

37. OTDK Biológia Szekció

Mikroalgák és cianobaktériumok vizsgálata egy kompakt hiperspektrális fenotipizáló állomás segítségével

Készítette:

Tóth-Nyári Zalán

Biológus MSc szak, II. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Szabó Milán

Tudományos főmunkatárs

Dr. Vass Imre

Tudományos tanácsadó

Belső konzulens:

Dr. Bodor Attila

tudományos munkatárs

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Intézet

Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növényi Stressz, Lipid, és Fenomika Kutatócsoport

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

1.) Rövidítések jegyzéke	3
2.) Irodalmi áttekintés	4
2.1 A választott modellorganizmusok bemutatása.....	4
2.2 A modellorganizmusok fotoszintetikus pigmentjei	5
2.3 Fontosabb fénytani faktorok a diagnosztikában	6
2.4 A spektrofotometria szerepe mikroalgák vizsgálatában	7
2.5 Hiperspektrális rendszerek a növényvizsgálatban	7
2.6 A Nitrát éheztetés hatásai a <i>Synechocystis</i> cianobaktériumban	9
2.7 Asztaxantin felhalmozás a <i>Haematococcus pluvialis</i> mikroalgában.....	10
3.) Célkitűzések.....	11
4.) Anyagok és módszerek	12
4.1 Modellorganizmusok és tenyésztési körülmények	12
4.2 Módszerek.....	13
5.) Eredmények	18
6.) Diskusszió	28
7.) Összegzés.....	31
8.) Köszönetnyilvánítás	32
9.) Irodalomjegyzék	33
10.) Függelék.....	36

1.) RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA – Analysis of Variance, variancia-analízis

AOI – Area of Interest, kiértékelési terület

Chla – klorofill *a*

Chlb – klorofill *b*

C.s. – *Chlorella sorokiniana*

DMSO – dimetil-szulfoxid

H.p. – *Haematococcus pluvialis*

Phycoc. – fikocianin

nm – nanométer

N(-) – Nitrát hiányos minta

OD – optikai denzitás

Q_y max – A klorofill *a* maximális fényelnyelése a vörös hullámhossz tartományban

S.sp. – *Synechocystis sp. PCC6803*

.

2.) IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A választott modellorganizmusok bemutatása

A *Chlorella sorokiniana* egyike a legismertebb egysejtű zöldalga fajoknak, és több mint egy évszázados kutatási múlttal rendelkezik. A faj központi szerepet játszott a növényi fotoszintézis, és anyagcserefolyamatok tanulmányozásában (Bonner és mtsai., 1995; Nickelsen, 2017; Tate és mtsai., 2013). A laboratóriumi felhasználás mellett azonban a biotechnológiai hasznosítás területén is sokat tanulmányozott, melyet indokol, hogy jó természetes fehérjeforrás (Hase és mtsai., 1957; Kose és mtsai., 2017), továbbá lipidfelhalmozási képessége miatt bioüzemanyagok termelésével kapcsolatban is ígéretesnek találták (Bharti és mtsai., 2018).

A *Synechocystis* sp. típusfaj PCC6803 jelzésű genetikai vonala a legtöbbet kutatott a cianobaktériumok közül, melynek genomja összességében harmadikként, a fototróf életformák közt pedig elsőként került feltérképezésre. Könnyű transzformálhatósága mellett (Trautmann és mtsai., 2012) biotechnológiai hasznosítása is népszerű modellorganizmussá teszi, kiemelten a bioüzemanyag előállítás (Liu és mtsai., 2012; Neag és mtsai., 2019; Schirmer és mtsai., 2010) és környezeti biotechnológiai hasznosítás (Pembroke és mtsai., 2015; Wu és mtsai., 2023) területein.

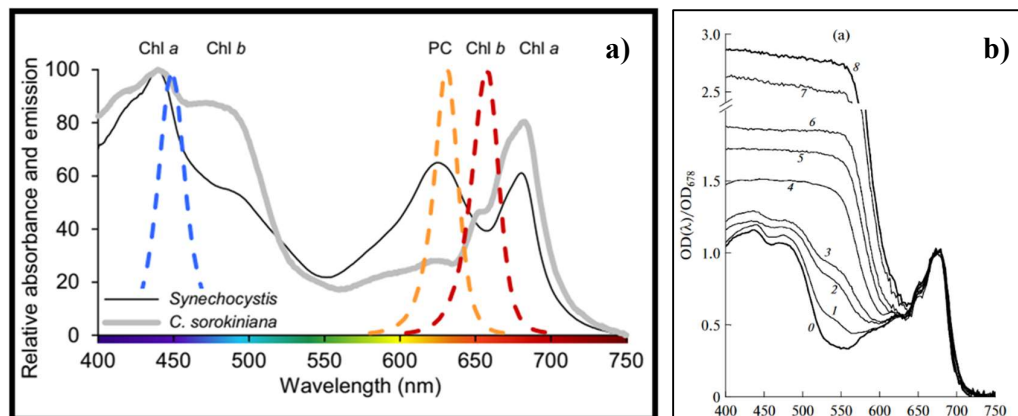
A *Haematococcus pluvialis* biotechnológiai szempontból kiemelt fontosságú mikroalga faj, mely az élővilágban páratlan hatékonysággal képes az asztaxantin felhalmozására. Az asztaxantin antioxidáns hatású, karotinoid molekula, mely nem csak a termelő organizmus fénystressz ellen való védekezésében, hanem a humán és állati antioxidáns védekezésben is fontos szerepet tölt be (Guerin és mtsai., 2003). A természetes módon, *Haematococcus pluvialis* segítségével megtermelt asztaxantin a jövőben alternatívát nyújthat a nagy keresettségű, jelenleg mesterségesen szintetizált asztaxantinnal szemben (Khoo és mtsai., 2019). A mikroalga a laboratóriumi szintű kutatásoknak is elterjedt modellorganizmusa, mivel segít feltárni a környezeti stresszhatásokra adott válaszmechanizmusokat, és az asztaxantin termelés optimalizálásának lehetőségeit (Le-Feuvre és mtsai., 2020).

2.2 A modellorganizmusok fotoszintetikus pigmentjei

A fototróf organizmusok energiaszerzésüket részben vagy egészben a fényenergia kémiai energiává történő átalakításával végzik a fotoszintézis során. A fényenergia begyűjtését és a fotokémiai reakciócentrumokhoz való továbbítását a fénybegyűjtő antennarendszerek végzik, melyek különböző pigmentek és fehérjék komplex rendszeréből épülnek fel. A pigmentek eltérő struktúrájuk miatt specifikus hullámhossztartományban nyelik el a beérkező fényt, melyek a hullámhossz skálán abszorpció sávok formájában jelennek meg.

A klorofill *a* a fotoszintézis központi fotoszintetikus pigmentje, amely minden fotoszintézisre képes szervezetben megtalálható. Ezért viszonyítási alapot ad olyan kísérleti objektumok összehasonlítására, melyeknek egyéb, járulékos pigmentjei eltérnek.

A *C. sorokiniana* kloroplasztisza klorofill *a* mellett klorofill *b*-t és többféle karotinoidot is tartalmaz, melyek elnyelési spektruma a 400-500 nanométeres hullámhossztartományban sokszorosan átfed egymással (1a ábra). A *Synechocystis* sejtek nem tartalmazzak klorofill *b*-t, azonban tartalmazzák a cianobaktériumokra jellemző fikobilinokat, fikoerithrint, és fikocianint, melyek a zöld és sárga hullámhossztartományokban való fény elnyelését teszik lehetővé számukra (1a ábra).



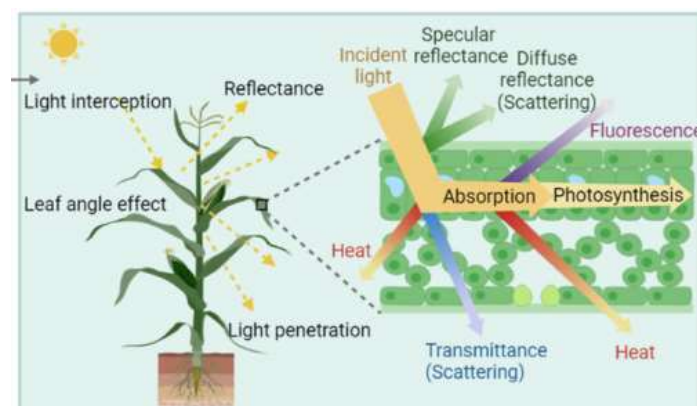
1. ábra: a *Synechocystis* sp. PCC 6803, illetve *Chlorella sorokiniana* modellfajok abszorbancia spektruma (a panel) (Luimstra és mtsai., 2018), és a *Haematococcus pluvialis* abszorbancia profilja (b panel) (Solovchenko és mtsai., 2011).

A *Haematococcus pluvialis* sejtjeiben meghatározó pigmentek a klorofill *a* és klorofill *b*, illetve az asztaxantin, mely a karotinoidokra jellemző 450-500 nanométeres hullámhossztartományban többnyire a kék és zöld fényt nyeli el (1b ábra). Az asztaxantin nagymértékű felhalmozódásával a sejtek spektrális profilja jelentős változáson esik át, mely tápanyagmegvonás, vagy erős fény hatására fokozott sebességgel végbemegy (Solovchenko és mtsai., 2011). A fent felsorolt pigmentek tulajdonságai lehetővé teszik, hogy a klorofill *a* mennyiségi meghatározásával az

egyes tiszta kultúrákat azonos koncentrációra állítsuk be, és ehhez viszonyítva a járulékos, fajra/csoportra jellemző pigmentek arányainak változását vizsgálhassuk.

2.3 Fontosabb spektrális tulajdonságok a diagnosztikában

A növényi sejtek fénytani vizsgálatához több spektrális tulajdonság is felhasználható, mivel a fotoszintetizáló szervezetekben a beeső fény különböző útvonalakon haladhat, és különféle módokon hasznosulhat (2. ábra). Ez az összetett folyamat lehetővé teszi a fény optikai tulajdonságainak részletes elemzését.



2. ábra: A beérkező fény különböző útvonalainak ábrázolása a növényi szövetben (Sun et al., 2022)

A sejt- és szövetfelszínre érő fény egy része visszaverődik, és ezt a visszavert fényt a reflektancia segítségével jellemezhetjük. A visszaverődés mértékét a felszín visszaverő képessége, azaz a reflektivitás (R) határozza meg, amely a beérkező sugárzás (I_0) és a visszavert sugárzás (I_r) hányadosaként számolható. A reflektancia hullámhosszfüggő, mivel minden felszín más mértékben veri vissza a fényt a különböző hullámhossztartományokban. A mérések során a vizsgálati objektumok reflektanciája relatív reflektancia (R_{rel}) formájában kerül meghatározásra (Kovar és mtsai., 2019).

A megvilágított sejtekbe érkező fény egy része elnyelődik, amit az abszorbancia mértékegysége jellemez, míg egy másik része áthalad a sejten, amit transzmittanciával írunk le. Az abszorbancia (A) mértékegysége fejezi ki, hogy az adott anyag milyen mértékben képes elnyelni a fényt egy adott hullámhosszon.

Az abszorbancia segítségével pontosan mérhető az anyagok fényelnyelő képessége a különböző hullámhosszakon. Ezzel szemben a transzmittancia (T) a fény azon hányadát jelöli, amely képes áthaladni az anyagon. A vizsgálati objektumok reflektancia, abszorbancia és transzmittancia tulajdonságai egymással összefüggő mértékegységekkel kifejezhetők (Swinehart, 1962).

2.4 A spektrofotometria szerepe mikroalgák vizsgálatában

A fotoszintézisre képes mikroorganizmusok pigmenttartalom és pigmentösszetétel meghatározásának egyszerű eszköze a spektrofotometriás mérés(Liu és mtsai., 2021). A különböző pigmentek mennyiségi meghatározásánál az algák szerves oldószeres kivonatát monokromatikus fénnel megvilágítva megkapjuk a minta specifikus hullámhosszon mért abszorpcióját. Ebből kiszámítható a térfogatra vonatkoztatott klorofill koncentrációja, azonban a használt egyenletek sok tényező mentén térhetnek el, például a használt oldószer szerint. Emellett élő sejteket tartalmazó minták abszorpciós vizsgálatával általában megállapítható azok sejtsűrűsége is.

2.5 Hiperspektrális rendszerek a növényi és mikroalga diagnosztikában

A hiperspektrális érzékelés az *in vivo* diagnosztika, és a távérzékelés területén rohamosan terjedő vizsgálati módszer, melyet a környezet- és agrártudományokban több évtizede széleskörben alkalmaznak (Zarco-Tejada és mtsai., 2004), a közelmúltban pedig megkezdődött a technológia térnyerése a laboratórium léptékű diagnosztika területén is. Interdiszciplináris tudományterület, melynek fókuszában a nem invazív képalkotás áll, gyakran nagy áteresztőképességű vizsgálati és adatfeldolgozó rendszerek használatával karöltve.

A hiperspektrális képalkotó rendszerek nem korlátozódnak a látható fény spektrumára, hanem az elektromágneses spektrum szélesebb tartományában készítenek képeket, ahol minden egyes pixelhez önálló spektrumot rendelnek. A képalkotás során alkalmazott szenzorok és szkennelési technikák rendkívül változatosak (Khan és mtsai., 2018).

A technológiát már az 1990-es években hatékony távérzékelési módszerként igazolták (Lee et al., 1994) és a 2000-es évektől a technológia alkalmazása elterjedtté vált mind szupraindividuális szerveződések (Dustan és mtsai., 2000) mind individuális fenotípusok (Schuerger et al., 2003) vizsgálata során.

A fejlett növények fenotipizálása egyre gyakrabban történik fenotipizáló állomások segítségével. Ezek az állomások lehetővé teszik a legtöbb fizikai paraméter pontos ellenőrzését, és szabályozását, emellett általában többféle, nem invazív diagnosztikai berendezéssel vannak ellátva. Ennek köszönhetően a vizsgálati objektumok fejlődése és fenotípusos jellegzetességei külső változóktól mentesen, standardizált módon vizsgálhatók.

A különböző állomások változatos felépítésűek, és sokféle érzékelési módot használhatnak, azonban a leggyakoribb a hiperspektrális rendszerek használata. Ezek felépítése nagyjából megegyező. Részeik a fényforrás, objektívlencsék, hiperspektrális szenzor, képalkotó spektrográf, és egy számítógép. A fény érkezik természetes napfényből, vagy mesterséges úton halogénlámpákból, illetve LED fényforrásokból. A vizsgálati objektum által visszavert sugárzás ezután begyűjtésre kerül a lencserendszer által, majd a spektrográf különböző hullámhossztartományokra bontja azt. Ezeket az adott hullámhosszakat alakítja elektromos jellé a hiperspektrális szenzor, és továbbítja adat formájában egy számítógépes rendszer felé (Liu és mtsai., 2020).

A zárt fenotipizáló állomások hasonló felépítése ellenére használatuk sok ponton eltérhet, mind modellorganizmusokban, az egyes komponensek típusában, a használt fizikai paraméterekben, vagy a kinyert adatok feldolgozásának, és kiértékelésének módjában. Ebből az okból a hiperspektrális képalkotó rendszerekből kinyert adatok értékelése, korrigálása és standardizálása egy újkeletű probléma, és nincsenek a felhasználók kezében olyan univerzálisan alkalmazott korrekciós módszerek, mint például a távoli érzékelés területén (Liu és mtsai., 2020; Mishra és mtsai., 2020)

A mikroalgák vizsgálata céljából a távoli érzékelés területén már több évtizede alkalmazott a hiperspektrális képalkotás, azonban eleinte ezek a vizsgálatok elsősorban környezettudományi és oceanográfiai irányultságúak voltak (Dustan és mtsai., 2000; Roelfsema és mtsai., 2002), az elmúlt években azonban több kutatás irányult a hiperspektrális képalkotás alkalmazására az ipari és laboratóriumi léptékű mikroalga monitorozásban és fenotipizálásban. A legfrissebb eredmények értelmében a képalkotási technológia pontos, gyors, skálázható, és kis járulékos költségű diagnosztikai eszközzé válhat ezeken a területeken (Morgado és mtsai., 2024; Plouviez és mtsai., 2024; Salmi és mtsai., 2021), azonban számos áthidalandó akadállyal is számolni kell, mint például a minta heterogenitás és a magas telepítési költségek (Liu és mtsai., 2020).

Az elmúlt években megfigyelhető a technológia terjedése a specializált laboratóriumi kísérleti rendszerekben is, mint például a sejt szintű mikroalga fenotipizálás során (Volent és mtsai., 2009; Wei és mtsai., 2017), vagy korall-alga szimbiotikus kapcsolatok (Barott és mtsai., 2009) tanulmányozása céljából.

A különböző mikroalga minták fenotipizálásánál fokozottan nagy jelentőséggel bír a külső tényezők állandósága és reprodukálhatósága, ami jobban jellemzi a zárt rendszerű hiperspektrális állomásokat, mint hordozható megfelelőiket, azonban specifikusan mikroalgák

fenotipizálására épített nagy áteresztőképességű rendszerek jelen pillanatban nem elterjedtek. Emellett a mikroalga kultúrák sikeres hiperspektrális vizsgálatához fontos megismerni a technológia érzékenységeinek limitációit (Morgado és mtsai., 2024), illetve megvizsgálni, mennyire alkalmazható a módszer folyadékfázisú algakultúrákon.

2.6 A nitrát éheztetés hatásai *Synechocystis* mikroalgában

A nitrát éheztetés cianobaktériumokra gyakorolt hatása évtizedek óta tanulmányozott folyamat. A Nostocales rendbe tartozó többsejtű cianobaktériumok heterociszta képzésével és előzetes nitrogén felhalmozással kerülnek el a környezeti stressz ezen formáját, a nem-diazotróf egysejtű törzsek, mint például a *Synechocystis* sp. PCC6803 azonban nyugalmi állapotba kerülnek, és úgynevezett klorózison esnek át (Allen & Smith, 1969). A folyamat mind fiziológiai szempontból, mind transzkriptom analízis szintjén tanulmányozott (Gao és mtsai., 2015; Krasikov és mtsai., 2012).

A nyugalmi állapot indukciója, és a klorózis iniciációja a nitrogén teljes megvonása után már 12 óra elteltével megfigyelhető, és 48 óra elteltével általános a nyugalmi állapot, melyet a fikobiliszóma szintézisében és szénmegkötésben szerepet játszó gének gátlása jellemez (Krasikov és mtsai., 2012). Megfigyelhető a nitrogénben gazdag fikobiliszóma lebontása, mely az éheztetett kultúrák színváltozásával jár, és a klorózis folyamatának névadó jelensége. Az éheztetett sejt a fotokémiai rendszerek szintéziséhez szükséges géneket minimálisan gátolja, ezzel felkészítve magát a sejtaktivitás visszaállítására (Krasikov és mtsai., 2012). A nitrogén újbóli elérhetősége már 15 perc után válaszreakciókat indukál és 12 óra elteltével részlegesen helyreáll a sejtek szén-dioxid fixálása, mely a fotoszintézis folyamatok újraaktiválódásával egyidejű (Doello és mtsai., 2018).

Bár a *Synechocystis* és más cianobaktériumok klorózisának hiperspektrális követése nem ismeretlen, és hatékony noninvazív monitorozási módszerként alkalmazható (Rodríguez Lorenzo és mtsai., 2022), hiányoznak azok a nagymértékben standardizált és nagy áteresztőképességű technológiák, melyek a fajok széleskörű fenotipizálásában nélkülözhetetlenek.

2.7 Asztaxantin felhalmozás *Haematococcus pluvialis* zöldalgában

Az asztaxantin ketokarotinoid felhalmozás algákban lezajló jelensége, és ennek a folyamatnak a *Haematococcus pluvialis* zöldalgában megfigyelhető páratlan mértéke a 20. század folyamán mélyremerően feltárássra került (Boussiba & Vonshak, 1991). A *Haematococcus* sejtek palmella és aplanospóra stádiumára jellemző folyamat sebessége növelhető erős megvilágítás és nitrogén megvonás (Boussiba & Vonshak, 1991), nátrium-acetát (Kobayashi és mtsai., 1993) és a szénmegkötést nem befolyásoló, sejtosztódást gátló kezelések (Fábregas és mtsai., 1998; Kobayashi és mtsai., 1997) alkalmazásával.

A *Haematococcus* eredetű természetes asztaxantin versenyképes alternatívát nyújthat a jelenleg szinte kizárólag mesterségesen termelt asztaxantinnal szemben (Khoo és mtsai., 2019; J. Li és mtsai., 2011), ezért a termeltetés folyamatának teljes feltárása és optimalizálása intenzív kutatások tárgya. A folyamat fiziológiai tanulmányozása mellett (Chelebieva és mtsai., 2018; Y. Li és mtsai., 2008) a mikroalga transzkriptomikai analízisére (Wen és mtsai., 2015) és transzformációjára (Galarza és mtsai., 2018; Meng és mtsai., 2005) is kiemelt figyelmet fordítanak.

A termeltetés hatékonyságának növelése mellett fontos szempont az algakultúrák ipari léptékű és skálázható monitorozása (Solovchenko és mtsai., 2013), és annak ellenére, hogy mind a reflektancia alapú (Morgado és mtsai., 2024), mind pedig a hiperspektrális (Barlow és mtsai., 2014) érzékelési módszerek hatékonysága bizonyított, jelenleg nem rendelkeznek elegendő mértékű, nagy áteresztőképességet, skálázhatóságot és robusztusságot lehetővé tévő adatmennyiséggel, amely a széleskörű alkalmazás sarokköve lehetne.

3.) Célkitűzések

Munkánk első szakaszában a *Chlorella sorokiniana*, és *Synechocystis* sp. PCC6803 modellfajok reflektancia profiljait vizsgáltuk egy hiperspektrális képalkotó rendszerrel, hogy meggyőződjünk a specifikus rendszer alkalmazhatóságáról. Itt a fő céljaink voltak:

- I. A minták pigmenttartama, és reflektancia profiljai közti korreláció vizsgálata
- II. A hiperspektrális rendszer klorofill koncentráció függvényében vett érzékenységi limitációinak feltárása
- III. Annak kimutatása, hogy milyen módon függ össze *Synechocystis* és *Chlorella* keverékek reflektancia profilja a fajok térfogati arányával, illetve ez alapján meghatározható-e egyes pigmentek arányainak változása kevert kultúrákon

A kutatómunka további céljaként tűztük ki, hogy a képalkotó rendszer segítségével kövessük a *Synechocystis* sp. PCC6803 és *Haematococcus pluvialis* modellfajok fenotípus változásait nitrát hiányos tenyésztési körülmények között. Ebben az esetben célunk volt a következő kérdések megválaszolása:

- IV. A nitrát éheztetés által indukált klorózis követése és spektrális változások jellemzése a *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktériumban
- V. Asztaxantin felhalmozás, és a reflektancia profil változásának követése *Haematococcus pluvialis* zöldalga modellfajban, nitrát éheztetés és erős megvilágítás mellett

4.) ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Modellorganizmusok és tenyésztési körülmények

A cianobaktériumok modellorganizmusaként a *Synechocystis* sp. PCC6803 fajt használtuk. Szaporítása Gallenkamp IOI 400 rázóinkubátorban, 3%-os szén-dioxid koncentráció mellett történt, $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foton flux denzitáson, 30°C -os hőmérsékleten. A kultúrákat $\text{OD}_{750}=0,05$ denzitású, 100 ml-es inokulum-tápoldat keverékként, 250 ml-es Erlenmeyer lombikokban indítottuk.

Zöld mikroalga modellfajnak a *Chlorella sorokiniana* Shihira et Krauss fajt választottuk. A kultúrák tenyésztése GFL 3005 modellű rázaton, légköri (410 ppm) szén-dioxid koncentráción, szobahőmérsékleten (25°C), $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foton flux denzitáson történt, $\text{OD}_{750}=0,05$ denzitású, 100 ml-es térfogatú kultúrákból, 250 ml-es Erlenmeyer lombikokban.

A kísérletek során a modellorganizmusokat a Hamburgi Mikroalga Gyűjtemény (MZCH) által optimalizált BG11 tápoldatban neveltük, amely ideális a vizsgált mikroalgák és cianobaktériumok szaporításához.

A nitrátmegvonás indukálta fenotípus változás követése során a *Haematococcus pluvialis* zöldalga fajt, és a *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktériumot alkalmaztuk. A nitrát stressz kiváltásához a két modellorganizmus esetén BG11 tápoldatot alkalmaztunk, a nátrium-nitrát tápoldatból való kihagyásával. Minden kísérlet 3 párhuzamos biológiai ismételéssel történt.

A *Synechocystis* kultúrák vizsgálata során a nitrátmegvonás kísérletben alkalmazott mintákat 0,8-as OD-sal bíró, 50 ml-es inokulum-média keverékként, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban indítottuk, és Gallenkamp IOI 400 rázóinkubátorban, 3%-os szén-dioxid koncentráción, $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foton flux denzitáson, 30°C -os hőmérsékleten tenyésztettük. A referencia kultúrákat 0,1-es OD-sal bíró, 50 ml-es inokulum-média keverékként, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban indítottuk, és azonos körülmények között szaporítottuk.

A *Haematococcus* kultúrákat $5 \mu\text{g/ml}$ klorofill koncentrációra állítottuk be, és 50 ml-es inokulum-média keverékként, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban indítottuk, 25°C -os hőmérsékleten, légköri gázösszetétel körülményeken, rázás nélkül tenyésztve őket. A stressznek kitett mintákhoz előzetesen axenikus körülmények közt $50 \mu\text{mol/ml}$ végkoncentrációban nátrium-acetátot adtunk a stresszválasz további indukálását elősegítve

(Kobayashi és mtsai., 1993). A kontroll kultúrák 50-, míg a stresszelt kultúrák 100 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton flux denzitáson lettek nevelve.

4.2 Módszerek

4.2.1 Klorofilltartalom meghatározása spektrofotometriával

Pigmentkivonás szerves oldószerrel

A kultúrákból 1-1 millilitert vettünk, és 2 ml-es Eppendorf csőbe helyezve, Heraeus Biofuge Pico eppendorf centrifugában ülepítettük a sejteket. A *Chlorella sorokiniana* minták 9800 g-n, 8 percig, a *Synechocystis* sp. PCC6803 minták pedig 17000 g-n, 10 percig kerültek centrifugálásra. A *Haematococcus* minták a sejtstádiumnak megfelelően változó g-intenzitáson kerültek ülepítésre.

Következő lépésben a mintákról a felülúszót eltávolítottuk, és azonos térfogatú, 1 ml szerves oldószert mértünk hozzájuk. A *Chlorella* pillethez acetone és dimetil-szulfoxid 1:1 arányú keverékét, a *Synechocystis*-hez vegytiszta metanolt, a *Haematococcus* pillethez pedig vegytiszta dimetil-szulfoxidot adtunk. Ezután a mintákat szuszpendáltuk az oldószerben, majd a *Synechocystis* és *Chlorella* mintákat 5-10 percig jégen, fénytől mentes környezetben, a *Haematococcus* mintákat pedig 10-15 percig fénytől mentesen, 70 °C-os forró víz fürdőben inkubáltuk (Kobayashi és mtsai., 1997).

A mérést zavaró sejttermék eltávolítása érdekében a mintákat újból centrifugáltuk, a *Chlorella* sejteket ismét 9800 g-n 8 percig, a *Synechocystis* és *Haematococcus* sejteket pedig 17000 g-n, 3 percig. Centrifugálás után a sejtmentes pigmentkivonatot tartalmazó felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztuk.

Abszorpciós értékek mérése spektrofotométerrel

Az abszorpció méréséhez egy Shimadzu UV-1800 két fényutas spektrofotométert használtunk, 380-800 nanométer közötti hullámhossz tartományban a teljes spektrumot leolvassva. A pigmentkivonatok abszorpció spektrumát 1 cm úthosszú Hellma Analytics 108-S optikai üveg küvettákban mértük le. A méréseket megelőzően a vizsgált mintának megfelelő tiszta oldószerrel alapvonalat vettünk fel. A *Chlorella sorokiniana* pigmentkivonatai esetén 663, és 645 nanométernél (Lichtenthaler, 1987), a *Synechocystis* sp. PCC6803 kivonatain 665,5, és 650,5 nm-nél (Farshadfar & Amiri, 2015), a *Haematococcus* minták esetén pedig 666 és 678 nm-nél (Ritchie és mtsai., 2021) mértük az abszorbancia értéket.

4.2.2 Klorofilltartalom kiszámítása

A klorofilltartalom számítását a leolvasási hullámhosszértékekhez tartozó egyenletekkel végeztük:

Synechocystis sp. klorofill *a* tartalmának tiszta metanolos oldatból:

$$\text{Chl } a \left(\mu \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = 16,5 * A_{665,5} - 8,3 * A_{650,5} \quad (5.1)$$

ahol *A* az adott hullámhossznál mért abszorbanciát jelöli

Chlorella sorokiniana klorofill *a* tartalmának meghatározása acetone-DMSO 1:1 arányú oldatából:

$$\text{Chl } a \left(\mu \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = 11,75 * A_{663} - 2,35 * A_{645} \quad (5.2)$$

ahol *A* az adott hullámhossznál mért abszorbanciát jelöli.

Haematococcus klorofill *a* tartalmának meghatározása tiszta DMSO oldatból:

$$\text{Chl } a \left(\mu \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = 11.6422 \times A_{666} - 2.0922 \times A_{648} \quad (5.3)$$

ahol *A* az adott hullámhossznál mért abszorbanciát jelöli.

A minták klorofilltartalma megállapításra került a kiindulási algakultúrák esetében, továbbá a reflektancia adatok kinyerése után, a mintatartó lemezen elhelyezett mintákból is.

4.2.3 Hígítási sorok létrehozása és vizsgálata

A hiperspektrális mérésekhez a hígítási sorokat Greiner Bio-One Cellstar hatlyukú mintatartó lemezekben készítettük el. A mérések során célszerű volt egy biológiai ismétlést úgy elvégezni, hogy a mintákat széles klorofill koncentráció tartományban vizsgálhassuk. Ehhez a legtöményebb vizsgált mintát 10 µg/ml klorofill *a* koncentrációra állítottuk be, majd a 10-es alapú logaritmikus skálát követve, a hígítási sorozatot készítettünk 5, 2, 1, és 0,5 µg/ml-es klorofill *a* koncentrációkkal. A mintákat hígítási sorban a hatlyukú lemezek kamráiba pipettáztuk, minden sorozatnak részét képezte továbbá egy kizárólag BG11 tápoldatot tartalmazó kamra, mint háttér.

A hígítási sorok létrehozása elegendő mennyiségű, 10 µg/ml klorofill *a* koncentrációjú minta elkészítésével történt, melynek létrehozásához a kiindulási kultúrákat BG11 tápoldattal

hígítottuk, vagy Falcon® csőben, Thermo Scientific™ SL4 Plus centrifugával üleptettük, és tiszta tápoldatban reszuszpendáltuk.

4.2.4 Beállított klorofill *a* koncentrációjú keverékek létrehozása és vizsgálata

A kísérlet következő szakaszában kétkomponensű, beállított klorofillkoncentrációval rendelkező algakeverékeket készítettünk a modellorganizmusokból, két darab, hat lyukú lemezen. A kevert algaminták összemérése 5 ml-es végtérfogatban, az eredményekben leírt térfogati arányok szerint történt. Az így létrehozott sorozatokat 0,5; 1; 2; 5; és 10 µg/ml klorofill *a* koncentrációra beállított algakultúrákkal is elvégeztük. A keverési sorozatok mellett egy harmadik lemezen lemérésre került továbbá 5 ml tiszta BG11 oldat is, mely a későbbiekben referencia értékeket biztosított az adatok korrigálásához.

4.2.5 Nitrát stressznek kitett kultúrák létrehozása és fenotípus vizsgálata

A nitrát éheztetett kultúrákat a fenotípus változás ütemének megfelelő időfelbontásban, hat lyukú mintatartó lemezen vizsgáltuk. A lemez kamráiba minden mérés során az összes biológiai ismételtsből 5-5 millilitert helyeztünk, 5 ml tiszta BG11 oldat kíséretében, mely ez esetben is az optikai háttér szerepét töltötte be. A *Synechocystis* mintákat 12 óránként, 9 és 21 órakor, a 72 órás mérési pont eléréséig vizsgáltuk, míg a *Haematococcus* mintákat naponta egy alkalommal, 9 órakor vizsgáltuk, változó időbeli kihagyásokkal a mérési pontok között, melyek megfeleltek az indukált fenotípus változás időbeli tendenciájának. Ennek értelmében a *Haematococcus* vizsgálat során a kezdeti időpontban, és az azt követő 2, 5, 7, 9, 12, 14, és 16 nap elteltével végeztünk méréseket. A hiperspektrális képalkotást mindkét modellorganizmus vizsgálata során a lemezen elhelyezett mintákból végzett sejtszámlálással és szerves oldószeres klorofill méréssel egészítettük ki.

5.2.6 Hiperspektrális fényképező rendszer tulajdonságai

A reflektancia mérést a VNIR Hyperspectral Imaging Station (Photon Systems Instruments, Brno, Csehország) képalkotó rendszerrel végeztük, amely a kompakt PlantScreenTM növényfenotipizáló rendszer (Photon Systems Instruments, Brno, Csehország) része. Az állomás 1920*1000 pixel felbontású, 12 bites színmélységű CMOS szenzorral van felszerelve. Objektívje manuálisan állítható, 6 mm-es fókusz távú, és 1.4-es maximum apertúrával rendelkezik. A rendszer standard munkatávolsága 420 mm, és a 380-900 nanométeres hullámhossztartományban képes érzékelni. Fényforrásként 1680 Kelvin színhőmérsékletű izzók vannak használatban. A kamera a gyártó által lett kalibrálva.

4.2.7A hiperspektrális mérés menete

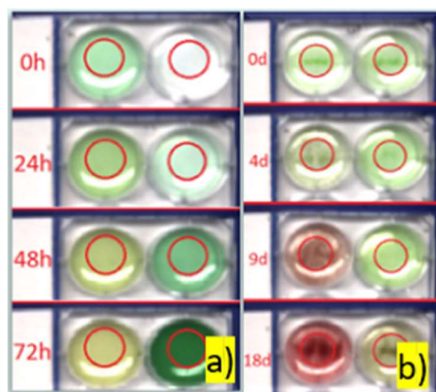
A méréshez a mintákat tartalmazó lemezeket elhelyeztük a gyártó által biztosított, QR kód jelzéssel ellátott mintatartón. Ennek felülete előzetesen fehér fotópapírral lett bevonva, mely egyenletes reflektanciájú hátteret biztosított a teljes hullámhossz tartományban.

A minták kamera állomáshoz való mozgását, illetve eltávolítását a fenotipizáló készülék futószalag rendszere végezte. Minden mérés kezdetén sötét-, illetve fehér kalibráció történik. Ennek során egy-egy kép készül teljes sötétségben, illetve teljes megvilágításban, a készülék beépített kalibrációs lemezéről. A rendszer ezeket a kalibrációs adatokat használja fel a sötétzaj kiszűrésére, illetve homogenitás-vizsgálatra.

A vizsgálati objektumról a szenzor soronként olvassa be az adatokat, a fényforrás pedig együtt mozog a kamerával, az egyenletes megvilágítás érdekében.

A kinyert nyers adatok .BIL (Band Interleaved by Line), míg a paraméterek .HDR leíró fájlformátumban kerülnek tárolásra. Ezt követi a kalibráció alkalmazása a nyers adatokra, annak érdekében, hogy a relatív reflektancia spektrumokat megkapjuk.

A mintákon AOI (Area of Interest) kiértékelési területeket jelöltünk ki. Az alkalmazott szoftver ezeken a területeken átlagolja az egyes pixelek spektrális adatsorait. Figyeltünk arra, hogy homogén, csillanástól és egyéb fénytani artefaktoktól mentes területeket jelöljünk ki (3a és 3b ábrák).



3. ábra: Kezelési idő függvényében összeállított, nitrát éheztetett *Synechocystis* sp. (a panel), illetve *Haematococcus pluvialis* (b panel) mintasorozatok RGB képei, az elhelyezett AOI kiértékelési területekkel. A számjelölés a kezelés időbeli hosszát jelöli óra, illetve nap felbontásban. Mindkét sorozat mellé kontroll minták kerültek elhelyezésre.

Az adott pixelhez, illetve mérési területhez (AOI) tartozó reflektancia-értékek a gyártó által biztosított, rendszerrel kompatibilis Hyperspectral Imaging szoftverrel nyerhetők ki.

4.2.8 Fénytani tulajdonságok kifejezése és számolása

A reflektancia vizsgálat során a képalkotó rendszer relatív reflektancia adatot nyer ki, melyhez egy sötét jelet, illetve egy teljesen reflektáló jelet használ, a minta értékeinek kalibrálására. A különböző értékek egymáshoz való viszonyulását az (5.4) egyenlet fejezi ki.

$$R_s = \frac{I_s - I_d}{I_r - I_d} \quad (5.4)$$

Relatív reflektancia (R_s) számolása teljes sötét (I_d), minta reflektancia (I_s), illetve reflektancia standard (I_r) értékek alapján (Kovar et al., 2019).

A minták relatív abszorbancia értékeit az (5.5) egyenlet segítségével állapítottuk meg,

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (5.5)$$

ahol A az abszorbanciát, I a vizsgált minta, I_0 pedig a referencia BG11 oldat reflektancia értékét jelöli.

A kultúrák vizsgálata során további korrigálást végeztünk a 800 nm-es hullámhosszhoz tartozó intenzitás értékre, mely optikailag semleges korrekciós pontként funkcionált.

$$A_{corr.} = A - A_{800} \quad (5.6)$$

ahol „ $A_{corr.}$ ” a korrigált abszorbancia értéket, A az adott hullámhossznál mért abszorbancia értéket, A_{800} pedig mindig a 800 nm-nél mért abszorbancia értéket jelöli

A nitrát éheztetett kultúrák vizsgálata során az abszorbancia spektrumokat mind a 800 nm hullámhosszt jellemző intenzitás értékkel, mind pedig a klorofill a Q_Y maximum abszorbancia értékével normalizáltuk.

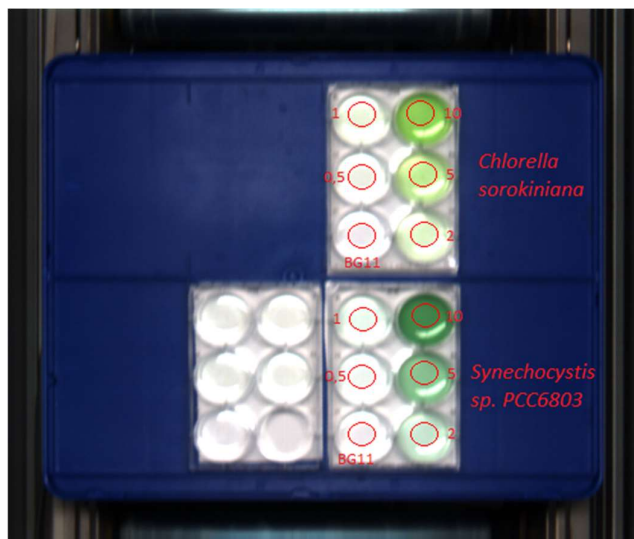
$$A_{norm.} = \frac{A_{corr.}}{A_{Q_Y}} \quad (5.7)$$

ahol „ $A_{norm.}$ ” a normalizált abszorbancia értéket, „ $A_{corr.}$ ” az (5.6) egyenlet szerint meghatározott, 800 nm-re korrigált abszorbancia értéket, A_{Q_Y} pedig a klorofill Q_Y elnyelési maximumának relatív abszorbancia értékét jelöli.

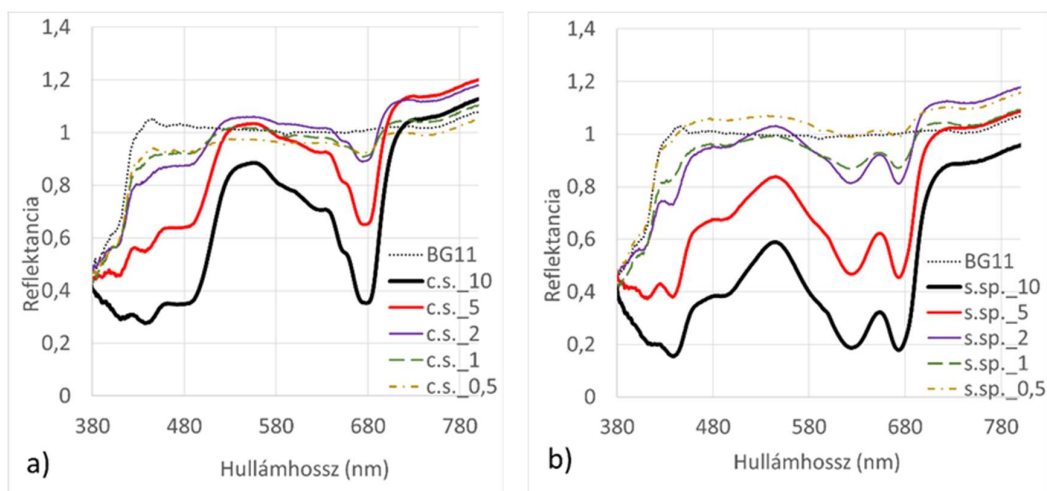
5) EREDMÉNYEK

5.1 Egyféle algafajt tartalmazó hígítási sorok vizsgálata

A $\log_{10}$ alapú hígítási sorokról RGB képeket készítettünk, a mintákon homogén területeket kijelölve. (4. ábra).

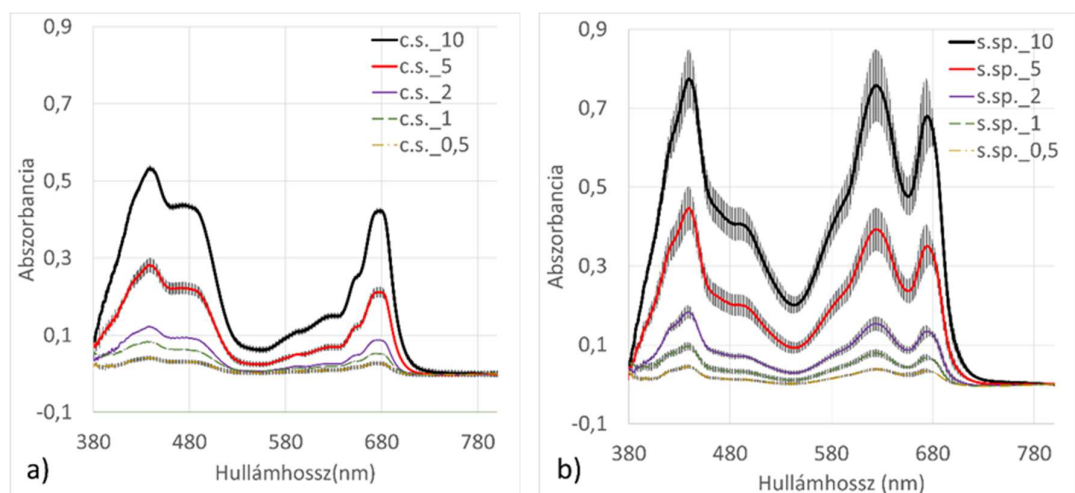


4. ábra: Az állomás RGB kamera rendszere által alkotott kép *Chlorella sorokiniana* és *Synechocystis* algák hígítási sorairól, a kijelölt mérési területekkel. A számjelzések a minták $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezett klorofill *a* koncentrációját jelölik.



5. ábra: *Chlorella sorokiniana* (a panel), illetve *Synechocystis* (b panel) reflektancia spektrumai (ahol „c.s.” a *Chlorella sorokiniana*, „s.sp.” a *Synechocystis* sp. fajt, a számjelzés pedig a $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezett elméleti klorofilltartalmat jelöli)

A képalkotás során kapott reflektancia spektrumokat (5. ábra) ezután az (5.5) egyenlet segítségével relatív abszorbancia spektrumokként ábrázoltuk, majd a 800 nm-en mért abszorbancia értéket 0-nak véve korrigáltuk az (5.6) egyenlet alkalmazásával.

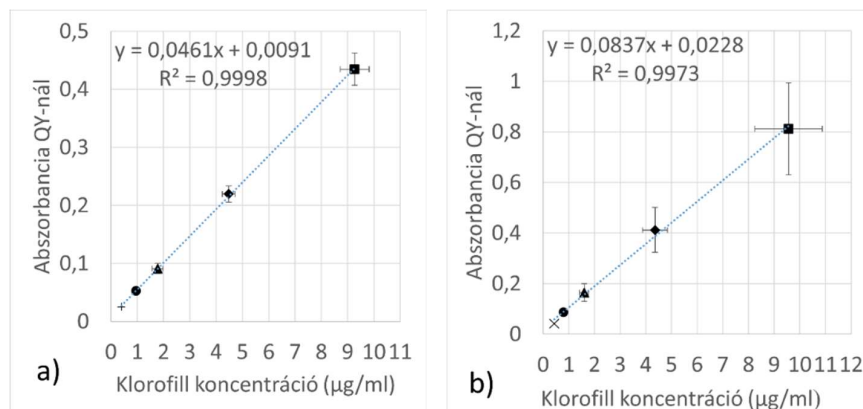


6. ábra: Korrigált, reflektanciából kifejezett átlagos abszorpció spektrumok szórással, *Chlorella sorokiniana* (a panel), illetve *Synechocystis* (b panel) esetében (ahol „c.s.” a *Chlorella sorokiniana*, „s.sp.” a *Synechocystis* sp. fajokat, a számjelzés pedig a $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezett elméleti klorofilltartalmat jelöli)

A *Chlorella sorokiniana* esetén jól megfigyelhetők voltak a főbb pigmentekhez köthető abszorpció sávok: 441 nm-nél és 678 nm-nél a klorofill *a*, 475 nm-nél és 650 nm-nél a klorofill *b* (6a. ábra). A *Synechocystis* minták vizsgálata során a fikocianin elnyelési maximumát 624 nm-nél határoztuk meg, továbbá *Synechocystis*-ben is azonosíthatók voltak a klorofill *a* 441 nm-es, illetve 678 nm-es elnyelési sávjai (6b. ábra).

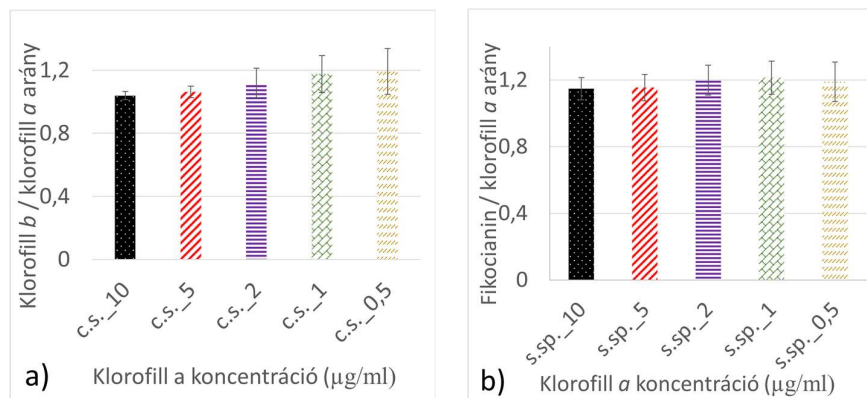
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy milyen korreláció figyelhető meg a különböző minták szerves oldószeres pigmentkivonatainak spektrofotometriás méréssel megállapított klorofillkoncentrációja, illetve a reflektancia spektrumokból származtatott klorofill *a* vörös tartományban történő maximális elnyelési (Q_Y) csúcsánál mért abszorbancia értékek közt.

A klorofill *a* maximum abszorbancia értékei, és a minták spektrofotometriával meghatározott klorofilltartalma között mindkét modellorganizmus esetében erős korrelációt figyeltünk meg (7. ábra).



7. ábra: A minták klorofill *a* Q_Y értéke, illetve visszamért klorofillkoncentrációja közti összefüggés *Chlorella sorokiniana* (a panel), illetve *Synechocystis* (b panel) esetében (ahol „c.s.” a *Chlorella sorokiniana*, „s.sp.” a *Synechocystis* sp. fajokat, a számjelzés pedig a µg/ml-ben kifejezett elméleti klorofilltartalmat jelöli)

A hígítási sor mintáiban ezt követően megvizsgáltuk a modellfajra jellemző fotoszintetikus pigmentek arányát. A *Chlorella* esetében a klorofill *b* / klorofill *a* arányt, míg a *Synechocystis* mintákban a fikocianin / klorofill *a* arányt vizsgáltuk (8. ábra). Célunk ezzel az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a pigment arányok változnak-e a hígítással. A hipotézisünk az, hogy a vizsgált klorofill koncentráció tartományban a pigment arányok a hígítással nem változnak egy fajon belül, így a pigment arányok nagy bizonyossággal állapíthatók meg változó klorofill koncentráció esetén is.

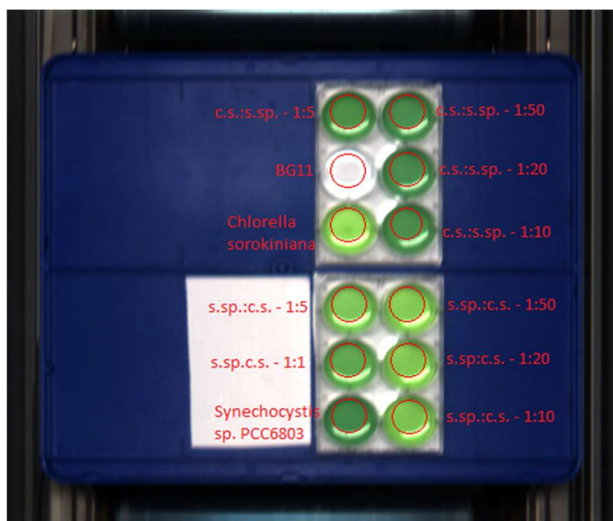


8. ábra: Fajra jellemző fotoszintetikus pigmentek egymáshoz viszonyított aránya *Chlorella sorokiniana* (a panel), illetve *Synechocystis* (b panel) esetében (ahol „c.s.” a *Chlorella sorokiniana*, „s.sp.” a *Synechocystis* sp. fajokat, a számjelzés pedig a µg/ml-ben kifejezett elméleti klorofilltartalmat jelöli)

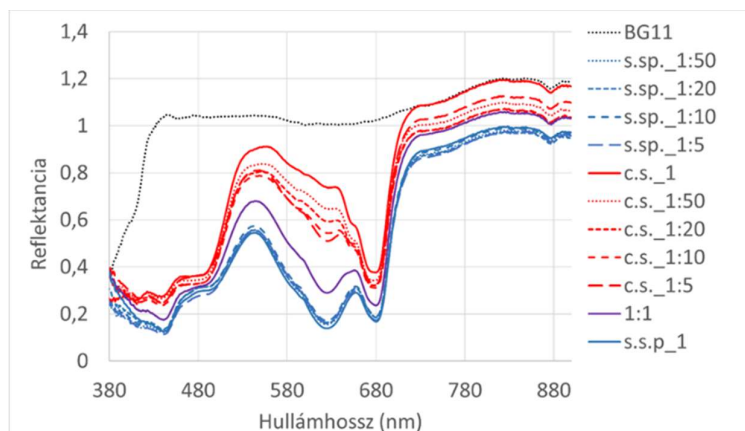
Mindkét faj esetén elmondható, hogy a pigmentarányok közt nem volt tapasztalható szignifikáns eltérés (8. ábra, statisztikai elemzés: 1. függelék)

5.2 Kétkomponensű kevert minták vizsgálata

A kísérlet következő szakaszában a $\log_{10}$ skálát követő arányban kevert, kétkomponensű, megadott klorofilltartalmú minta sorozatokat vizsgáltuk. Az RGB kép alapján homogén kiértékelési területeket (AOI) jelöltünk ki (9. ábra), a területek reflektancia spektrumának (10. ábra) elemzéséhez.

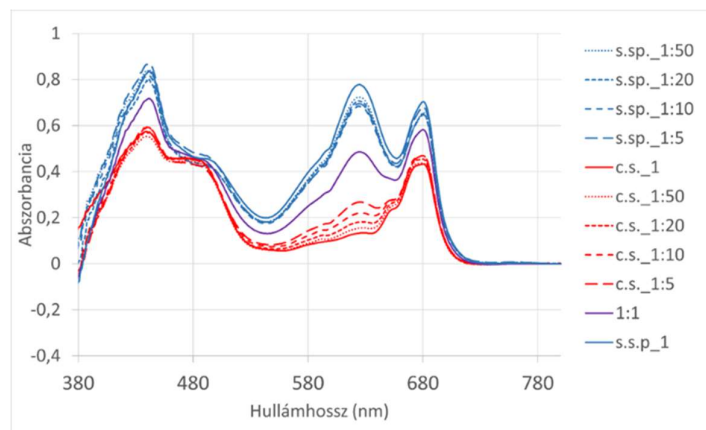


9. Ábra: A fényképező állomás által alkotott RGB kép a modellfajok 5 $\mu\text{g/ml}$ klorofill koncentrációra beállított, kevert mintáiról. A c.s. és s.sp. jelölés a *Chlorella sorokiniana*, illetve *Synechocystis sp.* fajokat, a számjelzések pedig azok egymáshoz viszonyított térfogati arányát fejezik ki.



10. ábra: A kétkomponensű keverék tagjainak reflektancia spektrumai *Chlorella* és *Synechocystis* 5 $\mu\text{g/ml}$ klorofill koncentrációjú keverékben, ahol „c.s.” és „s.sp.” a nagyobb arányban szereplő *Chlorella sorokiniana*, illetve *Synechocystis sp.* fajokat, a számjelzés pedig a kisebb mennyiségben jelen levő faj térfogati arányát jelöli. Az 1 jelölésű sorozatok egykomponensű kultúrát jelölnek.

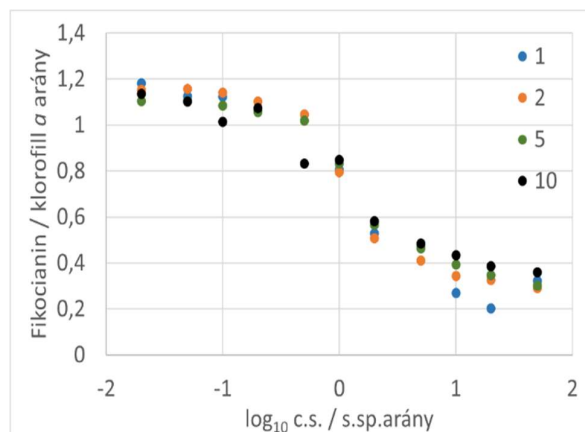
A reflektancia adatsorokat az (5.5), majd (5.6) egyenlet alkalmazásával, korrigált, relatív abszorbancia értékekké transzformáltuk (11. ábra).



11. ábra: A kétkomponensű keverék tagjainak korrigált abszorbancia spektrumai *Chlorella* és *Synechocystis* 5 µg/ml klorofill koncentrációjú keverékben, ahol „c.s.” és „s.sp” a nagyobb arányban szereplő *Chlorella sorokiniana*, illetve *Synechocystis* sp. fajokat, a számjelzés pedig a kisebb mennyiségben jelen levő faj térfogati arányát jelöli. Az 1 jelölésű sorozatok egykomponensű kultúrát jelölnek.

Ezt követően az abszorpció spektrum adatait alapul használva minden sorozatban megvizsgáltuk mindhárom fotoszintetikus pigment egymáshoz viszonyított arányát. Ehhez a pigmentekre jellemző hullámhossznál mért abszorpciós értékek arányait vizsgáltuk.

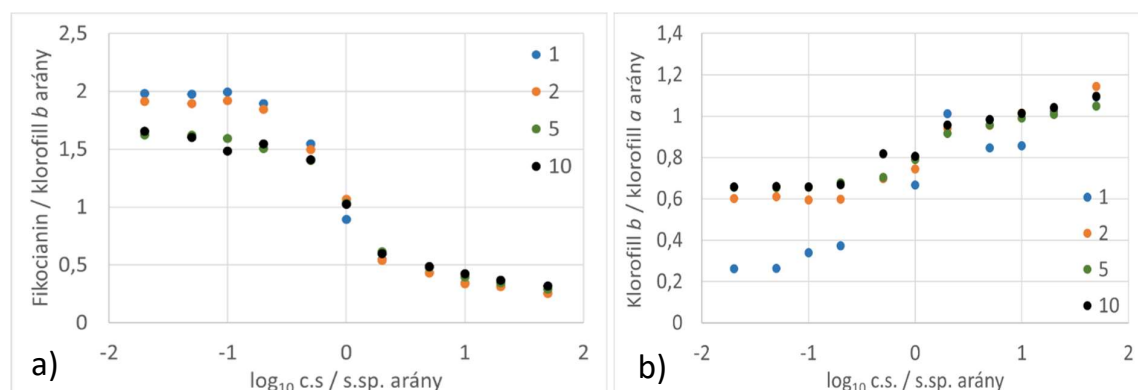
Azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a keverékekben a pigmentek egymáshoz viszonyított eloszlása arányosan változik a fajok keverési arányaival, klorofill koncentrációtól függetlenül.



12. ábra: Fikocianin / klorofill *a* abszorbancia intenzitás arányának változása a keverékek *Chlorella* / *Synechocystis* arányához viszonyítva. A számjelzések a minták µg/ml-ben kifejezett klorofill *a* tartalmának kifejezésére szolgálnak.

A kapott adatsor alapján a *Chlorella* mennyiség növelésével a fikocianin / klorofill *a* arány csökkenése tapasztalható (12. ábra). Az ábrázolt eredménynek értelmében a pigmentek

aránybeli változása nem függ a minták teljes klorofill tartalmától, és a pigmentek aránybeli változása az algafajok térfogati keverési arányát jól követi.



13. ábra: Fikocianin / klorofill *b* (a panel) illetve klorofill *b* / klorofill *a* (b panel) intenzitás arányok változása a keverékek *Chlorella* / *Synechocystis* arányához viszonyítva. A számjelzések a minták µg/ml-ben kifejezett klorofill *a* tartalmának kifejezésére szolgálnak.

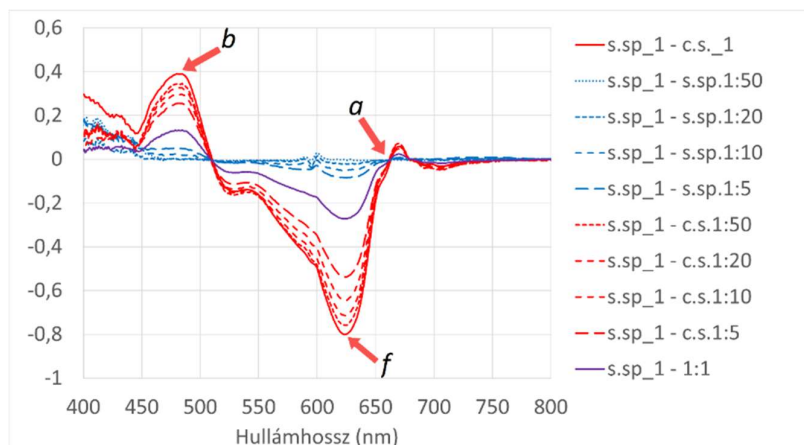
A 13. ábra alapján megállapítható, hogy a fikocianin / klorofill *b* pigmentek aránya a klorofilltartalomtól függetlenül követi a keverékekben lévő fajok térfogati arányát, azonban csak a megközelítőleg 1:5 *Chlorella*: *Synechocystis* keverési arányig (13. ábra a panel).

A magas *Synechocystis* tartalmú, 5 és 10 µg/ml klorofillkoncentrációjú mintákban az adatsortól való eltérés figyelhető meg, és ezekben a mintákban alacsonyabb fikocianin klorofill *b* arány érzékelhető.

A klorofill *b* / klorofill *a* arány a 2-, 5-, és 10 µg/ml klorofill koncentrációjú minták esetében közel egyező módon követi a hígítási arányokat (13. ábra, b panel).

A kapott eredmények alapján erős korrelációt figyeltünk meg a mintákban a fotoszintetikus pigmentek, és a modellorganizmusok térfogati aránya közt, a vizsgált minták sűrűségétől függetlenül, azonban bizonyos klorofill koncentrációknál a pigment arányok eltérést mutattak.

A leginkább eltérő abszorpciót mutató régiók szemléltetésére különbségi spektrumokat vettünk fel, a Q_Y korrigált abszorbancia spektrumok alapján.

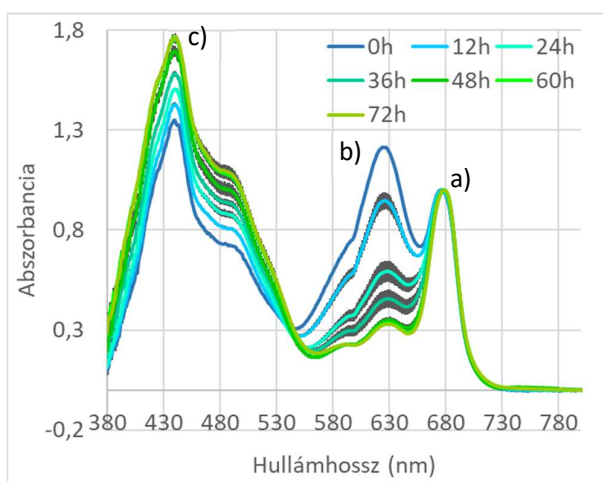


14. ábra: Tiszta *Synechocystis*-ből származtatott különbségspektrum 5 µg/ml klorofill *a* koncentrációjú minta esetében. A spektrum az *a* ponttal jelölt Q_Y csúcsra normalizált, az ehhez viszonyított klorofill *b* aránya a *b* pont által jelölt 481 nm-es hullámhossznál található, míg a fikocianin aránya a 624 nm-nél mért, *f* ponttal jelölt értékek felel meg.

A különbségi spektrumokon a teljes klorofill koncentrációtól függetlenül, egységesen megfigyelhetők azok a jellegzetes régiók, ahol a pigmentarányok különbségéből adódó elnyelési profilok a leginkább eltérőek (14. ábra).

5.3 Nitrát éheztetett *Synechocystis* kultúrák klorósisának követése

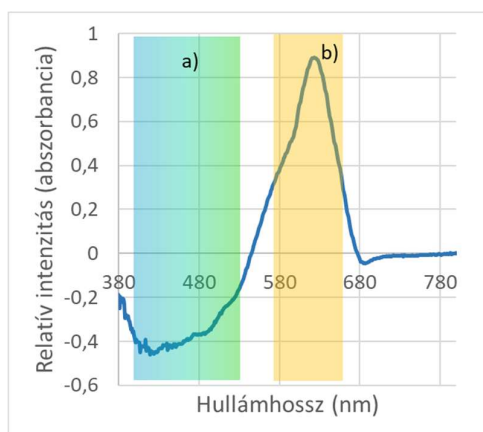
A nitrát éheztetés spektrális változásainak vizsgálatát Q_Y normalizált abszorbancia spektrum alapján végeztük. Az adatsorokon jól követhető a stressznek kitett kultúrák klorósisa, és a fikocianin elnyelési intenzitásának csökkenése (15. ábra).



15. ábra: Nitrát éheztetett *Synechocystis* kultúrák maximum klorofill *a* intenzitásra (Q_Y) korrigált abszorbancia profilja a nitrátmegvonás különböző időpontjaiban ábrázolva. A klorofill *a* karakterisztikus elnyelési régióit 441 nm-es (c jelöléssel) és 678 nm-es (a jelöléssel), a fikocianint pedig a 624 nm-es (b jelöléssel) hullámhossznál azonosítottuk.

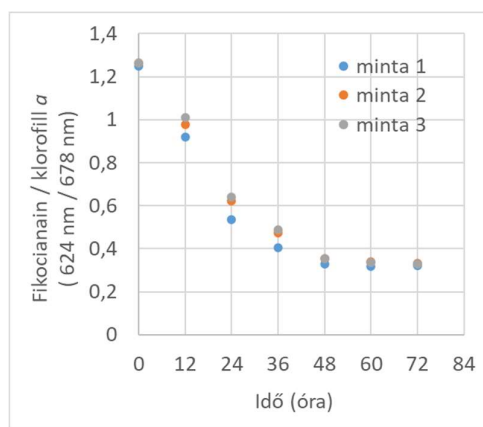
Az adatsoron megfigyelhető a fikocianin elnyelési sávjának intenzitás csökkenése mellett a karotinoidokra jellemző 450-550 nm-es hullámhossz régió, továbbá a klorofill *a* 441 nm-nél található abszorbancia csúcs intenzitás értékeinek növekedése is (16. ábra).

A kinyert adatsorok segítségével normalizált különbségi spektrumot hoztunk létre, hogy további információt szerezzünk a legmarkánsabb spektrális változásokkal kapcsolatban (16. ábra).



16. ábra: Nitrát éheztetett *Synechocystis* sp. kultúrák különbségi spektruma. Jól elkülöníthető a fikocianin reprezentatív spektrális régiója („b” jelöléssel), továbbá a karotinoid sávban is megfigyelhetők különbségek („a” jelölés)

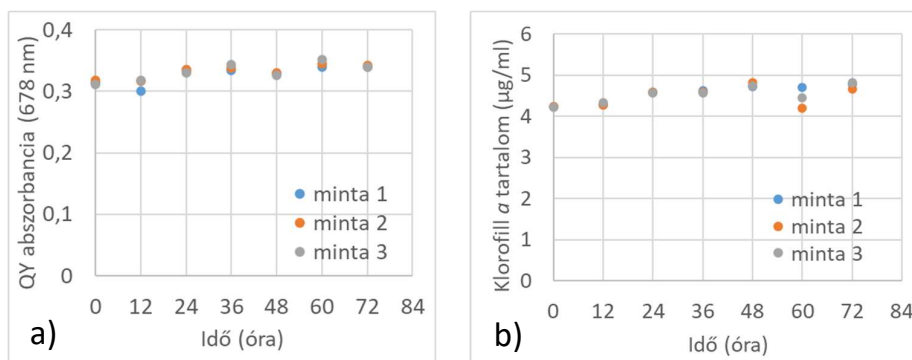
A különbségspektrum és az abszorbancia adatsorok alapján a klorofill *a* és fikocianin aránybeli változásainak követéséhez a 678 nm-es, illetve 624 nm-es intenzitás értékek arányait vizsgáltuk.



17. ábra: Fikocianin / Q_Y abszorbancia intenzitás aránybeli változása a különböző ismétlések szerint, a mintavétel időpontjának függvényében ábrázolva.

Méréseink alapján a fikocianin klorofill *a*-hoz viszonyított aránya a 48 órás mintavételi pontig csökkenő tendenciát mutat, majd stabil szintre áll be (17. ábra).

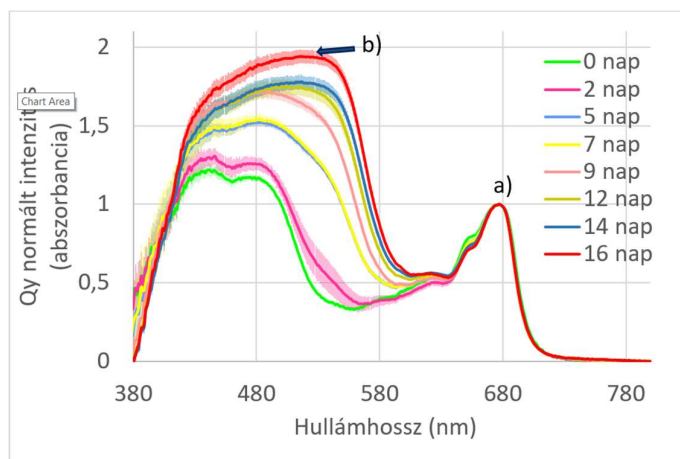
A nitrát éheztesítés során a reflektancia adatok nem utaltak a klorofill *a* szint csökkenésére a mintákban (18. ábra, a panel), amelyet megerősített a minták klorofilltartalmának spektrofotometriás meghatározása (18. ábra, b panel).



18. ábra: A klorofill *a* Q_Y abszorbania értékének változása (a panel) illetve a minták szerves oldószeres kivonat alapján megállapított klorofill *a* tartalma a mintavételi időpontok függvényében. Egyik paraméter sem mutat jelentős különbséget a kísérlet folyamán.

5.4 Asztaxantin akkumuláció reflektancia alapú követése *Haematococcus pluvialis* modellorganizmusban

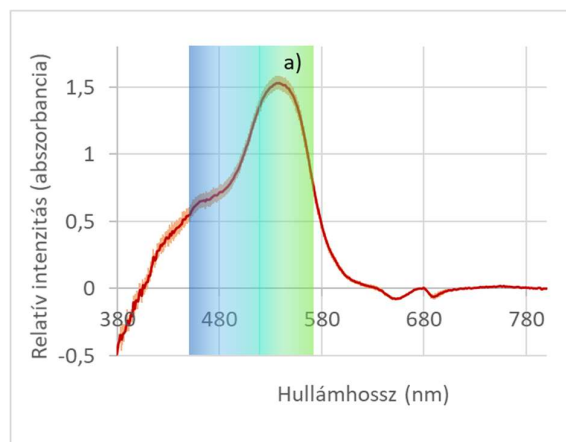
Az asztaxantin képződés spektrális változásait Q_Y normalizált abszorbania spektrum alapján végeztük. A 19. ábrán jól megfigyelhető az abszorbania intenzitás növekedése a karotinoidok jellegzetes 450-550 nm-es régiójában.



19. ábra: Nitrát éheztesített *Haematococcus* kultúrák Q_Y maximum klorofill *a* intenzitásra normalizált abszorbania profilja. A klorofill *a* Q_Y elnyelési csúcsát az „a)”, míg a maximális karotinoid abszorbania érték helyét „b)” pont jelöli. A számjelzések a nitrát éheztesítés napokban mért hosszát jelölik.

Az adatsorok alapján a klorofill *a* Q_Y elnyelési csúcsát 678 nm-es, míg a maximális karotinoid abszorbania értéket 515 nm-es hullámhossz értéknél állapítottuk meg (19. ábra).

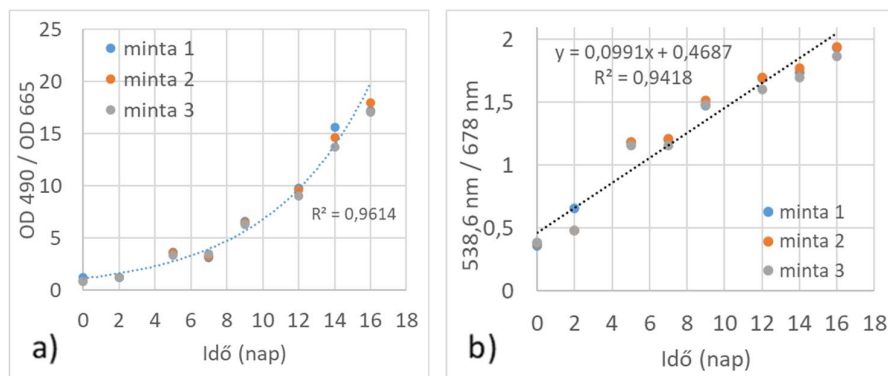
Az adatsorokat felhasználva normalizált különbségi spektrumot hoztunk létre, hogy pontosabban vizsgáljuk a legjelentősebb spektrális változások régióit.



20. ábra: A végső, illetve kiindulási állapotú *Haematococcus* sejtek alapján számolt, Q_Y -ra korrigált különbségi spektrum. A legintenzívebb spektrális változást az 538,5 nm-es hullámhossznál felvett érték mutatta (a).

Az adatsorok vizsgálata során a klorofill *a* maximum intenzitását a 678 nm-es, az asztaxantin jellegzetes spektrális régióját pedig 538,5 nm-es hullámhosszértékeknél figyeltük meg. A 19. és 20. ábra alapján jól elkülöníthető az asztaxantin felhalmozódását jelző intenzitás-változás.

A kinyert információk birtokában az adatokat korreláltattuk a kultúrák szerves oldószeres pigment kivonatainak adataival, illetve megvizsgáltuk a pigmentek arányainak változását a különböző mérési pontok szerint.



21. ábra: A pigmentarányok változása a szerves oldószeres kivonatok (a panel) illetve az abszorbancia adatsorok (b panel) alapján, a nitrát stressz napban megadott időtartamának függvényében

Míg a szerves oldószeres pigmentkivonatok adatai alapján a pigmentarányok változása exponenciális tendenciát mutatott (21. ábra, a panel), az abszorbancia értékek közt lineáris összefüggés fedezhető fel (21. ábra, b panel).

6) DISZKUSSZIÓ

6.1 Modell algafajok egykomponensű hígítási sorozatainak értékelése

A kísérletsorozat alatt kinyert, jellegzetes elnyelési régiók szinte teljes egyezést mutattak a szakirodalomban korábban leírt hullámhossz értékekkel. Mind a klorofill *a*, mind a fikocianin elnyelési régiói egybeestek a fajokra specifikus már leközlött, spektrofotometriás eljárással kinyert értékekkel (Luimstra és mtsai., 2018), emellett a minták alapvető spektrális profilja is nagyfokú egyezést mutatott (6. ábra). Ez alapján arra következtethetünk, hogy az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben kezelt minták hiperspektrális adatai megegyeznek megbízhatóságukban a spektrofotometriás eljárással, kisebb áteresztőképességű módszerrel kinyert adatokkal. Ezt a következtetést tovább erősítette, hogy a vizsgált fotoszintetikus pigmentek karakterisztikus elnyelési régiói nagymértékben megfeleltethetőnek bizonyultak azok szerves oldószeres kivonatból nyert abszorpciós maximum értékeivel (7. ábra). Továbbá ebből az egyezésből következő megállapítás, hogy az általunk felállított kalibráció egyenesek alkalmasak lehetnek a *Chlorella*, illetve *Synechocystis* mintákban a klorofill *a* közvetlen, nem invazív és nagy áteresztőképességű mennyiségi meghatározására. Eredményeink alapján a képalkotási eljárás megbízhatóan használható az általunk vizsgált modellfajok pigmentarányainak vizsgálatára, akár rendkívül alacsony, vagy magas sejtsűrűségű kultúrák esetén is (9. ábra).

6.2 Kétkomponensű keverési sorozatok elemzése

A keverési sorozat komponenseiben megfigyelhető volt a fikocianin elnyelési sávjának térfogati arányokkal megegyező fokozatos eltűnése, illetve megjelenése, továbbá különbség fedezhető fel a különböző karotinoidokra, illetve a klorofill *a*-ra jellemző elnyelési régiókban is (11. ábra). Ennek értelmében a többkomponensű algakeverékek tanulmányozása során nem csak a fajokban kizárólagosan megtalálható fotoszintetikus pigmentek régiói lehetnek alkalmasak spektrális azonosításra, hanem az általánosan előforduló, vagy éppen kevésbé prominens spektrális régiók is támpontot nyújthatnak a vizsgált organizmusok azonosításában. Ezt a következtetést a releváns szakirodalomban több alkalommal megerősítették (Che és mtsai., 2023; Salmi és mtsai., 2021).

A kevert kultúrák pigmentarányainak vizsgálata során a rendszer érzékenysége nem érte el az egykomponensű kultúrák esetében tapasztalt szintet, nagyobb pontosságot mutatva a 2 µg/ml, vagy ennél magasabb klorofill *a* tartalmú minták esetében. Szintén megfigyelhető volt a magas klorofill *a* tartalmú, *Synechocystis* tartalmazó minták az adatsor többi pontjától való eltérése

(13. ábra a panel), melyet okozhat a reflektancia spektrum optikai torzulása. Emellett elmondható, hogy ebben a nagyságrendi felbontásban a minták pigmentarányai nem lineáris összefüggést mutattak, melyet magyarázhat a széles érzékelési tartomány. Az adatkinyerés során létrehozott különbségi spektrumok szemléletesen ábrázolják a legjelentősebb spektrális változásokat, ezért hasznos eszközök lehetnek a mikroalga fajok spektrális profil alapú elkülönítésében.

6.3 Nitrát éheztetett *Synechocystis* kultúrák adatsorainak értékelése

A kísérletsorozat során kapott spektrális profilok nagyfokú hasonlóságot mutattak a szakirodalomban leközölt adatokkal (Krasikov és mtsai., 2012). A minták fikocianin tartalmát invazív módszerekkel nem határoztuk meg, a már közölt szakirodalomra támaszkodva. Fő célunk az általunk alkalmazott nem invazív diagnosztikai eljárás megbízhatóságának tesztelése volt. Az adatok validálását sejtszámlálással és a klorofilltartalom szerves oldószeres meghatározásával végeztük (2. függelék a) és b) panel).

A klorózis folyamán bekövetkező, karotinoidokat jellemző elnyelési sáv változása a reflektancia profil mellett a szerves oldószeres pigmentkivonatban is felfedezhető volt (3. függelék ábra). Adataink jó egyezést mutatnak más szakirodalmi adatokkal a nitrátdús, illetve nitrát éheztetett körülmények közt nevelt *Synechocystis* sp. kultúrák klorofill / karotinoid arányaiban tapasztalható különbségek terén (Paliwal és mtsai., 2015).

A szakirodalmi ismeretekkel egybevágó adatokat kaptunk a klorofill *a* / fikocianin arány változásának dinamikájáról (Krasikov és mtsai., 2012), illetve a klorofill *a* változatlan szintjéről a kísérlet alatt alkalmazott, összesen 72 órás nitrát stressz során (Görl és mtsai., 1998).

6.4 *Haematococcus* asztaxantin akkumulációjának elemzése

Az adatsorok konzisztens értékeléséhez az abszorbancia spektrum Q_Y csúcsra történő normálását végeztük el, ezzel kiküszöbölve a modellorganizmus spektrális profiljának torzulását, melynek háttérében a *Haematococcus* sejtek stressz indukált olajtest felhalmozása áll (Solovchenko és mtsai., 2013). Ezek a spektrális torzulások jól megfigyelhetők a Q_Y -ra nem normált spektrumok esetén, ahol a mintákban az összes klorofill *a* tartalom csökkenése ellenére a Q_Y sáv abszorbancia intenzitás növekedése figyelhető meg (4. függelék). A hasonló spektrális eljárásokon alapuló diagnosztikai módszerek alkalmazásánál a karotinoid / klorofill index jó markere a sejt fiziológiai állapotának, ugyanez azonban nem mondható el a pigmentek abszolút mennyiségéről (Solovchenko és mtsai., 2011).

Mind a kinyert teljes reflektancia profilok esetében, mind pedig az asztaxantin specifikus spektrális régiók azonosítása során a szakirodalommal nagy mértékben egybevágó eredményeket kaptunk (Morgado és mtsai., 2024).

A minták vizsgálata során a pigment arányok nem mutattak lineáris korrelációt a szerves oldószeres pigmentkivonatok és az *in vivo* abszorbancia spektrum esetében. Ebben döntő szerepet játszik a *Haematococcus* minták abszorbancia profiljának ellaposodása, melynek hátterében a modellorganizmus sajátos fotoprotektív fiziológiai folyamatai állnak, és ezek hatása a sejtek optikai tulajdonságaira a szakirodalom által ismert tényező (Solovchenko és mtsai., 2011).

7) ÖSSZEGZÉS

I. Kísérletünkben sikeresen bizonyítottuk, hogy a *Synechocystis* sp. és *Chlorella sorokiniana* kultúrák reflektancia profiljából származtatott abszorbanciája és klorofill *a* koncentrációja egyenes arányosságot mutat. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a vizsgált minták pigment-koncentrációja azok reflektancia vizsgálatával nem invazív módon mérhető.

II. Igazoltuk, hogy az egyetlen fajt tartalmazó minták spektrális sajátosságai a 0,5-10 µg/ml klorofill koncentráció tartományban konzisztensen vizsgálhatók, míg a mindkét fajt tartalmazó kevert minták vizsgálata az 1 és 10 µg/ml közötti klorofill koncentráció tartományban megbízható.

III. Eredményeink alapján a két mikroalga kevert kultúráiban a pigmentarányok túlnyomórészt jól követik a résztvevő fajok egymáshoz viszonyított megoszlását, azonban a minták nagyon magas, vagy alacsony koncentrációja ezt befolyásolhatja.

IV. Sikeresen követtük a *Synechocystis* sp PCC6803 modellfaj nitrogén éheztetés indukált klorózisát, és nagy pontossággal karakterizáltuk a fikocianin és klorofill *a* fotoszintetikus pigmentek aránybeli változásait. A meghatározó fotoszintetikus pigmentek dinamizmusa mellett sikeresen azonosítottunk spektrális változásokat a cianobaktérium kultúrák karotinoid régiójában is.

V. Munkánk során sikeresen vizsgáltuk a *Haematococcus pluvialis* mikroalga nitrát éhezés és magas fénysugárzás indukálta karotinogenezisét, mely hozzájárulhat a *Haematococcus* kultúrák nem invazív fiziológiai és fenotípusos állapotfelméréséhez.

Az általunk bemutatott eredmények közvetlen módon megalapozhatják szelektív és specifikus, mikroalga fenotipizálásban felhasználható hiperspektrális indexek, kvalitatív és kvantitatív módszerek kifejlesztését és optimalizálását. Ezzel eredményeink hozzájárulnak új, nem invazív vizsgálati módszerek térnyeréséhez mind a terepi megfigyelés, mind pedig a laboratóriumi, illetve ipari léptékű mikroalga fenotipizálás területein, potenciálisan elősegítve nagyobb áteresztőképességű és kisebb környezeti lábnyomú diagnosztikai eljárások szélesebb körű adaptációját.

8) KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Vass Imre Gyula tudományos tanácsadónak, hogy lehetőséget és helyet biztosít számomra a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növényi Stressz, Lipid és Fenomika Kutatócsoportban, és tanácsadásával segíti munkám előrehaladását.

Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Szabó Milán tudományos főmunkatársnak körültekintő és gondos témavezetői munkájáért és szakmai iránymutatásáért.

Szeretném külön megköszönni Hovári Miklós és Sass László munkatársaimnak, akiknek szakértő segítsége és kreativitása elengedhetetlen volt a kompakt fenotipizáló rendszerrel történő munka, adatkinyerés és adatelemzés során.

Továbbá szeretném megköszönni a Növényi Stressz, Lipid és Fenomika Csoport minden munkatársának, hogy befogadó és barátságos hozzáállásukkal, támogató jelenlétükkel állandó segítséget nyújtottak és nyújtanak munkám során.

9) Felhasznált szakirodalom

- Allen, M. M., & Smith, A. J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archiv Für Mikrobiologie*, 69(2), 114–120. <https://doi.org/10.1007/BF00409755>
- Barlow, A. M., Slepko, A. D., Ridsdale, A., McGinn, P. J., & Stolor, A. (2014). Label-free hyperspectral nonlinear optical microscopy of the biofuel micro-algae *Haematococcus Pluvialis*. *Biomedical Optics Express*, 5(10), 3391. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.003391>
- Barott, K., Smith, J., Dinsdale, E., Hatay, M., Sandin, S., & Rohwer, F. (2009). Hyperspectral and Physiological Analyses of Coral-Algal Interactions. *PLoS ONE*, 4(11), e8043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008043>
- Bharti, R. K., Dhar, D. W., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2018). Assessment of biomass and lipid productivity and biodiesel quality of an indigenous microalga *Chlorella sorokiniana* MIC-G5. *International Journal of Green Energy*, 15(1), 45–52. <https://doi.org/10.1080/15435075.2017.1351368>
- Bonner, C. A., Fischer, R. S., Schmidt, R. R., Miller, P. W., & Jensen, R. A. (1995). Distinctive Enzymes of Aromatic Amino Acid Biosynthesis That Are Highly Conserved in Land Plants Are Also Present in the Chlorophyte Alga *Chlorella sorokiniana*. *Plant and Cell Physiology*, 36(6), 1013–1022. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078843>
- Boussiba, S., & Vonshak, A. (1991). Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* 1. *Plant and Cell Physiology*, 32(7), 1077–1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>
- Che, S., Du, G., Zhong, X., Mo, Z., Wang, Z., & Mao, Y. (2023). Quantification of Photosynthetic Pigments in *Neopyropia yezoensis* Using Hyperspectral Imagery. *Plant Phenomics*, 5, 0012. <https://doi.org/10.34133/plantphenomics.0012>
- Chelebieva, E. S., Dantsyuk, N. V., Chekanov, K. A., Chubchikova, I. N., Drobetskaya, I. V., Minyuk, G. S., Lobakova, E. S., & Solovchenko, A. E. (2018). Identification and Morphological-Physiological Characterization of Astaxanthin Producer Strains of *Haematococcus pluvialis* from the Black Sea Region. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(6), 639–648. <https://doi.org/10.1134/S0003683818060078>
- Doello, S., Klotz, A., Makowka, A., Gutekunst, K., & Forchhammer, K. (2018). A Specific Glycogen Mobilization Strategy Enables Rapid Awakening of Dormant Cyanobacteria from Chlorosis. *Plant Physiology*, 177(2), 594–603. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00297>
- Dustan, P., Chakrabarti, S., & Alling, A. (2000). Mapping and monitoring the health and vitality of coral reefs from satellite: A biospheric approach. *Life support & biosphere science : international journal of earth space*, 7(2), 149–159.
- Fábregas, J., Domínguez, A., Álvarez, D. G., Lamela, T., & Otero, A. (1998). [No title found]. *Biotechnology Letters*, 20(6), 623–626. <https://doi.org/10.1023/A:1005322416796>
- Galarza, J. I., Gimpel, J. A., Rojas, V., Arredondo-Vega, B. O., & Henríquez, V. (2018). Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering. *Algal Research*, 31, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.024>
- Gao, Z., Li, Y., Wu, G., Li, G., Sun, H., Deng, S., Shen, Y., Chen, G., Zhang, R., Meng, C., & Zhang, X. (2015). Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by Salicylic Acid (SA) and Jasmonic Acid (JA). *PLOS ONE*, 10(10), e0140609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140609>
- Görl, M., Sauer, J., Baier, T., & Forchhammer, K. (1998). Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: Adaptation to long-term survival. *Microbiology*, 144(9), 2449–2458. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2449>

- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210–216. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
- Hase, E., Morimura, Y., & Tamiya, H. (1957). Some data on the growth physiology of Chlorella studied by the technique of synchronous culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 69(C). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90482-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90482-4)
- Khan, M. J., Khan, H. S., Yousaf, A., Khurshid, K., & Abbas, A. (2018). Modern Trends in Hyperspectral Image Analysis: A Review. *IEEE Access*, 6. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2018.2812999>
- Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Bioresource Technology*, 288, 121606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>
- Kobayashi, M., Kakizono, T., & Nagai, S. (1993). Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 867–873. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.867-873.1993>
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Sakamoto, Y., & Tsuji, Y. (1997). Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga Haematococcus pluvialis. *Biotechnology Techniques* 11, 657–660 (1997). *Biotechnology Techniques*, 11(9), 657–660. <https://doi.org/10.1023/A:1018455209445>
- Kose, A., Ozen, M. O., Elibol, M., & Oncel, S. S. (2017). Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga Chlorella vulgaris and cyanobacterium Spirulina platensis as a nutritional supplement. 3 *Biotech*, 7(3), 170. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0832-4>
- Kovar, M., Brestic, M., Sytar, O., Barek, V., Hauptvogel, P., & Zivcak, M. (2019). Evaluation of Hyperspectral Reflectance Parameters to Assess the Leaf Water Content in Soybean. *Water*, 11(3), 443. <https://doi.org/10.3390/w11030443>
- Krasikov, V., Aguirre Von Wobeser, E., Dekker, H. L., Huisman, J., & Matthijs, H. C. P. (2012). Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiologia Plantarum*, 145(3), 426–439. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01585.x>
- Le-Feuvre, R., Moraga-Suazo, P., Gonzalez, J., Martin, S. S., Henríquez, V., Donoso, A., & Agurto-Muñoz, C. (2020). Biotechnology applied to Haematococcus pluvialis Fotow: Challenges and prospects for the enhancement of astaxanthin accumulation. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 3831–3852. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02231-z>
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of Haematococcus pluvialis. *Biotechnology Advances*, 29(6), 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., & Hu, Q. (2008). Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology*, 165(17), 1783–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes (o. 350–382). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, H., Bruning, B., Garnett, T., & Berger, B. (2020). Hyperspectral imaging and 3D technologies for plant phenotyping: From satellite to close-range sensing. *Computers and Electronics in Agriculture*, 175, 105621. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105621>
- Liu, J., Chen, L., Wang, J., Qiao, J., & Zhang, W. (2012). Proteomic analysis reveals resistance mechanism against biofuel hexane in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-68>

- Liu, J.-Y., Zeng, L.-H., & Ren, Z.-H. (2021). The application of spectroscopy technology in the monitoring of microalgae cells concentration. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(3), 171–192. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1763380>
- Luimstra, V. M., Schuurmans, J. M., Verschoor, A. M., Hellingwerf, K. J., Huisman, J., & Matthijs, H. C. P. (2018). Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. *Photosynthesis Research*, 138(2), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0561-5>
- Meng, C.-X., Teng, C.-Y., Jiang, P., Qin, S., & Tseng, C.-K. (2005). Cloning and Characterization of β -Carotene Ketolase Gene Promoter in *Haematococcus pluvialis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(4), 270–275. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00033.x>
- Mishra, P., Lohumi, S., Ahmad Khan, H., & Nordon, A. (2020). Close-range hyperspectral imaging of whole plants for digital phenotyping: Recent applications and illumination correction approaches. *Computers and Electronics in Agriculture*, 178, 105780. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105780>
- Morgado, D., Fanesi, A., Martin, T., Tebbani, S., Bernard, O., & Lopes, F. (2024). Non-destructive monitoring of microalgae biofilms. *Bioresource Technology*, 398, 130520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130520>
- Neag, E., Török, A. I., Cadar, O., Băbălău – Fuss, V., & Roman, C. (2019). Enhancing lipid production of *Synechocystis* PCC 6803 for biofuels production, through environmental stress exposure. *Renewable Energy*, 143, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.005>
- Nickelsen, K. (2017). The organism strikes back: Chlorella algae and their impact on photosynthesis research, 1920s–1960s. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 39(2), 9. <https://doi.org/10.1007/s40656-017-0137-2>
- Paliwal, C., Pancha, I., Ghosh, T., Maurya, R., Chokshi, K., Vamsi Bharadwaj, S. V., Ram, S., & Mishra, S. (2015). Selective carotenoid accumulation by varying nutrient media and salinity in *Synechocystis* sp. CCNM 2501. *Bioresource Technology*, 197, 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.122>
- Pembroke, J. T., Balakrishnan, N., & Armshaw, P. (2015). The Potential of the Photoautotroph *Synechocystis* for Metal Bioremediation. In N. Shiomi (Szerk.), *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*. InTech. <https://doi.org/10.5772/60514>
- Plouviez, M., Bhatia, N., Shurygin, B., & Solovchenko, A. (2024). Advanced imaging for microalgal biotechnology. *Algal Research*, 82, 103649. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103649>
- Ritchie, R. J., Sma-Air, S., & Phongphattarawat, S. (2021). Using DMSO for chlorophyll spectroscopy. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2047–2055. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02438-8>
- Rodríguez Lorenzo, F., Placer Lorenzo, M., Herrero Castilla, L., Álvarez Rodríguez, J. A., Iglesias, S., Gómez, S., Fernández Montenegro, J. M., Rueda, E., Díez-Montero, R., Garcia, J., & Gonzalez-Flo, E. (2022). Monitoring PHB production in *Synechocystis* sp. With hyperspectral images. *Water Science and Technology*, 86(1), 211–226. <https://doi.org/10.2166/wst.2022.194>
- Roelfsema, C., Phinn, S., & Dennison, W. (2002). Spatial distribution of benthic microalgae on coral reefs determined by remote sensing. *Coral Reefs*, 21(3), 264–274. <https://doi.org/10.1007/s00338-002-0242-9>
- Salmi, P., Eskelinen, M. A., Leppänen, M. T., & Pölönen, I. (2021). Rapid Quantification of Microalgae Growth with Hyperspectral Camera and Vegetation Indices. *Plants*, 10(2), 341. <https://doi.org/10.3390/plants10020341>
- Schirmer, A., Rude, M. A., Li, X., Popova, E., & del Cardayre, S. B. (2010). Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science*, 329(5991), 559–562. <https://doi.org/10.1126/science.1187936>

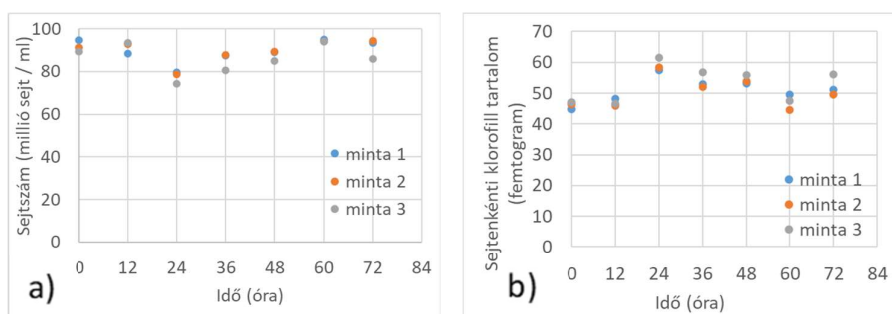
- Solovchenko, A., Aflalo, C., Lukyanov, A., & Boussiba, S. (2013). Nondestructive monitoring of carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* via whole-cell optical density spectra. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4533–4541. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4677-9>
- Solovchenko, A. E., Chivkunova, O. B., & Maslova, I. P. (2011). Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 9–17. <https://doi.org/10.1134/S1021443710061056>
- Swinehart, D. F. (1962). The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*, 39(7), 333. <https://doi.org/10.1021/ed039p333>
- Tate, J. J., Gutierrez-Wing, M. T., Rusch, K. A., & Benton, M. G. (2013). The Effects of Plant Growth Substances and Mixed Cultures on Growth and Metabolite Production of Green Algae *Chlorella* sp.: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 417–428. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9302-8>
- Trautmann, D., Voß, B., Wilde, A., Al-Babili, S., & Hess, W. R. (2012). Microevolution in cyanobacteria: Re-sequencing a motile substrain of *synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, 19(6). <https://doi.org/10.1093/dnares/dss024>
- Volent, Z., Johnsen, G., & Sigernes, F. (2009). Microscopic hyperspectral imaging used as a bio-optical taxonomic tool for micro- and macroalgae. *Applied Optics*, 48(21), 4170. <https://doi.org/10.1364/AO.48.004170>
- Wei, L., Su, K., Zhu, S., Yin, H., Li, Z., Chen, Z., & Li, M. (2017). Identification of microalgae by hyperspectral microscopic imaging system. *Spectroscopy Letters*, 50(1). <https://doi.org/10.1080/00387010.2017.1287094>
- Wen, Z., Liu, Z., Hou, Y., Liu, C., Gao, F., Zheng, Y., & Chen, F. (2015). Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 78, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2015.06.010>
- Wu, P., Hu, T., Sun, L., & Fan, J. (2023). Efficient degradation of sulfadiazine by photosynthetic cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 coupling with recombinant laccase strategy. *Chemical Engineering Journal*, 474, 145974. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145974>
- Zarco-Tejada, P. J., Miller, J. R., Morales, A., Berjón, A., & Agüera, J. (2004). Hyperspectral indices and model simulation for chlorophyll estimation in open-canopy tree crops. *Remote Sensing of Environment*, 90(4), 463–476. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2004.01.017>

10) Függelék

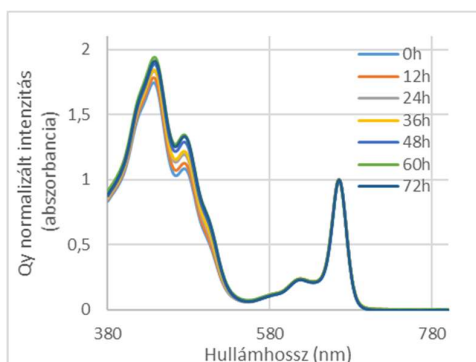
a) ANOVA <i>Chlorella sorokiniana</i>						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,072449	4	0,018112	1,985868	0,14847	3,055568
Within Groups	0,136809	15	0,009121			
Total	0,209259	19				

b) ANOVA <i>Synechocystis</i> sp.						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,009372	4	0,002343	0,267553	0,894253	3,055568
Within Groups	0,131354	15	0,008757			
Total	0,140725	19				

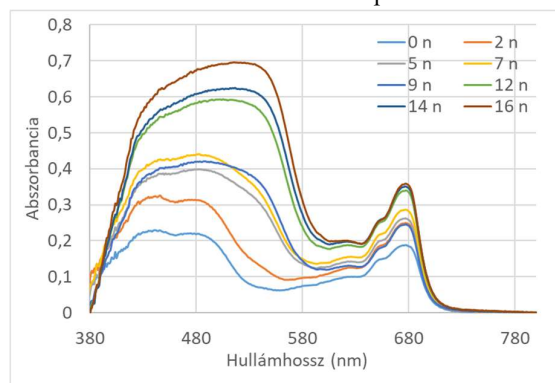
1. függelék: *Chlorella sorokiniana* (a panel) illetve *Synechocystis* sp. (b panel) pigmentarányainak egyszempontos variancia analízise. A p-érték szignifikanciahatár alatti



2. függelék: Nitrát éheztetett *Synechocystis* sp. minták sejtszáma (a panel) és sejtenkénti klorofill mennyisége (b panel) a nitrát éheztesítés órában megadott időhosszának függvényeként ábrázolva.



3. függelék: A nitrát éheztetett *Synechocystis* sp. kultúrák szerves oldószeres pigment kivonatainak 665,5 nm-re normalizált abszorbancia spektruma



4. függelék: Karotinoid felhalmozódást ábrázoló, 800 nm-es intenzitásra normált abszorbancia spektrum sorozat. A számjelzések a nitrát éheztesítés napokban megadott időtartamát jelölik. Megfigyelhető a Q_y sáv intenzitás növekedése olyan mintákban, melyekben a klorofill *a* mennyisége nem növekedett a kísérlet folyamán.