ELLA: Mikrolevät ja syanobakteerit kasvien biostimulantteina

LuK-tutkielma, 18 s.

Biokemia

maaliskuu 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Tulevaisuuden ruuantuotannon turvaamiseksi tarvitaan uusia ympäristöystävällisiä keinoja kasvien kasvun tehostamiseen maanviljelyssä. Tämän tutkielman tavoitteena on pohtia, voitaisiinko ongelman ratkaisussa käyttää fotosynteettisistä mikrolevistä ja syanobakteereista saatavia biostimulantteja.

Mikrolevissä ja syanobakteereissa on havaittu esiintyvän useita potentiaalisia biostimulantteina vaikuttavia yhdisteitä. Kyseisistä mikro-organismeista löytyy esimerkiksi kasvihormonien kaltaisia yhdisteitä, kuten auksiineja, sytokiniineja, gibberelliinejä, abskissihappoa ja etyleeniä. Muita mahdollisia biostimulantteina toimivia yhdisteitä ovat muun muassa tietyt polysakkaridit, aminohapot, antioksidantit, fenoliset yhdisteet sekä C-fykosyaniini.

Mikroleviä ja syanobakteereita voidaan hyödyntää biostimulantteina useissa eri muodoissa. Kun organismeja on saatu kasvatettua tarpeeksi, voidaan ne prosessoida esimerkiksi kuivaksi biomassaksi, jalostaa utteiksi tai kasvatukset voidaan hyödyntää elävinä. Valmiit biostimulantit voidaan antaa kasveille siementen käsittelyn, lehtien ruiskutuksen tai juurien ja maaperän kastelun välityksellä.

Tulokset mikrolevien ja syanobakteerien biostimulanttisisistä ominaisuuksista ovat lupaavia. Tällä hetkellä alavirtaprosessien hinta ja tekniikat ovat kuitenkin suurimpana esteenä teolliseen tuotantoon siirtymisessä. Lisäksi monien biostimulanttien vaikutusmekanismeja ei vielä tunneta. Jatkotutkimukset ovat siis tarpeellisia. Lisäpotentiaalia tuo kuitenkin mahdollisuus yhdistää mikrolevätuotanto esimerkiksi jäteveden puhdistuksen yhteyteen ja liittää se osaksi kiertotaloutta.

Avainsanat: Biostimulantti, mikrolevät, syanobakteerit

Sisällys

1. Johdanto	2
2. Mikrolevät ja syanobakteerit	2
3. Biostimulanttien vaikuttavat aineet	4
3.1 Mikrolevistä saatavat kasvihormonien kaltaiset yhdisteet	4
3.1.1 Auksiinit	4
3.1.2 Sytokiniinit	4
3.1.3 Gibberelliinit	5
3.1.4 Abskissihappo	5
3.1.5 Etyleeni	5
3.2 Muut hormonien kaltaiset signalointimolekyylit	6
3.3 Polysakkaridit	7
3.4 Muut metaboliitit	7
3.4.1 Aminohapot	7
3.4.2 Antioksidantit	8
3.4.3 Fenoliset yhdisteet	8
3.4.4 C-fykosyaniini	8
4. Valmiit biostimulantit	9
5. Käsittelytekniikat	11
5.1 Siementen käsittely	11
5.2 Lehtien ruiskutus	12
5.3 Juurien ja maaperän kastelu	13
6. Tarkastelussa <i>Arthrospira platensis</i>	13
7. Yhteenveto	14
Lähteet	16

1. Johdanto

Globaali ruuantuotanto on suurien haasteiden edessä. Maapallon väestön arvioidaan kasvavan 9,6 miljardiin vuoteen 2050 mennessä, ja tämä kasvava väestö pitäisi saada ruokittua. Kuitenkin tälläkin hetkellä noin 10 % maailman väestöstä kärsii nälästä ja vielä suurempi osa aliravitsemuksesta. (Wu ja muut 2014.) Lisää haasteita tuovat rajoittunut viljelyspinta-ala, kasvitaudit, hupenevat luonnonvarat, ilmastonmuutos sekä luontokato.

Tähän mennessä viljelykasvien kasvua on pyritty tehostamaan pääosin synteettisiä lannoitteita käyttämällä. Tämä on kuitenkin tapahtunut ympäristön kustannuksella, sillä yleisesti käytetyt tuotantoprosessit kuluttavat usein uusiutumattomia luonnonvaroja ja vievät runsaasti energiaa. Synteettisten lannoitteiden liikkakäyttö johtaa myös niiden valumiseen vesistöihin ja aiheuttaa näin ollen myös muun muassa rehevöitymistä sekä vesistöjen saastumista. (Mahapatra ja muut 2022.) On siis löydettävä ympäristöystävällisiä ratkaisuja maanviljelyn tehostamiseen.

Biostimulantit ovat kasvien kasvatuksessa käytettäviä yhdisteitä, joiden tavoitteena on edesauttaa ravinteiden ottoa maaperästä, tehostaa ravinteiden hyödyntämistä, lisätä sietokykyä abioottista stressiä vastaan tai parantaa viljelysten laatua. Erona lannoitteisiin biostimulantit voivat parantaa kasvien ominaisuuksia riippumatta itse yhdisteen ravinnepitoisuudesta. Lisäksi biostimulantit parantavat maaperän sijaan itse kasvin tai kasvin ritsosfäärin eli välittömästi kasvin juurten läheisyydessä olevan maaperän ominaisuuksia. (du Jardin 2015.)

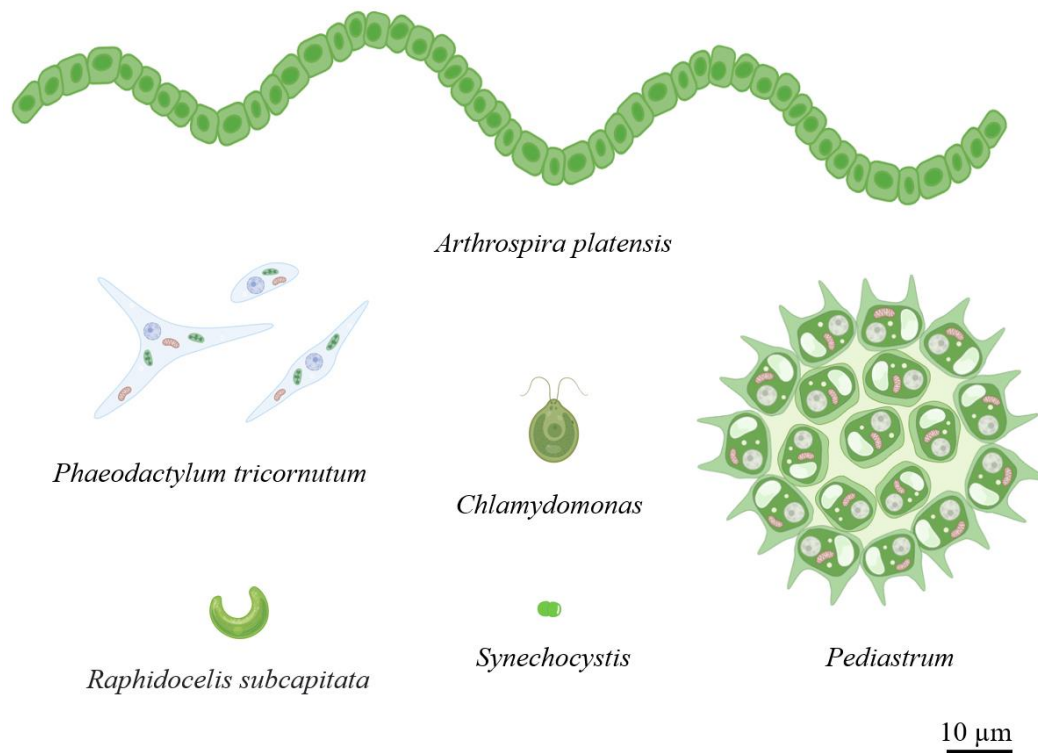
Mikrolevät ovat monimuotoinen ryhmä yksisoluisia omavaraisia aitotumaisia, joista suurin osa kykenee fotosynteesiin. Ne pystyvät kasvamaan tehokkaasti ja tuottavat biologisesti aktiivisia yhdisteitä. Mikrolevien omavaraisuus sekä joustava sopeutumiskyky mahdollistavat niiden kasvatuksen vähillä resursseilla ilman tarvetta ylimääräisten orgaanisien yhdisteiden lisäämiselle. Muun muassa nämä ominaisuudet ovat lisänneet mielenkiintoa mikrolevätutkimusta kohtaan. Mikrolevien lisäksi myös syanobakteerit ovat kasvavan kiinnostuksen kohteena, sillä niillä on samoja ominaisuuksia kuin mikrolevillä. (Dolganyuk ja muut 2020.) Tutkielman tavoitteena on selvittää, miten mikrolevistä ja syanobakteereista saatavilla biostimulanteilla voidaan tehostaa maanviljelyä.

2. Mikrolevät ja syanobakteerit

Mikrolevät ovat yksisoluisia aitotumaisia pääosin fotosynteettisiä mikro-organismeja, joita tavataan monimuotoisissa ympäristöissä niin makeissa ja suolaisista vesissä kuin maaperässä. Suurin osa lajeista viihtyy vesipitoisissa elinympäristöissä. Mikrolevä-termiä käytetään usein kuvamaan varsinaisten mikrolevien lisäksi myös syanobakteereja. Vaikka syanobakteerit ovatkin fotosynteettisiä mikro-organismeja, eivät ne ole aitotumaisia vaan esitumaisia. Syanobakteereilla

ja mikrolevillä on kuitenkin hyvin samankaltaisia fysiologisia sekä ekologisia piirteitä. Myös niiden biotekniset sovellukset ovat usein hyvin lähellä toisiaan. (Thoré ja muut 2023.)

Mikrolevät ja syanobakteerit muodostavat vesistöjen kasviplanktonin toimien näin ollen vesiekosysteemien primäärituottajina. Ne myös vastaavat merkittävästä osasta merien biogeokemiallisesta kierrosta. Mikrolevät ja syanobakteerit voivat elää yksittäisinä tai ryhmissä. Ryhmissä elävät mikro-organismit voivat esiintyä hyvin erikokoisina ja muotoisina joukkoina. Ryhmä voi koostua vain muutamasta yksilöstä tai saavuttaa jopa usean sadan mikrometrin pituuden. (Thoré ja muut 2023.) Kasviplanktonin fenotyypistä monimuotoisuutta on havainnollistettu kuvassa 1.



Kuva 1. Mikrolevien ja syanobakteerien muodostaman kasviplanktonin fenotyypistä monimuotoisuutta. Ylhäällä *Arthrospira*-yhdyskunta. Keskellä vasemmalta oikealle *Phaeodactylum tricornerutum*, *Chlamydomonas* ja *Pediastrum* -yhdyskunta. Vasemmalla alhaalla *Raphidocelis subcapitata* ja keskellä alhaalla *Synechocystis*. Kuva on tehty BioRender-ohjelmalla.

Mikrolevillä on hyvin vaihteleva evolutiivinen historia, mikä tekee niistä erittäin monimuotoisen ryhmän mikro-organismeja. Tämä on mahdollistanut mikrolevien ja syanobakteerien sopeutumisen moniin erilaisiin ympäristöihin. Esimerkiksi rannikoille sopeutuneet organismit ovat tottuneet niukempaan valomääriin, runsaampaan ravinnepitoisuuteen ja turbulenssiin. Avomerten mikrolevät ovat taas tottuneet vähäisempään ravinnepitoisuuteen ja voimakkaampaan säteilyyn. (Hopes ja Mock 2015.)

Mikrolevien kyky sopeutua erilaisiin ympäristöihin, niiden joustava metabolia sekä kyky tuottaa bioaktiivisia yhdisteitä tekee niistä mielenkiintoisen tutkimuskohteen. Osalla mikrolevistä

saatavista yhdisteistä on havaittu olevan biostimulanttisia ominaisuuksia. Tämä onkin saanut monet pohtimaan niiden mahdollista roolia maanviljelyn tehostamisessa. (Dolganyuk ja muut 2020.)

3. Biostimulanttien vaikuttavat aineet

3.1 Mikrolevistä saatavat kasvihormonien kaltaiset yhdisteet

Kasvihormonit ovat kasveissa esiintyviä signaalintyhdisteitä, jotka pieninä määrinä vaikuttavat kasvien kehitykseen sekä aineenvaihduntaan. Ne muun muassa vaikuttavat verson sekä juurien kasvuun ja muodostumiseen, hedelmöittymiseen, solukkojen erilaistumiseen, vanhenemiseen sekä puolustukseen. Kasvihormoneihin kuuluvat muun muassa auksiinit, sytokiniinit, gibberelliinit, abskissihappo ja etyleeni. (Parmar ja muut 2023.) Kasvien lisäksi myös mikrolevissä esiintyy näitä yhdisteitä, mutta koska tässä tapauksessa yhdisteet ovat peräisin muista organismeista kuin kasveista, kutsutaan niitä kasvihormonien sijaan kasvihormonien kaltaisiksi yhdisteiksi. Onkin pohdittu, voisiko näitä mikrolevistä saatavia kasvihormonien kaltaisia yhdisteitä hyödyntää kasvien kasvun ja kestävyuden edistämiseksi. On myös mahdollista, että biostimulantit vaikuttavat kasvin omaan hormonien tuotantoon (Santoro ja muut 2023).

3.1.1 Auksiinit

Auksiinit ovat tryptofaanista johdettuja kasvihormoneja (Santner ja muut 2009). Mikrolevien tyypillisimpiä auksiineja ovat indoli-3-etikkahappo (engl. *indole-3-acetic acid*, IAA) sekä indoli-3-butaanihappo (engl. *indole-3-butanoic acid*, IBA). Ne osallistuvat muun muassa solujen kasvun ja jakautumisen säätelyyn, tropismiin sekä stressivasteeseen. Auksiinit edistävät juuren sekä kärkisilmun kehittymistä ja estävät sivusilmujen kasvua. Mikrolevistä eristetyn auksiinin on havaittu lisäävän kasvien juurien sekä solujen kasvua. (Han ja muut 2018; Parmar ja muut 2023.) Myös esimerkiksi *Nostoc*-suvun syanobakteerien tuottamien auksiinien (IAA) on havaittu edistävän riisin ja vehnän kasvua (Hussain ja muut 2015). Auksiinin ja muiden kasvihormonien kaltaisten yhdisteiden rakenteita on havainnollistettu kuvassa 2.

3.1.2 Sytokiniinit

Sytokiniinit ovat N6-substituoituja adeniinista johdettuja kasvihormoneita, joissa on joko isoprenoidinen tai aromaattinen sivuketju (Santner ja muut 2009). Ne osallistuvat moniin eri kasveissa tapahtuviin fysiologisiin prosesseihin. Sytokiniinit stimuloivat solujen jakautumista sekä kasvua. Ne kontrolloivat solukkojen erilaistumista edistämällä verson muodostumista kalluksesta ja inhiboimalla juuren kärkikasvusolukon kehittymistä. Ne myös edistävät kloroplastien erilaistumista sekä estävät lehtien vanhenemista. Isoprenoidisia ja aromaattisia sytokiniineja on löydetty 45 mikrolevälajista. (Romanenko ja muut 2016.) Yleisimpiä

mikrolevistä löytyneitä sytokiniinejä ovat zeatiini, kinetiini sekä isopentenyyliadenosiini. Mikrolevistä johdettujen sytokiniinien on huomattu lisäävän kasvien abioottista stressinsietokykyä. (Parmar ja muut 2023.)

3.1.3 Gibberelliinit

Gibberelliinit ovat kasvien kasvuun vaikuttavia kasvihormoneja. Ne ovat diterpenoideja ja niillä on joko tetra- tai pentasyklinen rakenne. Erilaisia gibberelliinejä on löydetty yli sata, mutta vain muutamat näistä ovat fysiologisesti aktiivisia. Suurin osa gibberelliineistä on happoja (engl. *gibberellic acid*, GA), ja ne on nimetty niiden havaitsemisjärjestyksessä. Aktiivisimpia gibberelliinejä ovat GA₁, GA₃, GA₄, GA₅ sekä GA₇. Gibberelliinien on havaittu muun muassa kasvattavan lehtien pinta-alaa sekä nivelvälien määrää, stimuloivan varren, verson sekä juurien kasvua ja vaikuttavan siemenien, mukuloiden sekä sipuleiden itämiseen. Ne myös edistävät kukkimista, aktivoivat hedelmän kehitystä sekä osallistuvat kasvin sukupuolen, kestävyuden ja terälehtien säätelyyn. (Romanenko ja muut 2016.)

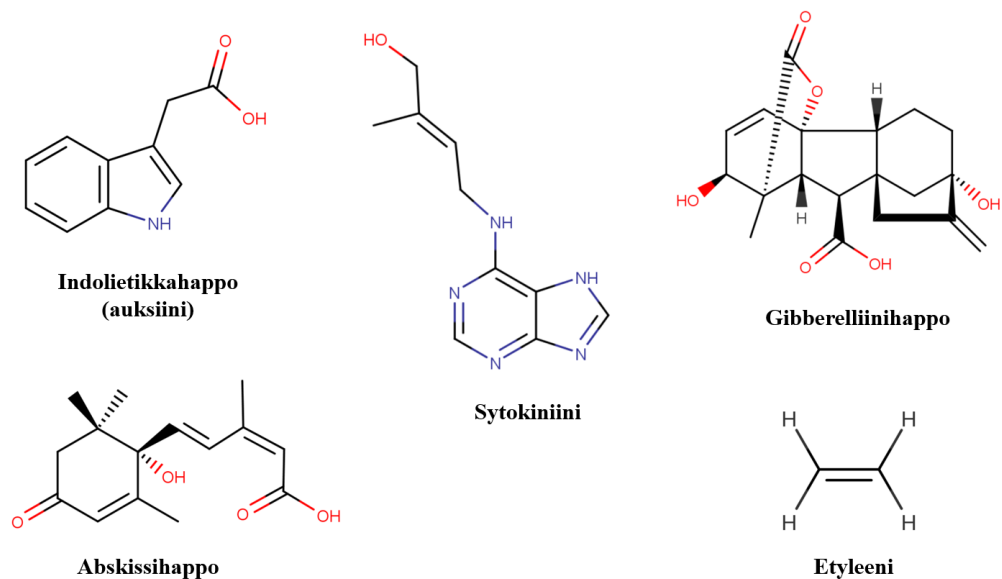
Gibberelliinejä on löydetty muutamasta kymmenestä mikrolevälajista, mutta tulokset ovat hajanaisia ja rajallisia. Monimuotoisimmin ja runsaimmin gibberelliinien on havaittu esiintyvän *Coelastrella terrestris* -lajissa. Myös *Tetraselmis* -mikrolevälajin on havaittu sisältävän merkittäviä määriä gibberelliinin kaltaisia yhdisteitä. GA₆ on ollut yleisin mikrolevissä havaittu gibberelliini. (Romanenko ja muut 2016.) Gibberelliinien potentiaalista kykyä sitoa raskasmetalleja ja vähentää näiden negatiivisia vaikutuksia on myös pohdittu (Han ja muut 2018).

3.1.4 Abskissihappo

Abskissihappo (engl. *abscisic acid*, ABA) on kasvihormoni, joka vaikuttaa esimerkiksi kasvin vanhenemiseen ja lepotilaan siirtymiseen sekä lisää kestävyyttä stressiä vastaan. Se on rakenteeltaan seskviterpeeni. ABA saa aikaan ilmarakojen sulkeutumisen ja lehtien putoamisen. Se ylläpitää siemenen ja silmujen lepotilaa sekä inhiboi kasvin kasvua sekä proteiinien ja nukleotidien synteesiä. (Han ja muut 2018.)

3.1.5 Etyleeni

Etyleeni on kaasumainen kasvihormoni, jolla on tehtävä monessa eri prosessissa, kuten vanhenemisessa, kasvin kasvussa ja kehityksessä sekä niin abioottisilta kuin bioottisilta stressitekijöiltä suojaautumisessa. Lisäksi se muun muassa edistää hedelmän kypsymistä sekä laukaisee kolmoisvasteen. (Han ja muut 2018.) On havaittu, että syanobakteerilajit, kuten *Anabaena* spp., *Synechococcus* spp. ja *Nostoc* spp. sekä *Chlorella*-, *Chlamydomonas*- ja *Scenedesmus* -sukujen mikrolevät, tuottavat etyleeniä (Kapoor ja muut 2021; Lu ja Xu 2015).



Kuva 2. Mikrolevistä ja syanobakteereista saatavia kasvihormonien kaltaisia yhdisteitä.

3.2 Muut hormonien kaltaiset signaalintimolekyylit

Erilaisten kasvihormonien lisäksi mikrolevissä sekä syanobakteereissa esiintyy hormonien kaltaisia, pieniä signaalintimolekyylejä, kuten jasmoni- ja salisyylihappoja, brassinosteroideja sekä polyamiineja (Parmar ja muut 2023).

Brassinosteroidit ovat steroidirakenteisia molekyylejä. Niitä on löydetty 24 mikroleväkannasta. Tomaatti- ja papukasvien lehtiin levitettynä brassinosteroidien on havaittu lisäävän lämpöstressin sietokykyä sekä karboksylaatiotehokkuutta ja antioksidanttien aktiivisuutta lehdistä. (Kapoore ja muut 2021.) Mikrolevistä löydetty brassinosteroidialatyypit ovat olleet brassinolidi sekä kastasteroni (Kapoore ja muut 2021; Parmar ja muut 2023).

Polyamiinit ovat polykationeja, jotka vaikuttavat kasvin kehitysprosesseihin, stressivasteisiin sekä kasvuun. Yleisimpiin polyamiineihin kuuluvat spermidiini, spermiini ja putreskiini. (Parmar ja muut 2023.) Esimerkiksi *Arthrospira plantensis* -syanobakteerin sisältämien polyamiinien on havaittu edistävän kasvin kasvua sekä solujen jakaantumista (Mógor ja muut 2018).

Jasmoni- ja salisyylihapot ovat kasvin viestinnässä ja signaloinnissa toimivia molekyylejä, joita on löydetty lähes kaikista mikrolevälajeista. Ne osallistuvat muun muassa biottisen stressivasteen muodostamiseen. Lisäksi niillä on oleellinen rooli esimerkiksi glykolyysissä, siementen itämisessä, kukkimisessa, ionien kuljettamisessa, antioksidanttigeenien säätelyssä ja lämpötoleranssissa. (Parmar ja muut 2023.) Salisyylihapon ja jasmonihapon signaalitiet ovat yhteydessä kasvihormonien signaalointiin. Niillä on synergistinen vaikutus ABA:n sekä etyleenin kanssa ja antagonistinen vaikutus gibberelliinien, auksiinien ja sytokiniinien kanssa. (Kapoore ja muut 2021.)

3.3 Polysakkaridit

Polysakkaridit ovat monimuotoinen joukko neutraaleista monosakkarideista rakentuvia makromolekyylejä, joiden substituutio- ja polymerisaatioaste sekä biologinen aktiivisuus vaihtelevat tapauskohtaisesti (Parmar ja muut 2023). Mikrolevien polysakkaridit koostuvat pääosin pentoosi ja heksoosi monosakkarideista, kuten glukoosista, galaktoosista ja ksyloosista. Osa mikrolevistä sisältää polysakkarideja luonnollisesti suurina konsentraatioina. Osa lajeista taas kykenee muuttamaan aineenvaihduntaansa tietyissä olosuhteissa sokereiden tuottamiseksi. Tällaisia metaboliaan vaikuttavia olosuhteiden muutoksia voivat olla esimerkiksi vaihtelut valossa, lämpötilassa, ravinteissa tai suolapitoisuudessa. (Moreira ja muut 2022.)

On havaittu, että mikrolevistä, kuten *Arthrospira platensis* ja *Dunaliella salina*, saatavien polysakkaridiraakauutteiden antaminen tomaatille, *Solanum lycopersicum*, kastelun välityksellä on parantanut muun muassa kasvin verson kuivapainoa ja pituutta sekä nivelten määrää. Lisäksi käsittelyn on havaittu lisäävän klorofyllin, proteiinien ja karotenoidien konsentraatioita kasvissa. (Moreira ja muut 2022.)

Eksopolysakkardit (EPS) ovat kasvatusliuokseen eritettäviä polysakkarideja, joita esimerkiksi *Phormidium* spp., *Plectonema* spp., *Nostoc* spp., *Calothrix* spp. sekä *Arthrospira platensis* syanobakteerien tiedetään tuottavan. Eksopolysakkaridien on havaittu edistävän biofilmien muodostumista sekä kosteuden ja ravintoaineiden kertymistä maaperässä. Myös mikrolevälajien, kuten *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella vulgaris* ja *Porphyridium cruentum*, on havaittu tuottavan kasvien kasvua edistäviä polysakkarideja. Mikrolevistä saatavien polysakkaridien on myös havaittu parantavan kasvin puolustukseen osallistuvien entsyymien aktiivisuutta, sekä vahvistavan kasvin kestävyyttä suolapitoisuuden nousua vastaan. (Parmar ja muut 2023.)

3.4 Muut metaboliitit

3.4.1 Aminohapot

Myös mikrolevistä ja syanobakteereista johdettujen proteiinihydrolysaattien, kuten vapaiden aminohappojen sekä peptidien, on havaittu edistävän kasvien kasvua. Esimerkiksi *Arthrospira* -syanobakteerista eristettyjen proteiinihydrolysaattien levittäminen *Petunia x hybrida* -kasvin lehdille on havaittu edistävän kasvin juurien kasvua, kasvin tuore- ja kuivapainoa sekä juurien kasvua. (Kapoore ja muut 2021.)

Joidenkin aminohappojen, kuten proliinin, on raportoitu toimivan kelatoivina yhdisteinä, jotka voivat edistää kasvien parempaa mikroravinteidenottokykyä. Kelatoivat aminohapot voivat myös suojata kasveja raskasmetalleilta. (du Jardin 2015.) Aminohapot, kuten betaiini, glysiini sekä proliini, voivat myös vähentää esimerkiksi suolaisuudesta ja raskasmetalleista aiheutuvaa abioottista stressiä toimimalla osmoprotektanteina sekä antioksidanteina (Parmar ja muut 2023).

Tietyt mikrolevät ja syanobakteerit voivat olla erityisen houkuttelevia biostimulanttituotannon kannalta. Esimerkiksi runsaasti tyrptofaania ja arginiinia sisältävät lajit voivat olla hyviä kandidaatteja, sillä kyseiset aminohapot toimivat auksiinin sekä polyamiinin lähtöaineina. Esimerkiksi *Arthrospira platensis* -syanobakteeri on tällainen laji. (Parmar ja muut 2023.)

3.4.2 Antioksidantit

Mikrolevien ja syanobakteerien tuottamat antioksidantit voivat myös toimia kasvien kasvua edistäviä tekijöinä. Antioksidantteina toimivia yhdisteitä ovat esimerkiksi karotenoidit, C- ja E-vitamiinit, fenolit sekä klorofyllit. (Kapoore ja muut 2021.)

Tyypillisimpiä mikrolevistä löydettäviä karotenoideja ovat esimerkiksi *Dunaliella salina*- ja *Chlorella vulgaris* -lajeissa esiintyvät alfa- ja beetakaroteenit sekä fukoksantiini, jota esiintyy esimerkiksi *Phaeodactylum tricornutum*- ja *Isochrysis cabana* -lajeissa. Karotenoideilla on tärkeä rooli esimerkiksi fotosynteesissä sekä valolta suojautumisessa. Lisäksi ne toimivat esiasteina eräille kasvien signalointihormoneille, kuten ABA:lle sekä strigolaktonille. Ne osallistuvat myös muun muassa hedelmien, kukkien sekä siementen värin muodostamiseen. (Parmar ja muut 2023.)

3.4.3 Fenoliset yhdisteet

Fenolisilla yhdisteillä on tärkeä rooli kasvin puolustuksessa sekä stressisignaloinnissa, ja ne osallistuvat suojaukseen niin abioottista kuin bioottista stressiä vastaan. Niillä on myös kyky edistää kasvin ravinteidenottoa muun muassa mobilisoimalla ravinteita, kuten rautaa, kalsiumia ja sinkkiä sekä kelatoimalla ioneja. Fenolisilla yhdisteillä, kuten flavonoideilla ja fenolihapoilla, on myös kyky toimia suojana UV-B säteilyä vastaan. (Parmar ja muut 2023.)

3.4.4 C-fykosyaniini

C-fykosyaniini (engl. *C-phycocyanin*, CPC) on pääosin syanobakteereissa esiintyvä vesiliukoinen fykobiliproteiini, joka osallistuu valon kaappaamiseen fotosynteesissä. Sitä esiintyy merkittäviä määriä muun muassa syanobakteereissa *Arthrospira platensis*, *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5, *Nostoc* spp., *Phormidium* spp. ja *Synechocystis* spp. (Parmar ja muut 2023.)

CPC:tä tuotetaan kaupallisesti *Arthrospira plantensis* -syanobakteerissa elintarviketuotteisiin, mutta viime aikoina myös sen biostimulanttisista vaikutuksista on raportoitu. CPC:n on huomattu esimerkiksi parantavan itämistä sekä verson pituutta, kun sillä on käsitelty tomaatin siemeniä. (Parmar ja muut 2023.) Lisäksi vertikaalisen hydroponisen salaatinkasvatuksen yhteydessä se on lisännyt salaatin biomassaa, lehden halkaisijan pituutta sekä kasvin kypsymisnopeutta. Sen on havaittu lisäävän myös kasville suotuisaa mikrobiympäristöä. (Varia ja muut 2022.)

Voidaan siis huomata, että mikrolevistä ja syanobakteereista on löydetty useita erilaisia potentiaalisia biostimulanttisesti aktiivisia yhdisteitä. Osaa yhdisteistä ja niiden vaikuttavia mekanismeja on tutkittu enemmän kuin toisia ja useiden yhdisteiden vaikutustapoja ei tunneta

vielä varmasti. Monet tutkimukset kuitenkin osoittavat, että mikrolevien ja syanobakteerien sekä niistä saatavien yhdisteiden potentiaali toimia kasvien tehokkaampaa viljelyä edistävinä yhdisteinä on merkittävä ja tutkimusta on syytä jatkaa.

4. Valmiit biostimulantit

Mikroleviä ja syanobakteereita voidaan hyödyntää biostimulantteina useissa eri muodoissa. Kun organismeja on saatu kasvatettua tarpeeksi, voidaan ne prosessoida esimerkiksi kuivaksi biomassaksi, jalostaa solu-utteiksi tai kasvatukset voidaan hyödyntää elävinä. (González-Pérez ja muut 2021.) Lisäksi mikrolevistä saatavia erilaisia uutteita, kuten polysakkaridiuutteita ja proteiinihydrolysaatteja, voidaan hyödyntää biostimulantteina.

Tällä hetkellä mikroleväbiostimulanttien tuotannon alavirtaprosessi toimii merkittävimpana esteenä laajamittaiselle tuotannolle. Uuttamis- ja puhdistusprosessit pitää tehdä varoen, etteivät tavoiteltavat yhdisteet menetä tehoaan. Tällä hetkellä tämä on yleisesti tuotannon kallein vaihe ja vaatii kehitystä. (Sanchez-Quintero ja muut 2023.)

Prosessoidessa mikroleviä ja syanobakteereita valmiiksi biostimulanteiksi on otettava huomioon useita eri asioita. On esimerkiksi havaittu, että mikrolevien ja syanobakteerien soluseinä saattaa häiritä uuttamisprosessia. Sen heikentämisen onkin todettu parantavan uuttamisesta saatavaa saantoa huomattavasti. Soluseinän hajottamiseen voidaan käyttää esimerkiksi sonikointia, jauhamista tai korkeapainehomogenisointia. Metodien valitsemiseen vaikuttaa se, mitä yhdisteitä soluista halutaan eristää. (Sanchez-Quintero ja muut 2023.)

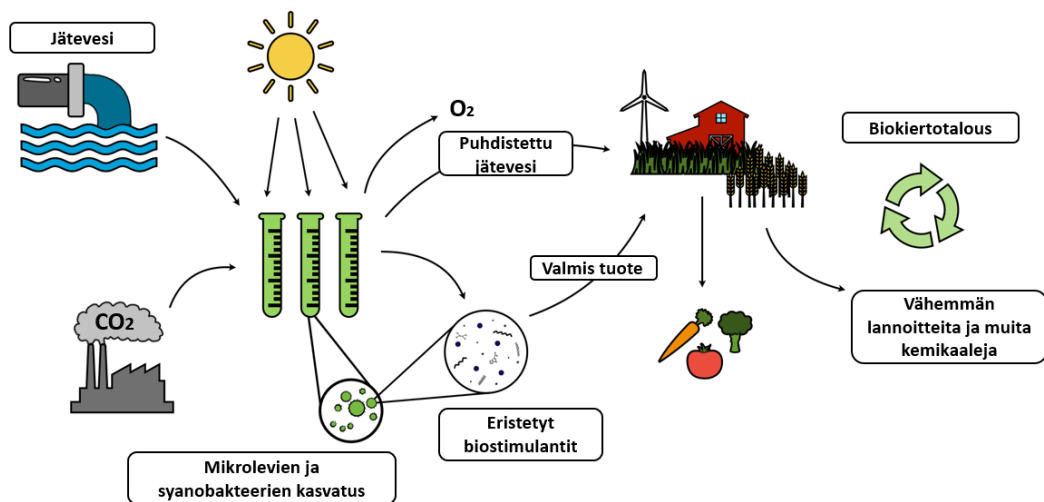
Soluseinän heikentämisen jälkeen siirrytään uuttamisvaiheeseen, jossa voidaan myös hyödyntää useita eri tekniikoita. Uutto voidaan suorittaa hajotettujen solujen lisäksi joissakin tapauksissa myös kokonaisille soluille. Uuttotekniikkojen kohdalla esimerkiksi polyetyleeniglykolin käyttöä on tutkittu paljon, sillä biohajoavana yhdisteenä se on ympäristön kannalta parempi vaihtoehto perinteisiin orgaanisiin liuottimiin verrattuna. Myös superkriittisen nesteuuton hyödyntämistä on tutkittu esimerkiksi monityydyttymättömien rasvahappojen, vitamiinien ja pigmenttien eristämisessä. Muita eristysmenetelmiä ovat muun muassa uutto etanolilla, orgaanisilla liuottimilla tai hyödyntämällä entsyymaattista hydrolyysiä. (Sanchez-Quintero ja muut 2023.)

Uuttomenetelmän valitseminen riippuu eristettävästä yhdisteestä. Esimerkiksi lipidien eristämisessä on hyödynnetty ultrasonista uuttoa, superkriittistä hiilidioksidia, elektroporaatiota ja mikroaaltoavusteista uuttoa. Proteiinien uutossa superkriittinen CO₂-uutto on todettu toimivaksi ja hyväksi vaihtoehdoksi orgaanisille liuottimille. Polysakkaridien erottaminen on ollut yleisesti haastavaa ja eniten tutkimusta onkin tehty eksopolysakkaridien kanssa, sillä niiden uuttaminen on helpompaa. EPS:ien erotukseen on hyödynnetty muun muassa alkoholilla saostamista sekä tangentiaalista mikro-suodatusta. Kaikissa tutkimuksissa uuttoa ei olla

kuitenkaan menetelmänä käytetty, vaan biostimulantit on voitu antaa kasveille suoraan solujen hajotuksen ja laimentamisen jälkeen. (Sanchez-Quintero ja muut 2023.)

Jotta valmis biostimulantti pysyisi hyvänä ja toimintakykyisenä, on kiinnitettävä huomiota muun muassa säilytyslämpötilaan sekä säilytyksen keston. Näiden tekijöiden on huomattu vaikuttavan tuotteen säilyvyyteen esimerkiksi *Chlorella vulgaris* -mikrolevän tapauksessa. Jos mahdollista, biomassassa kannattaa kuivata tuotteen säilymisen parantamiseksi esimerkiksi pakastekuivaamalla. Tämä ei metodina vahingoita organismien biostimulanttisia molekyylejä toisin kuin esimerkiksi aurinkokuivaus, joka saattaa pilata tuotteen. Kuivauksen on myös havaittu johtavan parempaan uuttosaantoon, jos se tehdään ennen uuttamisprosessia. (Sanchez-Quintero ja muut 2023.)

Yksi mikrolevien suurista eduista on se, että niitä voidaan kasvattaa jätevedessä, jossa ne voivat hyödyntää tästä saatavia ravinteita samalla puhdistuen vettä. Tämä luo erinomaisen mahdollisuuden yhdistää mikrolevien tuotanto jätevedenpuhdistukseen tai biojalostustoimintaan (ks. kuva 3). Näin mikrolevien tuotantokustannuksia saataisiin mahdollisesti alennettua kannattavalle tasolle ja samalla tuotanto edistäisi kiertotaloutta. (González-Pérez ja muut 2021.)



Kuva 3. Mahdollinen biokierrotalousmalli mikrolevien ja syanobakteerien kasvatukseen jätevedessä ja niistä saatavien biostimulanttien tuottoon: Mikroleviä ja syanobakteereita kasvatetaan teollisuuden sivuvirtana syntyvässä jätevedessä. Samalla ne puhdistavat vettä ja hyödyntävät siitä saatavia ravinteita. Puhdistettu vesi voidaan käyttää esimerkiksi kasteluun maanviljelyksessä. Kasvaessaan organismit sitovat itseensä teollisuuden päästöinä vapautunutta hiilidioksidia. Kasvatettavat mikrolevät saavat energiaa fotosynteesiin auringon valosta ja tuottavat samalla happea. Valmiista kasvatuksesta eristetään biostimulantteja, joita käytetään kasvien kasvun ja kestävyuden parantamiseen maanviljelyksessä. Biostimulanttien hyödyntäminen vähentää maanviljelyssä käytettävien lannoitteiden ja muiden mahdollisesti ympäristöä kuormittavien kemikaalien käyttöä.

Eräs toinen mikrolevien merkittävä etu on se, että ne pystyvät kasvamaan eksponentiaalisesti, ja näin ollen ne kykenevät saavuttamaan suuremman biomassantuottavuuden pinta-alaa kohti maakasveihin verrattuna. Lisäksi monet mikrolevät ja syanobakteerit kasvavat suolaisessa vedessä, joten niiden tapauksessa teollinen kasvatus ei välttämättä kuluttaisi rajoitettuja

makeanveden varoja. Tällä hetkellä mikroleväkasvatuksessa saadun biomassan kerääminen sekä alavirtaprosessit vievät kuitenkin enemmän energiaa kuin perinteisten viljelysten korjuu- ja jatkokäsittelytekniikat. (Thoré ja muut 2023.)

Vaikka mikrolevien ja syanobakteerien biostimulanttisia vaikutuksia on tutkittu viimevuosina suhteellisen paljon, ei kaupallisia tuotteita ole vielä juurikaan saatavilla. Toisin on kuitenkin esimerkiksi makrolevistä valmistettujen biostimulanttien kohdalla, joiden teho on todistettu niin tutkimuksissa kuin kaupallisissa kokeissa (Santini ja muut 2021). On kuitenkin hyvin mahdollista, että mikroleväpohjaisen biostimulanttituotannon kehittyessä ja tullessa kaupallisesti kannattavammaksi, myös mikrolevistä johdettujen biostimulanttien markkina kasvaa.

5. Käsittelytekniikat

Kasveille voidaan tehdä biostimulanttikäsittelyjä useilla eri tavoilla. Näitä ovat esimerkiksi siementen käsittely ennen kasvatusta, lehtien ruiskutus tai juurien ja maaperän kastelu. (Parmar ja muut 2023.)

Käsittelytekniikka on valittava tapauskohtaisesti, sillä eri tekniikat voivat vaikuttaa siihen, kuinka hyvin biostimulantti vaikuttaa kasviin. Esimerkiksi kun Puglisi työryhmineen (2022) käsitteli salaatin taimia *Chlorella vulgaris* -uutteella joko lehtiä ruiskuttamalla tai juuria kastelemalla, saatiin eri tuloksia, vaikka uute oli sama. Esimerkiksi taimien totaaliproteiinipitoisuudet kasvoivat enemmän, kun niitä käsiteltiin lehtiruiskutuksella, mutta juurten kastelu kasvatti enemmän juurten tuorepainoa.

Oikean käsittelytekniikan valinnan lisäksi myös käsittelyajankohtaan on kiinnitettävä huomiota, sillä myös oikealla ajoituksella voidaan vaikuttaa siihen, kuinka hyvä vaste biostimulantista saadaan. Tämänhetkisten arvioiden mukaan vaikuttaa siltä, että laajan mittakaavan sekä kaupalliseen biostimulanttien käyttöön parhaimmat vaihtoehdot ovat lehtien ruiskuttaminen ja juurien kastelu. (Parmar ja muut 2023.)

5.1 Siementen käsittely

Siementen käsittely biostimulanteilla on käsittelytekniikka, joka suoritetaan ennen siementen kylvämistä. Yleensä siementen käsittely suoritetaan joko siementen pohjustuskäsittelyllä (engl. *seed priming*), siementen liuotuskäsittelyllä (engl. *seed dipping*) tai siementen ravinnepeittauksella (engl. *seed coating*). Siementen pohjustuskäsittely suoritetaan kontrolloidusti niin, että siemen ei ala käsittelyn aikana vielä itämäänsä. Pohjustuksen on tutkittu muun muassa tehostavan siementen itämistä sekä juurten muodostumista. (Parmar ja muut 2023.) Siementen ravinnepeittauksessa siemenet peitataan tai sumutetaan tasaisesti jollakin biostimulantilla, kun taas siementen liuotuskäsittelyssä siemeniä liuotetaan 18–24 tuntia biostimulanttiliuoksessa ennen kuin ne kylvetään. (Parmar ja muut 2023; Rocha ja muut 2019.)

Kaikkien edellä mainittujen metodien etuna on se, että ne mahdollistavat siemenen aikaisemman itämisen ja näin ollen parantavat itämisindeksiä, verson pituutta, taimien elinvoimaisuutta sekä myös vähentävät siemenen pinnan haitallista mikroflooraa (Parmar ja muut 2023). Siementen käsittely mahdollistaa myös vesiliukoisten molekyylien paremman imeytymisen ja pehmentää siemenen ulkokuorta. Lisäksi käsiteltyjen siementen liukoisten proteiinien, hiilihydraattien ja vapaiden aminohappojen pitoisuudet on havaittu kontrolliryhmiä suuremmiksi. (Supraja ja muut 2020.)

Siementen käsittely niin mikrolevistä saatavien uutteen, kuin eläviä soluja sisältävien liuosten avulla on havaittu edistävän viljojen ja kasvien kasvua (Parmar ja muut 2023). Esimerkiksi tomaatin siementen käsitteleminen *Acutodesmus* sp. -uutteilla on havaittu aikaistavan siementen itämistä kaksi päivää käsittelemättömiin siemeniin verrattuna (Garcia-Gonzalez ja Sommerfeld 2016). Myös eläviä syanobakteereja, kuten *Calothrix elenkinii* ja *Anabaena laxa*, sisältävillä liuksilla tehdyt käsittelyt muun muassa eri maustekasvien siemenille ovat tuottaneet positiivisia tuloksia (Parmar ja muut 2023).

5.2 Lehtien ruiskutus

Biostimulantteja voidaan antaa kasveille myös lehtiruiskutuksen välityksellä. Tämä metodi mahdollistaa yhdisteiden imeytymisen kasviin lehden pinnan ja lehden ilmarakojen kautta. Ruiskutus on hyödyllinen tekniikka levittää vaikuttavia yhdisteitä, sillä maaperän rakenteen fysikaaliskemialliset ominaisuudet saattavat joissakin tapauksissa hankaloittaa biostimulanttien kulkeutumista kasviin. Menetelmä on tehokkaimmillaan päiväsaikaan, kun auringonvalo on mahdollisimman paljon saatavilla ja kutikulan huokoset sekä ilmarat ovat avonaisimmillaan ja ne kykenevät ottamaan yhdisteitä mahdollisimman tehokkaasti kasvin sisään. (Supraja ja muut 2020.) Biostimulanttien levittäminen lehdille on havaittu tehostavan ilmarakojen toimintaa sekä kasvin vedenhyödyntämiskykyä (Parmar ja muut 2023).

Lehtien ruiskutus on satojen tuottavuuden edistämisen yhteydessä yleisesti käytetty menetelmä, sillä sen avulla saatava vaste on nopeampi muihin käsittelytekniikoihin verrattuna. Mekanismit, jolla biostimulantit vaikuttavat lehtiruiskutuksen kautta ei vielä täysin ymmärretä, mutta kulkeutumista esimerkiksi juuri ilmarakojen ja kutikulan huokosten kautta pidetään mahdollisena. (Parmar ja muut 2023.)

Eräässä tutkimuksessa *Arthrospira plantensis* -syanobakteerista eristetyn totaalipolysakkaridiuutteen levittäminen tomaatille (*Solanum lycopersicum*) sekä paprikalle (*Capsicum annuum*) lehtiruiskutuksen avulla edisti kasvin koon kasvua 20–30 % kontrolliryhmään verrattuna. Paprikan lehtien pinta-ala kasvoi 57 % kun taas tomaatin lehtien pinta-ala kasvoi 100 %. Lehtien määrä kasvoi paprikalla 33 % ja tomaatilla 50 %. (EL Arroussi ja muut 2016.) Myös muista lajeista, kuten *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* spp., *Anabaena* spp., *Dunaliella salina* sekä *Anabaena* spp., saatavilla solu-uutteilla on saatu viljelysten kasvua

edistäviä tuloksia. Näitä olivat esimerkiksi kukkien määrän lisääntyminen, kukkimisajankohdan aikaistuminen sekä kasvin kasvun ja juuripainon parantuminen. (Parmar ja muut 2023.)

Biostimulanttien imeytymistehokkuuteen lehtiruiskutuksen avulla vaikuttavat muun muassa suihkutuettavan nesteen koostumus sekä sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, kuten nesteen pintajännitys, pH ja se kuinka pitkään neste pysyy lehden pinnalla. Myös biostimulanttien molekyylikoko, liukoisuus sekä varaus vaikuttavat imeytymiseen. Yleensä ruiskutus suoritetaan joko kastelujärjestelmän kautta lisäämällä biostimulantti kasteluveteen tai lehtien sumutuksen (engl. *aerial spray*) avulla. (Parmar ja muut 2023.)

5.3 Juurien ja maaperän kastelu

Biostimulantteja voidaan antaa kasveille, myös juurien sekä maaperän kastelun välityksellä (engl. *root and soil drenching*). Juuret toimivat kasvin ja maaperän välisenä rajapintana. Ne ylläpitävät kasvin kasvua muun muassa mobilisoimalla maaperän ravinteita, osallistumalla puolustukseen sekä välittämällä tietoa ulkoisista ärsykkeistä. Juurten ja maaperän hyvä kunto on olennainen edellytys kasvien tehokkaalle kasvulle. (Parmar ja muut 2023.)

Juurien ja maaperän kastelu on tekniikkana muita hieman hitaampi, sillä vaikuttavien yhdisteiden on imeytyttävä ensin juurien kautta kasviin ja kulkeuduttava tämän eri osiin. Positiivisia tuloksia on kuitenkin havaittu. Esimerkiksi *A. platensis* -syanobakteerin antaminen chiasalvialle (*Salvia hispanica*) maaperän kastelun välityksellä paransi eräessä tutkimuksessa kasvien siementen määrää 124 % ja niistä saatavaa öljysaantoa 263 %. Maaperän kastelu lisäsi myös maaperän mikrobien aktiivisuutta sekä alensi maaperän pH:ta. (Youssef ja muut 2022.)

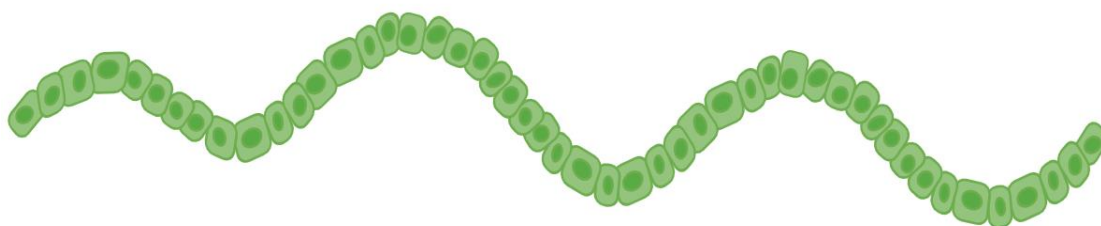
Myös juuria kastelemalla on saatu positiivisia tuloksia. Esimerkiksi eräessä tutkimuksessa *Chlorella vulgaris* -uutteella käsiteltyjen salaattintaimien tuorepaino kasvoi keskimäärin 30 % ja juurien pituus noin 24 %. Salaatin kuivapainoon käsittely ei juuri vaikuttanut. Myös proteiinipitoisuus, entsyymiaktiivisuus ja taimen pituus kasvoivat kontrolliryhmään verrattuna. (Puglisi ja muut 2022.)

6. Tarkastelussa *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis on filamenttinen syanobakteeri, joka viihtyy lämpimissä ja emäksisissä vesistöissä. Bakteeriyksilöt muodostavat yhdyskuntia, joiden rakennetta on havainnollistettu kuvassa 4. *A. plantensis* tunnetaan kaupallisesti paremmin nimellä Spirulina. Sitä käytetään ravintolisänä, sillä se sisältää muun muassa laajan kirjon antioksidanteja sekä vitamiineja, runsaasti proteiinia (noin 62 %) ja rasvahappoja. Lisäksi se on yksi parhaimmista luonnollisista B₁₂-vitamiinin lähteistä. (Siringi ja muut 2022.) *A. plantensis* on yksi maailman kasvatetuimmista mikrolevistä (González-Pérez ja muut 2021). Syanobakteerin ravinto-ominaisuuksien lisäksi sen käyttöä biostimulanttina on tutkittu lupaavin tuloksin (EL Arroussi 2016; Villaró ja muut 2023).

Arthrospira platensis -syanobakteerista eristettyjen polysakkaridien on havaittu toimivan tehokkaina biostimulantteina kasvattaen tomaatin ja paprikan lehtien määrää sekä kokoa (EL Arroussi 2016). Lisäksi siitä eristettyjen, muun muassa rasvahappoja sisältävien uutteen, on havaittu edistävän esimerkiksi vehnän ja rypsin kasvua sekä vähentävän kasvien patogeeneiden kehitystä (Dmytryk ja muut 2022). Useista eri tutkimuksista saatujen positiivisten tulosten perusteella voidaan olettaa, että *A. platensis* -lajista saatavien yhdisteiden antaminen kasveille todella parantaa kasvien kasvua.

Koska *A. platensis* -syanobakteeria tuotetaan jo kaupallisesti suuremmalla mittakaavalla, olisi sen laajempi tuotanto myös biostimulanttien tapauksessa todennäköisesti helpommin lähestyttävissä. Kasvatusolosuhteet biostimulanttien tuotannossa saattavat kuitenkin olla erilaiset verrattuna elintarvikkeena käytettävään syanobakteeriin. Näin ollen ei voida olettaa, että ravinnoksi käytettävää kasvatusta voitaisiin hyödyntää suoraan myös biostimulanttituotannossa. Lajin kasvatuksesta kertyneen tutkimustiedon ja kokemuksen luulisi kuitenkin helpottavan laajempaan tuotantomittakaavaan siirtymistä myös biostimulanttituotannon puolella.



Kuva 4. Havainnekuva *Arthrospira platensis* -syanobakteerin rakenteesta. Yksittäiset syanobakteerit muodostavat yhdessä pitkäläisen ja mutkittelevan yhdyskunnan. Kuva on tehty BioRender-ohjelmalla.

7. Yhteenveto

Mikrolevien ja syanobakteerien tutkimus biostimulanttien valmistamiseksi on lisääntynyt runsaasti viime vuosina ja monista eri mikrolevä- sekä syanobakteerilajeista johdetuilla biostimulanteilla on ollut positiivista vaikutuksia kasvien kasvuun ja kestävyteen. Näiden fotosynteettisten mikro-organismien kyky kasvaa erilaisissa olosuhteissa, sitoa hiilidioksidia ilmakehästä ja esimerkiksi puhdistaa jätevettä, kasvattaa niiden potentiaalia toimia osana kestävästä maanviljelyä. (Parmar ja muut 2023.)

Monia mikrolevä- ja syanobakteerilajeja on vielä tutkimatta ja tunnettujenkin lajien biostimulantteina toimivat aktiiviset yhdisteet, sekä näiden vaikutusmekanismit ovat monilta osin vielä arvailujen varassa. Lisätutkimukset ovat siis välttämättömiä. Tähän mennessä tehdyt tutkimukset mikrolevien biostimulanttisista vaikutuksista ovat kuitenkin osoittaneet useita positiivisia tuloksia ja näin ollen voidaan pitää todennäköisenä, että niitä soveltamalla

maanviljelyä voitaisiin kehittää tehokkaammaksi ja pyrkiä vastaamaan kasvavaan ravinnontarpeeseen ympäristöystävällisillä keinoilla.

Mikroleväbiostimulanttien kehitystä edistää myös kansainvälisen tason kiinnostus ja tuki levätutkimusta kohtaan. Esimerkiksi Euroopan komissio on laatinut aloitteen, jonka tarkoituksena on lisätä levätutkimusta ja niiden sovelluksia. Aloite pyrkii tutkimuksen tukemisen lisäksi muun muassa kartoittamaan markkinoita edistääkseen siirtymistä tutkimuksesta kaupallisiin tuotteisiin ja luomaan standardeja turvallisten levätuotteiden kehittämiseksi. Myös yleistä tietoisuutta levistä pyritään kasvattamaan kuluttajamarkkinoiden parantamiseksi. Aloitteen kokonaisvaltaisena tavoitteena on edistää leväsovellusten kautta ihmisten terveellisempää ravitsemusta sekä kansainvälisiä ilmasto- ja ympäristötavoitteita. (ec.europa.eu, 2022.)

Biostimulanttien tuotanto mikrolevien ja syanobakteerien avulla edistää biotaloutta ja se voidaan myös rakentaa osaksi kiertotaloutta. Tämä saattaa olla jopa välttämättömyys kannattavan mikrolevätuotannon kannalta, jotta tuotantokustannuksia saadaan alennettua. Tämänhetkisten tutkimusten valossa voidaan olettaa, että jos mikroleväbiostimulanttien kehitykseen panostetaan ja niiden tuotanto saadaan taloudellisesti kannattavaksi, voivat ne olla merkittävä tekijä siirtymässä kohti ympäristöystävällisempää ja tehokkaampaa maanviljelyä.

Lähteet:

- Dmytryk, A., Samoraj, M., Moustakas, K., Witek-Krowiak, A. & Chojnacka, K. (2022) Bioactive fatty acids and compounds from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*: Potential as biostimulants for plant growth. *Sustain Chem Pharm* **30**:100899.
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katsеров, D., Patyukov, N. & Sukhikh, S. (2020) Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* **10**:1153.
- du Jardin, P. (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci Hort* **196**:3–14.
- EL Arroussi, H. (2016) Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. *J Algal Biomass Util* **7**: 55-63.
- Ec.europa.eu. (2022) Commission proposes action to fully harness the potential of algae in Europe for healthier diets, lower CO2 emissions, and addressing water pollution. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_22_6899 (Luettu 5.2.2024).
- Garcia-Gonzalez, J. & Sommerfeld, M. (2016) Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J Appl Phycol* **28**:1051–1061.
- González-Pérez, B. K., Rivas-Castillo, A. M., Valdez-Calderón, A. & Gayosso-Morales, M. A. (2021) Microalgae as biostimulants: A new approach in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* **38**:4.
- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F. & Yan, Y. (2018) Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. *Fermentation* **4**:25.
- Hopes, A. & Mock, T. (2015) Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems. DOI: 10.1002/9780470015902.a0023744
- Hussain, A., Shah, S. T., Rahman, H., Irshad, M. & Iqbal, A. (2015) Effect of IAA on in vitro growth and colonization of *Nostoc* in plant roots. *Front Plant Sci* **6**.
- Kapooore, R. V., Wood, E. E. & Llewellyn, C. A. (2021) Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnol Adv* **49**:107754.

- Lu, Y. & Xu, J. (2015) Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends Plant Sci* **20**:273–282.
- Mahapatra, D. M., Satapathy, K. C. & Panda, B. (2022) Biofertilizers and nanofertilizers for sustainable agriculture: Phycopropects and challenges. *Sci Total Environ* **803**:149990.
- Mógor, Á. F., Amatucci, J. de O., Mógor, G. & Lara, G. B. de (2018) Bioactivity of Cyanobacterial Biomass Related to Amino Acids Induces Growth and Metabolic Changes on Seedlings and Yield Gains of Organic Red Beet. *Am J Plant Sci* **9**:966–978.
- Moreira, J. B., Vaz, B. da S., Cardias, B. B., Cruz, C. G., Almeida, A. C. A. de, Costa, J. A. V. & Morais, M. G. de (2022) Microalgae Polysaccharides: An Alternative Source for Food Production and Sustainable Agriculture. *Polysaccharides* **3**:441–457.
- Parmar, P., Kumar, R., Neha, Y. & Srivatsan, V. (2023) Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions. *Front Plant Sci* **14**:1073546.
- Puglisi, I., La Bella, E., Rovetto, E. I., Stevanato, P., Fascella, G. & Baglieri, A. (2022) Morpho-biometric and biochemical responses in lettuce seedlings treated by different application methods of *Chlorella vulgaris* extract: Foliar spray or root drench? *J Appl Phycol* **34**:889–901.
- Rocha, I., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Vosátka, M., Freitas, H. & Oliveira, R. S. (2019) Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. *Front Plant Sci* **10**.
- Romanenko, K. O., Kosakovskaya, I. V. & Romanenko, P. O. (2016) Phytohormones of Microalgae: Biological Role and Involvement in the Regulation of Physiological Processes. *Int J Algae* **18**.
- Sanchez-Quintero, A., Fernandes, S. C. M. & Beigbeder, J.-B. (2023) Overview of microalgae and cyanobacteria-based biostimulants produced from wastewater and CO₂ streams towards sustainable agriculture: A review. *Microbiol Res* **277**:127505.
- Santini, G., Biondi, N., Rodolfi, L. & Tredici, M. (2021) Plant Biostimulants from Cyanobacteria: An Emerging Strategy to Improve Yields and Sustainability in Agriculture. *Plants* **10**:643.

- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A. & Estelle, M. (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* **5**:301–307.
- Santoro, D. F., Puglisi, I., Sicilia, A., Baglieri, A., La Bella, E. & Lo Piero, A. R. (2023) Transcriptomic profile of lettuce seedlings (*Lactuca sativa*) response to microalgae extracts used as biostimulant agents. *AoB PLANTS* **15**.
- Siringi, J.O., Turoop, L. & Njonge, F. (2022) Biostimulant Effect of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) On Lettuce (*Lactuca sativa*) Cultivated Under Aquaponic System. *SCIREA J Biol.* **7**.
- Supraja, K. V., Behera, B. & Balasubramanian, P. (2020) Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Ind Crops Prod* **151**:112453.
- Thoré, E. S. J., Muylaert, K., Bertram, M. G. & Brodin, T. (2023) Microalgae. *Curr Biol* **33**:91–95.
- Varia, J., Kamaleson, C. & Lerer, L. (2022) Biostimulation with phycocyanin-rich *Spirulina* extract in hydroponic vertical farming. *Sci Hortic* **299**:111042.
- Villaró, S., Acién, G., Alarcón, J., Ruiz, Á., Rodríguez-Chikri, L., Viviano, E. & Lafarga, T. (2023) A zero-waste approach for the production and use of *Arthrospira platensis* as a protein source in foods and as a plant biostimulant in agriculture. *J Appl Phycol* **35**:2619–2630.
- Wu, G., Fanzo, J., Miller, D. D., Pingali, P., Post, M., Steiner, J. L. & Thalacker-Mercer, A. E. (2014) Production and supply of high-quality food protein for human consumption: Sustainability, challenges, and innovations. *Ann N Y Acad Sci* **1321**:1–19.
- Youssef, S. M., El-Serafy, R. S., Ghanem, K. Z., Elhakem, A. & Abdel Aal, A. A. (2022) Foliar Spray or Soil Drench: Microalgae Application Impacts on Soil Microbiology, Morpho-Physiological and Biochemical Responses, Oil and Fatty Acid Profiles of Chia Plants under Alkaline Stress. *Biology* **11**:1844.