

*XXXI. OTDK Biológia Szekció*

# **Szikes vízi téli pikoplankton tömegprodukció taxonómiai elemzése 18S rRNS gén alapján**

*TDK dolgozat*

készítette:

**Mentes Anikó**

Biológus MSc, 1. évfolyam

témavezető:

Felföldi Tamás PhD, adjunktus  
Mikrobiológiai Tanszék

**EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET**



Budapest, 2012.

## **TARTALOMJEGYZÉK**

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. BEVEZETŐ.....</b>                                                     | <b>3</b>  |
| 1.1. <i>A szikes tavaink világa.....</i>                                    | <i>3</i>  |
| 1.2. <i>A fotoautotróf pikoplankton.....</i>                                | <i>5</i>  |
| 1.3 <i>A pikoalgák azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel .....</i> | <i>6</i>  |
| <b>2. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>                                                 | <b>9</b>  |
| <b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>                                            | <b>10</b> |
| 3.1. <i>Helyszíni adatok .....</i>                                          | <i>10</i> |
| 3.2. <i>A DNS kivonása .....</i>                                            | <i>10</i> |
| 3.3. <i>A 18S rDNS felszaporítása polimeráz láncreakcióval .....</i>        | <i>11</i> |
| 3.4. <i>Klónozás és a klónok csoportosítása .....</i>                       | <i>11</i> |
| 3.5. <i>Szekvenálás és adatelemzés .....</i>                                | <i>12</i> |
| <b>4. EREDMÉNYEK .....</b>                                                  | <b>13</b> |
| <b>5. DISZKUSSZIÓ.....</b>                                                  | <b>16</b> |
| <b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>                                               | <b>18</b> |
| <b>7. SUMMARY .....</b>                                                     | <b>19</b> |
| <b>8. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS .....</b>                                        | <b>20</b> |
| <b>9. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>                                              | <b>21</b> |
| <b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>                                        | <b>25</b> |

## **1. BEVEZETŐ**

### **1.1. A szikes tavaink világa**

A sós tavak a Föld minden kontinensén megtalálhatóak: Európában, Észak- és Közép-Amerikában, Dél-Afrikában, Ausztráliában és Ázsia egyes területein is (Grant, 1992). Speciális csoportjukat alkotják a szikes tavak, amelyek elkülönülnek a közönséges sós tavaktól a meghatározó kémiai tulajdonságaik miatt.

Magyarország a szikes vizekben leggazdagabb terület Európában (Vörös és mtsai, 2009). Hazánkban két nagy kiterjedésű szikes tó van, a Velencei- és a Fertő tó, viszont a szikes vízterekbe az Alföldön található sekély, esetenként időszakos állóvizek is beletartoznak (Boros, 2002; Boros és Vörös, 2010). Éppen ezért a „tó” megnevezés hibás, tudományos értelemben az Alföldön található szikes tavainkat nem lehet valódi tavaknak tekinteni, mert a vízmélység és a környezeti jellemzők alapján nem különíthető el a parti (litorális) öv és a nyílt vízi (pelágikus) tájék (Boros, 2002).

A magyarországi szikes tavak lúgos kémhatású (alkalikus), sekély, kontinentális állóvizek, amelyekre a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  és  $\text{CO}_3^{2-}$  ionok dominanciája és az alacsony sótartalom (hiposzalin) jellemző. Azonban, e domináns ionok mellett, a többi kémiai vegyület és azok mennyisége területenként eltérhet, továbbá az év során nagymértékben változhat a szikes tavak só tartalma és ionösszetétele. (Boros és Vörös, 2010)

A szikes tavakban található sziksó vagy természetes szóda (nátrium-karbonát,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) az időszakos kiszáradáskor fehér anyagként csapódik ki a felszínen. Hazánkban a szódát sziksógyárakban hasznosították, továbbá a szikes víz és iszapja gyógyhatása miatt is ismeretes. (Vörös és mtsai, 2009)

Kialakulásuk és eltűnésük közettani, éghajlati, vízföldtani és antropológiai hatások sajátos egymásra hatásának köszönhető (Grant, 1992; Boros, 2002; Sümegi és Szilágyi, 2010), ahol szerepet kaphat a vulkáni működés, tektonikus mozgás és a szél-folyó medencealakító hatása (Duckworth és mtsai, 1996). A szikes tó létrejöttének kritériumai az állandó só forrás, lefolyástalan meder, vízzáró réteg és a kontinentális éghajlat. A só felhalmozódást a lefolyás hiánya és az intenzív párolgás eredményezi (Boros, 2002).

A Duna-Tisza közí fehér vizű szikes tavak nagyon különlegesnek számítanak (hidrológiai és algológiai szempontból is, Somogyi és mtsai, 2009a), ezért *ex lege* védettek. A természetvédelmük érdekében megalkotott 1996. évi LIII. törvényben a róluk szóló definíció

a következő: „A szikes tó olyan természetes vagy természetközeli vizes élőhely, amelynek medrét tartósan vagy időszakosan legalább 600 mg/liter nátrium kation dominanciájú oldott ásványi anyag tartalmú felszíni víz borítja, illetve a területén sziki életközösségek találhatók.” (Boros és Vörös, 2010)

Szikes tavaink limnológiai karakterisztikuma a rendkívül magas szerves anyag tartalom (58-154 mg/l között változik, ehhez képest a Kis-Balaton vize ritkán haladja meg a 20mg/l-t), amelynek ökológiai következménye még nem ismert. (Vörös és mtsai, 2005)

A szikes tavakat többféleképpen is lehet csoportosítani. Korábban a magyarországi szikes vizeket alapkőzet szerint sorolták több altípusba: az első a mészben szegény Tiszántúli szikes tavak, a második a meszes-lúgos Duna-Tisza közti szikes tavak, valamint Bodrog-Zagyva-Tisza és Dunántúl szikes tavai, amelyek napjainkra már eltűntek. (Vörös és mtsai 2009)

Boros és Vörös (2010) az általuk vizsgált szikes vizek esetében alábbi csoportokat határozták meg a domináns ionok és azok aránya alapján: a szikes alaptípust ( $\text{Na}^+$ ;  $\text{HCO}_3^-$ ), és két altípusát ennek ( $\text{Na}^+$ ;  $\text{HCO}_3^- > \text{Cl}^-$  és  $\text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+}$ ;  $\text{SO}_4^{2-} > \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^-$ ).

**1. ábra:** A Zab-szék (Vörös és Boros, 2011)



A szikes vizek színük alapján két csoportba oszthatóak. Az egyik az ún. „fehér szikes vizek”, amelyekre nagymértékű turbiditás és az aljzaton való piszkosfehér színű karbonát-mészszipa felhalmozódás jellemző (Boros, 2002). A fehér vizű szikes tavak zavarossága (turbiditása) magyarázható a nagyobb méretükkel és a tómedret övező, szélvédő, sűrű mocsári

növényzet hiányával, mivel ebben az esetben a szél hatása jobban érvényesül (Vörös és mtsai, 2005). A másik az ún. „fekete tavak”, amelyek tulajdonképpen a fehér szikes víz feltöltődésével, iszaposodásával jön létre. Ezeknek a sárgásbarna színét a lúgos kémhatásra feloldódott, lebegő szerves anyagok okozzák (Boros, 2002).

Az általam vizsgált minta a Zab-szék vizéből (1. ábra) származik, amely a fehér vizű szikes tavak csoportjába tartozik. (Vörös és mtsai, 2005)

## **1.2. A fotoautotróf pikoplankton**

A fotoautotróf pikoplankton (APP) alatt olyan vízben lebegő élőlényeket értünk, amelyeknek mérete hagyományosan 0,2-től 2  $\mu\text{m}$ -ig terjed (Sieburth és mtsai. 1978), energiájukat fényt hasznosítva szerzik, és anyagcseréjük során képesek a szén-dioxidból szerves szénvegyületek előállítására. Egyes szerzők értelmezésében a pikoalgák átmérőjének felső mérethatára kitolódik 3  $\mu\text{m}$ -re (Stockner és Antia 1986; Vörös 1991; Malinsky-Rushansky és mtsai, 1995).

A pikoalgák számos tulajdonsága összefügg a testméretükkel. A kedvező felület-térfogat arányuk miatt jobb fényhasznosítási képességgel rendelkeznek, mint a nagyobb méretű algák. A pikoalgák sejtfenntartására kevesebb energia szükséges, ezért több energia jut a szaporodásukra. A kis méretük miatt nagyobb hatásfokkal képesek felvenni a tápanyagokat, és az eufotikus zónából is kevesebb eséllyel ülepednek ki (Raven, 1998). A szikes tavainkra különlegesen alacsony, néhány centiméteres eufotikus mélység jellemző, amelyre a világon kevés példa van. Valószínűsíthető, hogy a szikes tavainkban levő magas turbiditás okozta fényhiány kompetitív előnyt jelent a pikoalgák számára a fent említett előnyös tulajdonságaik miatt (Vörös és mtsai, 2005).

A fotoautotróf pikoalgák meghatározó szerepet töltenek be Magyarország sekély szikes tavai életében. A baktérium méretű algákra először 1991-ben Schmidt hívta fel a figyelmet, majd az első ízben tájékozódó jelleggel vizsgált hét víztér mindegyikében találtak APP-t. (Vörös és mtsai, 2005)

A szikes tavaink sok esetben extrémén hipertrófak, amely azt jelenti, hogy bőséges szerves anyag termelés jellemző rájuk, ahol a piko-méretű algák teszik ki fitoplankton lényeges, sőt akár teljes részét. Ezzel megcáfolják azt az általános jelenséget, amely szerint a

trofitás növekedése esetében a pikoalgák részesedése csökken a fitoplankton tömegéből és termeléséből. (Vörös és mtsai, 2005)

A mérsékelt éghajlati övben a fotoautotróf pikoplankton sajátos szezonális dinamikát mutat: a melegebb időszakban a cianobaktériumok, a hidegebb időszakban a pikoeukarióta algák jelennek meg jelentős számban. (Mózes és mtsai, 2006; Somogyi és mtsai, 2009a; 2009b)

Az alacsonyabb hőmérséklet és fényhiányos viszonyok miatt a befagyott tavakban a fizikai, kémiai és biológiai folyamatok lényegesen lassabbak, ezért a nyári időszaktól eltérő algaközösség alakul ki bennük. Tehát, a hőmérséklet és a szalinitás is döntően meghatározza a pikoalga genotípusok mennyiségi viszonyait. (Somogyi és mtsai, 2009a; Felföldi és mtsai, 2010b)

Somogyi és munkatársai (2009) a pikoeukarióták téli dominanciájára keresték a választ, úgy, hogy a pikoeukarióták és a pikocianobaktériumok fotoszintézisének hőmérséklet és fényfüggését vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy 15°C-os hőmérséklet alatt a pikoeukarióta törzs fotoszintetikus aktivitása nagyobb és a fényhasznosítása is jobb volt a pikocianobaktérium törzshöz képest, így a pikoeukarióta algák számára ezen tulajdonságuk előnyt biztosít a téli, hidegebb időszakban. (Somogyi és mtsai, 2009b)

### **1.3 A pikoalgák azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel**

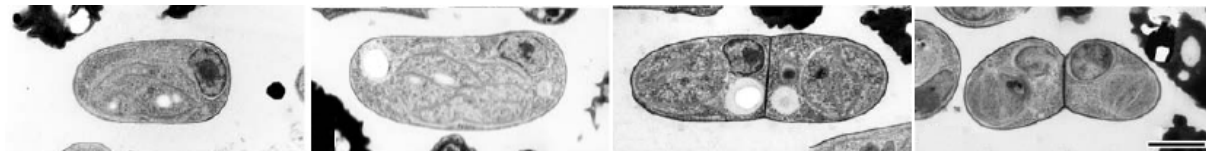
Kezdetben az APP mennyiségi, minőségi viszonyait és szerepüket tanulmányozták a vizes élőhelyek anyagforgalmában, továbbá azok szezonális dinamikáját vizsgálták. Napjainkra a taxonómiai-filogenetikai kutatások kerültek előtérbe. (Callieri, 2007)

A pikoalgák azonosítása kis méretüknek és az alaktani változatosság hiányának köszönhetően néhány esetben problémákkal jár (Henley és mtsai, 2004). Az epifluoreszcens mikroszkóppal és áramlási citometriával meg lehet számlálni a pikoalgákat, de ezekkel a módszerekkel csak három fő csoport különíthető el a sejtekben megtalálható pigmenteknek megfelelően: fikoeritrin- és fikocianin-pigment-dominanciájú pikocianobaktériumok, ill. pikoeukarióta algák (MacIsaac és Stockner, 1993).

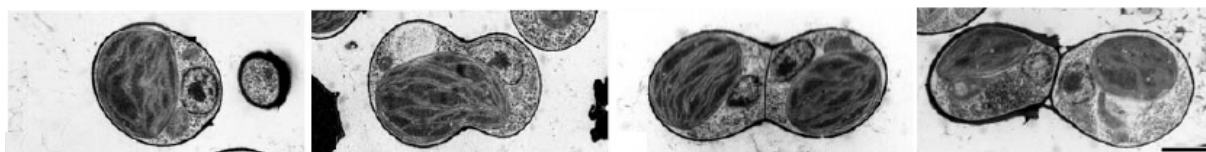
A pikoalgákat a korábbi klasszikus izolálási technikákkal, morfológiai és ultrastrukturális tulajdonságaik, pl. a sejtek mérete, alakja, sejtosztódás típusa (kettéosztódás, bimbózás, autosporuláció; 2.-3.-4. ábra), sejtek belső és sejtfal szerkezete, egyes alkotórészek

vagy enzimek jelenléte vagy hiánya alapján próbálták rendszerezni. (Henley és mtsai, 2004; Somogyi és mtsai, 2009a; Felföldi és mtsai, 2010b)

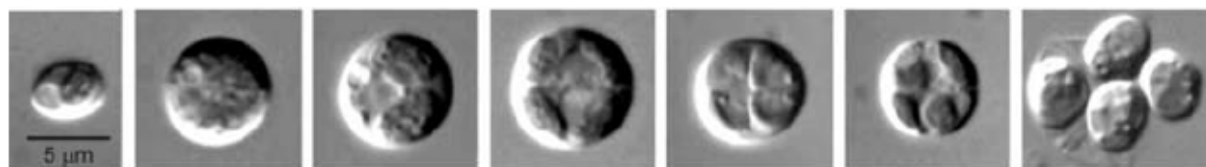
**2. ábra:** A *Nannochloris bacillaris* zöldalga kettéosztódása (Yamamoto és mtsai, 2007)



**3. ábra:** A *Marvania geminata* zöldalga bimbózása (Yamamoto és mtsai, 2007)



**4. ábra:** A *Chlorella vulgaris* zöldalga autosporulációja (Yamamoto és mtsai, 2004)



A technika fejlődésével a molekuláris filogenetikai módszerek (DNS szakaszok összehasonlító bázisrend elemzése) alkalmazása bebizonyította, hogy több taxonómiai kategória nem állja meg a helyét a morfológiai bélyegek osztályozása alapján. A klasszikus rendszerezés nem veszi azt figyelembe például, hogy számos alaktani jellemző környezeti hatás miatt alakul ki. (Felföldi és mtsai, 2010b)

A nagyon egyszerű felépítésű, többnyire gömb alakú pikoeukarióta algákat morfológiai alapon két csoportba, a *Nannochloris* és *Chlorella* nemzetségbe sorolták be. A molekuláris filogenetikai elemzéseknek köszönhetően kiderült, hogy ezen csoportosítás polifiletikus, ezért nem állja meg a helyét. (Felföldi és mtsai, 2010b)

A mikroszkopikus méretű eukarióták nukleinsav alapú azonosításánál közösségi minták esetében alkalmazhatnak denaturáló gradiens gélelektroforézist (DGGE), kvantitatív (real time) PCR-t, 'dot blot' és fluoreszcens *in situ* hibridizációt, továbbá klónozást és a klónok összehasonlító bázisrend elemzését is. (Felföldi és mtsai, 2010b)

A pikoeukarióta algák rendszerezése leggyakrabban molekuláris genetikai módszerek segítségével, a 18S rDNS (riboszómális RNS kis alegységét kódoló gén) szekvencia alapján történik, amelyeket kiegészíthetik más gének vizsgálatával pl. az ITS (riboszómális RNS

gének közötti nem kódoló régió), a *rbcL* (a RuBisCO nagy alegységét kódoló gén), és a *psbA* (a II-es fotorendszer D1 fehérjéje) szekvenciájával. (Somogyi és mtsai, 2009a; Felföldi és mtsai 2010a)

Az elmúlt években a molekuláris biológiai kutatások segítségével tengerekben és óceánokban idáig *Chlorophyta*, *Cryptophyta*, *Haptophyta* és *Heterokontophyta* törzsek pikoalga képviselőit sikerült leírni, azonban az édesvizekben ill. sós tavakban levő pikoeukarióta csoportok tagjairól még mindig keveset tudunk (Callieri, 2008; Somogyi és mtsai, 2012). A molekuláris biológiai elemzések lévén már számos értékes információ látott napvilágot, de a nukleinsav szekvencia adatbázisok még nem teljesek, továbbá nem állnak mindig rendelkezésre megfelelő specifikitású módszerek (Vaulot és mtsai, 2008; Felföldi és mtsai, 2010b).

## **2. CÉLKITÚZÉSEK**

A magyarországi szikes vizek kutatása nagy múltra tekint vissza e területek természeti értékeinek és adottságainak köszönhetően, de nem lehet lezártnak tekinteni a kutatásokat, mert a vizsgálatok folyamatosan új taxonokat mutatnak ki.

A pikoalgák körében a szezonális dinamika minden mérsékelt övi tóban megfigyelhető, azonban már 2006-ban regisztrálták a kiskunsági szikes vizekben az irodalomban közölt legnagyobb pikofitoplankton sejtszámokat, a pikoeukarióták ( $1,08 \cdot 10^8$  sejt/mL a szabadszállási Bűdös-székben, Somogyi és mtsai. 2009b) és a pikocianobaktériumok esetében is ( $1,03 \cdot 10^8$  sejt/mL a Zab-székben, Vörös és mtsai. 2005).

2012. februárban Zab-székben regisztrált téli algavirágzás mértéke az eddigi rekordok között van.

A kutatás során arra voltunk kíváncsiak, hogy ezt a szokatlanul nagymértékű pikoeukarióta alga tömegprodukción milyen fajok okozhatták, és vajon új taxonok felelősek-e a rendkívüli jelenség kialakulásáért.

### **3. ANYAG ÉS MÓDSZER**

#### **3.1. Helyszíni adatok**

A mintavétel 2012. február 15-én történt (46°50'11,4"É 19°10'17,0"K). A víz hőmérséklete -0,5 Celsius fok, pH-ja 9,58, a fajlagos elektromos vezetőképessége 8900 $\mu$ S/cm, és az oxigén tartalma 19,1 mg/l (129%) volt. A befagyott jég 6 cm-es vastagságú volt, amelyet még 11 cm-es hótakaró fedett be. Alatta zöld színű volt a víz, akár egy sűrű algatenyészet (5. ábra). A mintavételt és a fizikokémiai vizsgálatokat Vörös Lajos és munkatársai végezték (MTA Balatoni Limnológiai Intézet).

**5. ábra:** Zab-széki zöldalga virágzás februárban (Vörös Lajos felvétele)



#### **3.2. A DNS kivonása**

A teljes plankton genomiális DNS koncentrált vízmintából az UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) segítségével lett kivonva a gyártó utasításai szerint, azzal a kivétellel, hogy a sejtfeltárás lépés 30 Hz-en, 2 percig tartó rázatással történt egy MM301 típusú sejtmalom (Retsch, Haan, Germany) alkalmazásával.

### 3.3. A 18S rDNS felszaporítása polimeráz láncreakcióval

A 18S rDNS gén megközelítőleg 1100 bázispár (bp) hosszúságú fragmenseit PCR segítségével enzimatikusan felszaporosítottam (amplifikáltam). Az alkalmazott reagenseket az 1. táblázat és a primereket ill. a reakció paramétereit a 2. táblázat tartalmazza. Az amplitonok méretének és mennyiségének ellenőrzése elektroforézissel történt (20 perc, 100 V-on TBE pufferben). Az általam használt 1 (m/V)%-os agaróz gélben a GR Safe DNS festékkel (Innovita) megfestett DNS-t áteső UV fényben detektáltam. A klónozást és a bázissorrend elemzéseket megelőzően a PCR termékeket EZ-10 Spin Column PCR Product Purification Kit (Bio Basic) segítségével tisztítottam meg a gyártó leírását követve.

**1. Táblázat:** Alkalmazott PCR-ek összetétele (50µL reakció-térfogat esetén)

| <i>menyiség</i> | <i>adalékanyag</i>                                                                                          |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 27              | dH <sub>2</sub> O                                                                                           |
| 10              | dNTP (1mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Fermentas)                                                               |
| 5               | Taq puffer (750mM Tris-HCl, 200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1% Tween 20, Fermentas) |
| 4               | µL MgCl <sub>2</sub> (25mM, Fermentas)                                                                      |
| 2               | Taq polimeráz (1U/µL, Fermentas)                                                                            |
| 0,5             | primerek (3,25*10 <sup>-8</sup> mM, Integrated DNA Technologies)                                            |
| 1               | templát DNS                                                                                                 |

**2. Táblázat:** Az alkalmazott PCR primerek és jellemzőik

| <i>primer neve</i> | <i>referencia</i>                            | <i>primer bázissorrendje 5'-3'</i> | <i>PCR specifitás</i> | <i>hőprofil</i>                                                                    |
|--------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Euk328f            | Moon-van der Staay és mtsai (2000)           | ACC TGG TTG ATC CTG CCA G          | Chlorophyta           | 95 °C 2 perc, 32 ciklus (94 °C 45 mp, 55 °C 1 perc, 72 °C 1,5 perc), 72 °C 10 perc |
| Chlo02r            | Zhu és mtsai (2005)                          | CTT CGA GCC CCC AAC TTT C          |                       |                                                                                    |
| M13F               | Sambrook és Russell (2001)                   | GTA AAA CGA CGG CCA GT             | klónozó vektor        | 95 °C 3 perc, 32 ciklus (95 °C 30 mp, 52 °C 30 mp, 72 °C 1 perc), 72 °C 10 perc    |
| M13R               | Sambrook és Russell (2001) alapján módosítva | GGA AAC AGC TAT GAC CAT G          |                       |                                                                                    |

### 3.4. Klónozás és a klónok csoportosítása

A klónkönyvtár készítést a kék-fehér szelekción alapuló pGEM-T Easy Vektor System-mel (Promega) végeztem el a gyártó utasításait követve. A klónok csoportosítása

esetében a DNS amplifikációja két lépésben, először M13-as primerekkel, majd Euk328f-Chlo02r primerekkel történt. Az így kapott DNS fragmenteken restrikciós emésztést végeztem: a 3. táblázatban található anyagok keverékét inkubáltam 3 órán keresztül, 37 °C-on. Ezt 80 perces elektroforézis követte 80V-on, TBE pufferben, 2 (m/V)%-os agaróz gélben. A klónok azonos restrikciós mintázatú genotípusainak kiválasztása a *Csp6I* és a *Hin6I* endonukleázok segítségével történt (Fermentas).

**3. Táblázat:** Restrikciós emésztés összetétele

| <u><i>mennyiség</i></u> |    | <u><i>adalékanyag</i></u> |
|-------------------------|----|---------------------------|
| 9,7                     | μL | DEPC kezelt víz           |
| 2                       |    | puffer                    |
| 0,3                     |    | enzim                     |
| 8                       |    | PCR termék                |

### 3.5. Szekvenálás és adatelemzés

A szekvenáló reakciót és a kapilláris elektroforézist a Biomi Kft (Gödöllő, Magyarország) és a LGC Genomics végezte (Berlin, Németország).

A kromatogramokon a Chromas program (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Ausztrália) segítségével az automatikus leolvasás hibáit manuálisan korrigáltam, a vektor és a primerek szekvenciáit eltávolítottam. A szekvenciákat a BLAST programmal (Altschul és mtsai. 1997) és a GenBank DNS-adatbázissal hasonlítottam össze. A filogenetikai analízist a MEGA 5 szoftverrel és a Silva adatbázis segítségével végeztem el (Tamura és mtsai, 2011).

#### **4. EREDMÉNYEK**

A Zab-széki szikes vízből származó mintát a 18S rDNS alapján dolgoztam fel. A klónozás 90 klónt eredményezett. A klónokat első körben Euk328f és Chlo02r primeres PCR-rel próbáltam felszaporítani, amely gyakran nem eredményezett termékeket. A vektor-specifikus M13F és M13R primerekkel eljárva szinte minden esetben sikeres volt az amplifikálás. Az amplifikált klónokon elvégzett gélelektroforézis három különböző méretű DNS-t mutatott. Ezt újból Euk328F és Chlo02R primerekkel történő amplifikálás követte. A klónokat restrikciós emésztéssel csoportosítottam. Az restrikciós emésztések eredménye nagyon sokféle és változatos csoportok jelenlétét sugallta, hiszen 90 klónból összesen 37-féle klóncsoportot lehetett megállapítani. A 37-féle klón nukleotid sorrendjét meghatároztam. A szekvenálás eredményeit a GenBank adatbázissal összevetve a 4. táblázat szemlélteti.

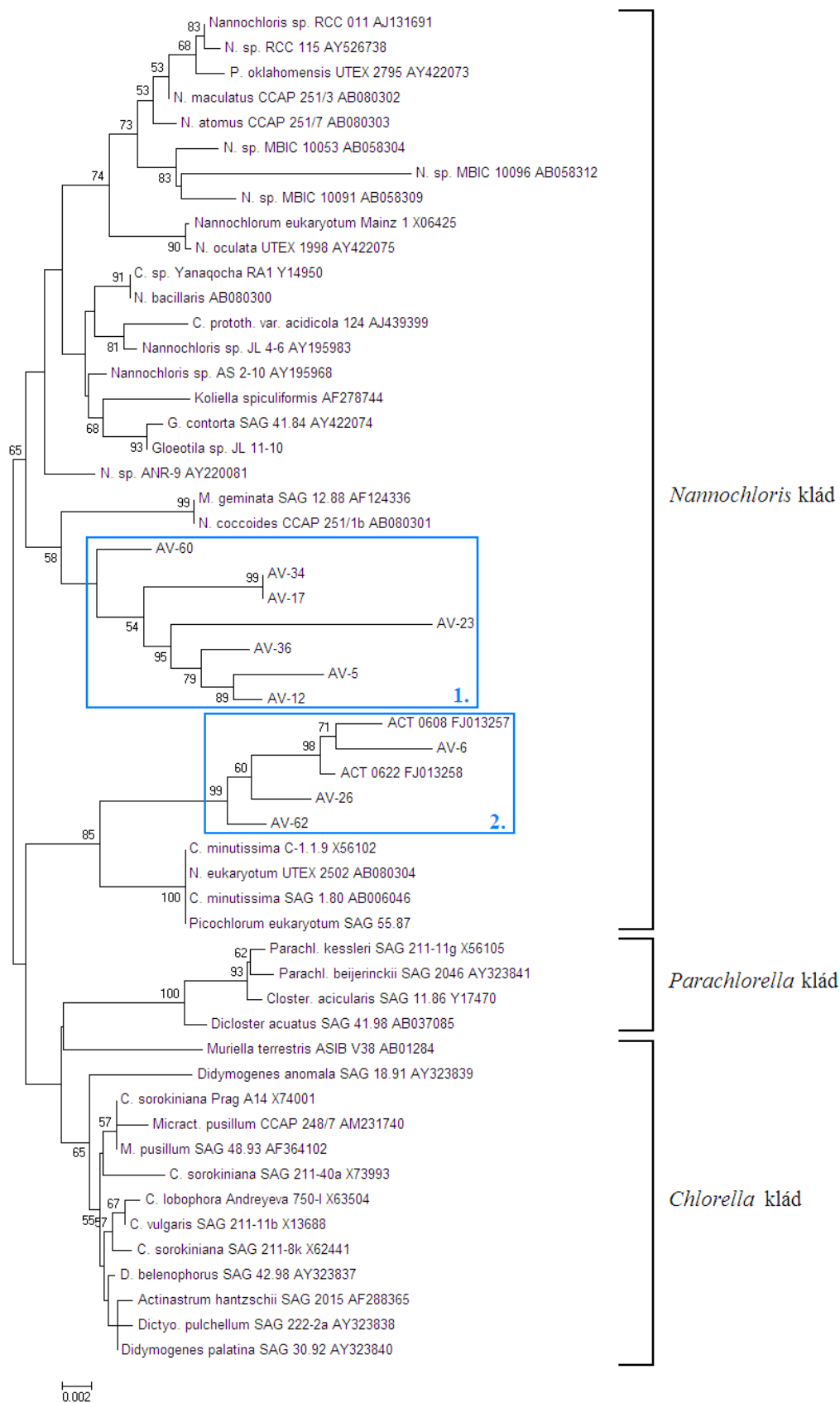
A szekvenálási eredmények jelentős számú, nem APP taxonokat is (az összes klónhoz képest 74,12 %) kimutatattak, amelyek alacsony hasonlósági értékeket mutattak főként a *Cercozoa* törzsbe tartozó heterotróf eukariótákkal. Azonban, csak a *Trebouxiophyceae* osztály (*Chlorophyta*) képviselőivel legnagyobb páronkénti hasonlóság értékeket mutatott szekvenciákkal végeztem részletes elemzéseket. A 4. táblázatban zöldalga szekvenciát tartalmazó klóncsoportok kék színnel, ezen belül a manuálisan ellenőrzés után kapott megfelelő szekvenciák hasonlósági százaléka zölddel, a nem megfelelők sárgával vannak jelölve. Az AV-51-es szekvencia túl rövid volt az azonosításhoz. Az AV-59 és AV-84-es klónok kiméra szekvenciákat tartalmaztak, ezért ezeket a fához nem használtam. A zöldalga szekvenciák átlagos hossza 976,4 bp. A klóncsoportok eloszlása nagyjából egyenletes, nincsen egyértelmű dominancia közöttük.

A feldolgozott zöldalga szekvenciákat a filogenetikai elemzés alapján két csoportba lehetett sorolni (6. ábra). Az első csoport az AV-5, AV-12, AV-17, AV-23, AV-34, AV-36 és AV-60 klónokat tartalmazza, amelyek a *Marvania geminata* SAG 12.88-cal (96,67-98,15 %) és a *Nannochloris* sp. AS 2-10-zel mutatják a legnagyobb hasonlóságot (97,42-98,11 %). A második csoport az AV-6, AV-26, AV-62 klónokat foglalja magába, és ezek a *Chloroparva pannonicával* (ACT 0608, ACT 0622) állnak a legközelebbi rokonságban (97,28-97,92 %). A vizsgált pikoeukarióta taxonokat, a 18S rRNS gén 97,6 % alatti páros hasonlóság érték esetében már elfogadják új nemzetséggént (Somogyi és mtsai, 2011).

**4. Táblázat:** A klón DNS-ek szekvenálási eredményei

| <i>klón kódja</i> | <i>klóncsoport aránya (%)</i> | <i>hossz (bp)</i> | <i>legközelebbi találat</i>                    | <i>GenBank azonosító</i> | <i>egyezés (%)</i> |
|-------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| AV-1              | 1,18                          | 749               | NT <i>Cercozoa</i> klón                        | AY620333.1               | 89,42              |
| AV-2              | 3,53                          | 844               | <i>Eudiaptomus graciloides</i>                 | GU067947.1               | 99,72              |
| AV-3              | 2,35                          | 937               | <i>Cercozoa</i> sp. ATCC 50530                 | HQ121439.1               | 92,58              |
| AV-4              | 1,18                          | 966               | <i>Pirsonia diadema</i>                        | AJ561114.1               | 93,14              |
| AV-5              | 2,35                          | 955               | <b><i>Picochlorum eukaryotum</i> SAG 55.87</b> | JX235962.1               | 97,18              |
| AV-6              | 1,18                          | 955               | <b><i>Picochlorum eukaryotum</i> SAG 55.87</b> | JX235962.1               | 97,28              |
| AV-7              | 2,35                          | 820               | <i>Cercozoa</i> sp. ATCC 50530                 | HQ121439.1               | 90,6               |
| AV-9              | 1,18                          | 853               | <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1          | CP000555.1               | 81,91              |
| AV-12             | 2,35                          | 954               | <b><i>Nannochloris</i> sp. AS 2-10</b>         | AY195968.1               | 97,7               |
| AV-13             | 1,18                          | 497               | <i>Vampyrella pendula</i>                      | HE609041.1               | 86,52              |
| AV-16             | 1,18                          | 567               | <i>Marsupiomonas pelliculata</i>               | JN592593.1               | 98,94              |
| AV-17             | 1,18                          | 954               | <b><i>Gloeotila</i> sp. JL11-10</b>            | AY195976.1               | 98,11              |
| AV-18             | 1,18                          | 765               | <i>Massisteria marina</i>                      | AF174370.1               | 89                 |
| AV-23             | 2,35                          | 1025              | <b><i>Nannochloris</i> sp. AS 2-10</b>         | AY195968.1               | 96,67              |
| AV-24             | 1,18                          | 1033              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                  | AP012280.1               | 79,23              |
| AV-26             | 3,53                          | 978               | <b><i>Chlorella minutissima</i></b>            | AB006046.1               | 97,42              |
| AV-27             | 3,53                          | 1013              | NT <i>Cercozoa</i> klón                        | AY620333.1               | 91,57              |
| AV-28             | 3,53                          | 557               | NT <i>Choanoflagellata</i>                     | JN825671.1               | 92,39              |
| AV-29             | 31,76                         | 968               | NT <i>Cercozoa</i> lb9                         | EU567287.1               | 92,79              |
| AV-33             | 1,18                          | 1013              | n. a.                                          | n. a.                    | n. a.              |
| AV-34             | 1,18                          | 972               | <b><i>Gloeotila</i> sp. JL11-10</b>            | AY195976.1               | 98,15              |
| AV-36             | 2,35                          | 979               | <b><i>Nannochloris</i> sp. AS 2-10</b>         | AY195968.1               | 98,03              |
| AV-40             | 4,71                          | 1002              | NT <i>Metazoa</i> klón                         | FJ410784.1               | 92,27              |
| AV-42             | 1,18                          | 985               | <i>Cercomonadida</i> KM klón                   | EU647174.1               | 90,71              |
| AV-44             | 1,18                          | 995               | <i>Cercozoa</i> sp. ATCC 50530                 | HQ121439.1               | 92,47              |
| AV-46             | 1,18                          | 1010              | <i>Pirsonia diadema</i>                        | AJ561114.1               | 94,63              |
| AV-50             | 2,35                          | 971               | <i>Choanoflagellida</i> sp. SL163 klón D10     | EF432541.1               | 93,35              |
| AV-51             | 1,18                          | 609               | <b><i>Picochlorum eukaryotum</i> SAG 55.87</b> | JX235962.1               | 98,67              |
| AV-53             | 1,18                          | 998               | <i>Eimeriidae</i> KM klón                      | EF023584.1               | 88,91              |
| AV-56             | 1,18                          | 978               | NT <i>Cercozoa</i> lb6                         | EU567286.1               | 98,23              |
| AV-59             | 2,35                          | 956               | <b><i>Nannochloris</i> sp. ANR-9</b>           | AY220081.1               | 90,32              |
| AV-60             | 2,35                          | 1022              | <b><i>Marvania geminata</i></b>                | AF124336.1               | 98,75              |
| AV-62             | 2,35                          | 970               | <b><i>Chlorella minutissima</i></b>            | AB006046.1               | 97,92              |
| AV-66             | 2,35                          | 999               | NT <i>Banisveld</i> eukarióta klón             | EU091848.1               | 91,61              |
| AV-80             | 1,18                          | 993               | NT tengeri eukarióta klón                      | DQ310339.2               | 87,16              |
| AV-84             | 1,18                          | 972               | <b><i>Chlorella sorokiniana</i></b>            | X74001.1                 | 91,68              |
| AV-87             | 1,18                          | 976               | NT <i>Cercozoa</i> klón                        | AY620333.1               | 89,26              |

**6. ábra:** A zöldalga szekvenciák filogenetikai elemzése maximum likelihood módszerrel, bootstrap analízissel ellenőrizve (az 50 % feletti értékek feltüntetésével)



## 5. DISZKUSSZIÓ

A legközelebbi rokonként megállapított zöldalga fajokra mind jellemző az egy nukleusz, egy mitokondrium, egyik oldalt elhelyezkedő kloroplasztisz általában pyrenoid nélkül, és keményítőszemcsék néhai előfordulása a sejtben. A kloroplasztisz tartalmaz klorofill-a-t, klorofill-b-t, és egyéb pigmenteket, amelyek csoportonként eltérhetnek (luteint, violaxanthint, neoxanthint és  $\beta$ -karotint, stb). Nincsen ostoruk. A zöld, gömb vagy ovális alakú, 1-2,3x1,2-2,6  $\mu\text{m}$  átmérőjű *Chloroparva pannonica* autosporulációval szaporodik. A sejtfa háromrétegű, amely közül a legbelső mikrofibrilláris réteg (Somogyi és mtsai, 2011). A *Nannochloris sp.* ellipszoid alakú (1,5  $\mu\text{m}$  széles, 3-3,5  $\mu\text{m}$  hosszú), megnőhet 5-6  $\mu\text{m}$  hosszúra, és osztódási típusa a kettéosztódás. A *Marvania geminata* gömb alakú (3,5-3,8  $\mu\text{m}$  átmérőjű), és bimbózással osztódik (Yamamoto és mtsai, 2007). Ezeknek a fajoknak a morfológiai tulajdonságaik nagyon hasonlóak, csak a reprodukciójuk az, ami lényegesen eltér, ezért a legfőbb különbségeket a 18S rRNS gén szekvenciája mutatja meg közöttük.

A klónok vizsgált 18S rRNS gén szakaszain belül nem találhatók intronok. A távoli rokonságban levő *Chlorophyta* nemzetségek *Choricystis* (*Trebouxiophyceae*) és a *Mychonastes* (*Chlorophyceae*) 18S rRNS génje ugyan tartalmaz intronokat, továbbá a harmadik édesvízi pikoeukarióta alga nemzetség, a *Chloroparva pannonica* (7. ábra) is. Viszont az intronok egyenlőtlen eloszlása és előfordulása miatt nem hasznos filogenetikai marker. (Somogyi és mtsai, 2011)

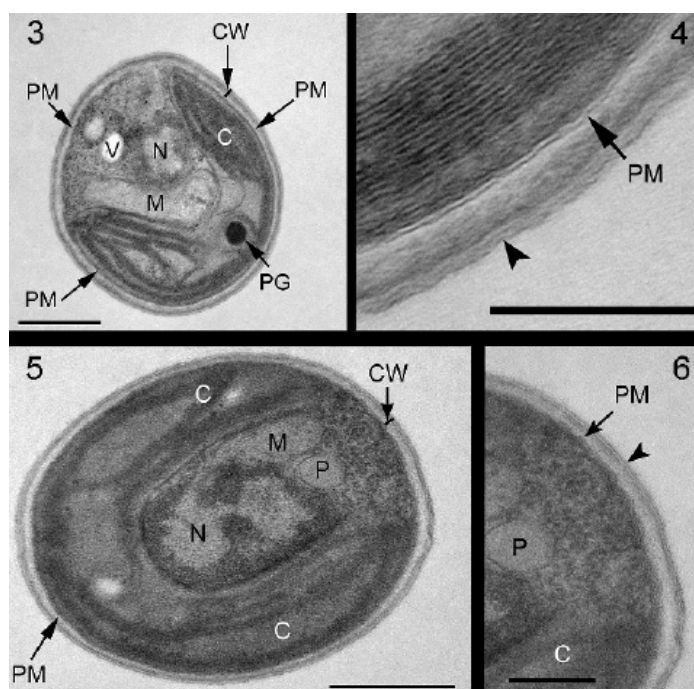
A DNS alapú filogenetikai analízis bevezetése megújította mind az édesvízi, mind a sósvízi zöldalgák taxonómiáját, annak ellenére, hogy számos piko-méretű *Chlorophyta* nomenklatúrája és rendszerezése még mindig felülvizsgálatra vár. Ezen problémák miatt jelenleg a 18S rRNS génnek nincs általános páros hasonlósági értéke, amely meghatározhatná a *Chlorophyta* nemzetségeket. (Somogyi és mtsai, 2011)

A fenti eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az egyik általam kimutatott csoport a *Chloroparva* nemzetség fajait bővíti, a másik csoport pedig új nemzetséget alkot. A molekuláris biológiai módszerekkel elemzett eredmények elegendőek filogenetikai csoportok megalkotásához, azonban nem elegendőek valid taxonok leírásához. A fajleírásához szükséges az újonnan felfedezett fajok ill. nemzetségek tenyésztéses vizsgálata, továbbá törzsgyűjteményben ill. herbáriumban való elhelyezése. A későbbiekben ezek pótlására kell törekedni.

A nem zöldalga genotípusok nagy aránya miatt, a klónkönyvtár készítése előtt használt 18S rRNS primerek alkalmassága megkérdőjelezhető, mert *Cercozoa* fajok számottevő mennyiségben fordultak elő a klónok esetében. Nagyon nehéz zöldalga 18S rDNS specifikus primereket készíteni. Egy átfogóbb zöldalgákra specifikus primer tervezési vizsgálat is azt az eredményt hozta, hogy nem lehet teljesen specifikus primereket találni, amellyel magyarázható a *Cercozoák* jelenléte (Moro és mtsai, 2009).

**7. ábra:** A *Chloroparva pannonica* transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele.

C: kloroplasztisz, CW: sejtfal, M: mitokondrium, N: nukleusz, P: peroxiszóma, PG: plasztoglobulin, PM: plazmamembrán, V: vakuólum (Somogyi és mtsai, 2011)



Hazánk szikes vizeiben az alábbi baktérium méretű zöldalga nemzetségeket határozták már meg: *Mychonastes*, *Chloricystis* és *Chloroparva* (Somogyi és mtsai, 2012), de a pikoeukarióta algák sokfélesége még mindig okozhat meglepetést a kutatóknak. Már rengeteg új taxon (baktériumok és zöldalgák egyaránt: *Bacillus aurantiacus*, Borsodi és mtsai, 2008; *Bacillus alkalisediminis*, Borsodi és mtsai, 2011; *Cellulomonas phragmiteti*, Rusznyák és mtsai, 2011; *Chloroparva pannonica*, Somogyi és mtsai, 2011) le lett írva, de szikes vizeink még mindig rejtegethetnek olyan élőlényeket, amelyek meghatározóak ezen élőhely szempontjából.

## **6. ÖSSZEFOGLALÁS**

A Duna-Tisza közti sekély, turbid szikes vizek Európában egyedülállóak, kiemelkedő jelentőségű természeti értékeket képviselnek, geológiai és ökológiai szempontból egyaránt fontosak. A mérsékelt övi szikes tavak képesek teljesen kiszáradni, mégis extrém fotoautotróf pikoplankton ( $<2\mu\text{m}$ ) gazdagság jellemző rájuk. Összetételük szezonális dinamikát mutat: a cianobaktériumok a melegebb, a pikoeukarióta algák a hidegebb időszak kedvelői. A pikoalgák fenotípusán alapuló faji vagy nemzetségi szintű azonosítása korlátozott a morfológiai tulajdonságaik szegénysége és egyszerűsége miatt, ezért ma már inkább a DNS-alapú módszerek elterjedtebbek.

A dolgozatomban célja egy Zab-székből származó 2012. februári szikes vízminta faji összetételének részletesebb megismerése volt a pikoeukarióta algaközösségre nézve. A helyszínen az irodalomban közölt egyik legmagasabb értékű zöldalga tömegprodukció volt megfigyelhető. A mintából a pikoeukarióta algákat molekuláris biológiai PCR alapú módszerek alkalmazásával vizsgáltam, a zöldalga fajokat 18S rRNS gén összehasonlító bázissorrend elemzésével azonosítottam. A közösségi DNS-ből klónozás útján kapott 90 klónt restrikciós emésztéssel csoportosítottam.

A szekvenálási eredményeket a GenBank adatbázissal összehasonlítva, a klónok az eddig leírt *Trebouxiophyceae* osztály (*Chlorophyta*) fajaival alacsonyabb hasonlóságot mutattak. Így valószínűsíthető, hogy új nemzetségek ill. fajok okozták ezt a rendkívüli vízvirágzást.

## **7. SUMMARY**

The shallow turbid soda pans located in the Danube-Tisza Interfluvium are unique in Europe. They represent significant natural value both in geological and ecological aspects. The soda lakes in the temperate zone are able to dry out completely, but they could be characterized with extreme photoautotrophic picoplankton richness ( $<2\mu\text{m}$ ). Their composition shows seasonal dynamics: cyanobacteria prefer warmer periods while eukaryotic algae dominate in colder periods. The phenotype based identification of picoplankton on the species or genus level is limited because of the scarcity and simplicity of their morphological characteristics, therefore DNA-based methods are commonly used nowadays.

The thesis aims to reveal the species composition of the eukaryotic algal community in a soda water sample taken from Zab-szék on February 2012. A mass production of green algae (bloom) that was among the highest abundance values published was observed on the site. Eukaryotic picoalgae were studied by PCR-based molecular biological techniques and the green algal species were identified by the comparative analysis of 18S rRNA gene sequences. The 90 clones obtained from the community DNA were grouped according to their restriction digestion pattern.

Following the comparison of sequencing results with the GenBank database, the clones have showed low similarity values to the *Trebouxiophyceae* species (*Chlorophyta*) so far described. So it is likely that new genera or species have caused this extraordinary algal bloom.

## **8. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS**

1. A Zab-székből származó közösségi 18S rDNS-t sikeresen felszaporítottam polimeráz láncreakcióval Euk328f és Chlo02r primerek alkalmazásával, majd megtisztítottam, és klónozással választottam szét, amely 90 klónt eredményezett.
2. A klónokat két lépésben amplifikáltam PCR-rel, először M13F és M13R, majd Euk328f és Chlo02r primerek alkalmazásával, mert a csupán az utóbbi primerekkel történő amplifikálás gyakran nem eredményezett PCR termékeket (amelyet gélelektroforézissel ellenőriztem minden esetben).
3. A klónok csoportosítását restriktációs emésztéssel hajtottam végre, és a hozzátartozó műveleteket elvégeztem (gélelektroforézis).
4. A szekvenálás eredményeit Chromas, GenBank DNS-adatbázis, Silva adatbázis, BLAST és MEGA5 programok segítségével elemeztem, amelyek 2 új filogenetikai csoportot mutattak a Zab-széki mintából.

## **9. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. **Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs.** Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
2. Boros E. 2002. **Szikes tavak.** Környezetvédelmi Minisztérium, Természetvédelmi Hivatal, 28 pp. (Nemzeti Ökológiai Hálózat 4)
3. Boros E., Vörös L. 2010. **A magyarországi szikes tavak sótartalma és ionösszetétele.** Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungaricae. Fasc. 22. pp. 37-51.
4. Borsodi A.K., Márialigeti K., Szabó G., Palatinszky M., Pollák B., Kéki Zs., Kovács A.L., Schumann P., Tóth E.M. 2008. ***Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58,845-851.
5. Borsodi A.K., Pollák B., Kéki Zs., Rusznyák A., Kovács A.L., Sproer C., Schumann P., Márialigeti K., Tóth E. M.. 2011. ***Bacillus alkalisediminis* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from the sediment of extremely shallow soda ponds.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61,1880-1886.
6. Callieri C. 2007. **Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs.** Freshwat. Rev. 1: 1-28.
7. Duckworth A.W., Grant W.D., Jones B.E., Van Steenbergen R. 1996. **Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles.** FEMS Microbiol Ecol 19:181-191.
8. Felföldi T., Somogyi B., Vörös L., Márialigeti K. 2010a. **Kiskunsági szikes tavaink pikoalgáinak azonosítása és diverzitásának vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel.** Acta Biol. Debr. Oecol. Hung. 22: 113-120.
9. Felföldi T., Somogyi B., Vörös L., Vida M., Márialigeti K. 2010b. **Molekuláris biológiai módszerek alkalmazásának lehetőségei sekély tavaink mikroszkopikus méretű eukariótáinak azonosításában.** Hidrol. Közl.
10. Grant W.D. 1992. **Alkaline Environments.** In: Lederberg J. (ed.) Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, New York. pp. 73-80.

11. Henley W.J., Hironaka J.L., Guillou L., Buchheim M.A., Buchheim J.A., Fawley M.W., Fawley K.P. 2004. **Phylogenetic analysis of the 'Nannochloris-like' algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*)**. Phycologia 43: 641-652.
12. MacIsaac E.A., Stockner J.G. 1993. **Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy**. In: The handbook of methods in aquatic microbial ecology (Eds: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ). CRC Press. pp. 187-197.
13. Malinsky-Rushansky N., Berman T., Dubinsky Z. 1995. **Seasonal dynamics of picophytoplankton in Lake Kinneret, Israel**. *Freshwat. Biol.* 34: 241-254.
14. Moon-van der Staay, S.Y., van der Staay, G.W.M., Guillou, L., Vaulot, D., Claustre, H. & Medlin, L.K. 2000. **Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences**. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 98-109.
15. Moro V.C., Crouzet O., Rasconi S., Thouvenot A., Coffe G., Batisson I., Bohatier J. 2009. **New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of *Chlorophyceae* and *Bacillariophyceae*: application to environmental samples**. *Applied & Environmental Microbiology*. 75:5729-5733.
16. Mózes A., Présing M., Vörös L. 2006. **Seasonal dynamics of picocyanobacteria and picoeukaryotes in a large shallow lake (Lake Balaton, Hungary)**. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 91: 38-50.
17. Sambrook J. & Russell D.W. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Chapter 8: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 8.115.
18. Sieburth J.Mc.N., Smetacek V., Lenz J. 1978. **Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions**. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1256-1263.
19. Somogyi B., Felföldi T., Solymosi K., Vanyovszki J., Böddi B., Márialigeti K., Vörös L. 2009a. **Duna-Tisza közí szikes tavaink ismeretlen zöldalgái**. *Hidrol. Közl.* 89: 59-62.
20. Somogyi B., Felföldi T., Vanyovszki J., Ágyi Á., Márialigeti K., Vörös L. 2009b. **Winter bloom of picoeukaryotes in Hungarian shallow turbid soda pans and the role of light and temperature**. *Aquat. Ecol.* 43: 735-744.
21. Somogyi B., Felföldi T., Solymosi K., Makk J., Homonnay Z.G., Horváth G., Turcsi E., Böddi B., Márialigeti K. és Vörös L. 2011. ***Chloroparva pannonica* gen.**

- et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) – a new picoplanktonic green alga from a turbid, shallow soda pan.** Phycologia. 50(1): 1-10.
22. Somogyi B., Felföldi T., Márialigeti K. és Vörös L. 2012. **Sekély tavaink téli eukarióta pikoalgái.** Hidrol. Közl. 92: 61-64.
  23. Stockner J.G. & Antia N.J. 1986. **Algal picoplankton from marine and freshwater: a multidisciplinary perspective.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 2472-2503.
  24. Sümegi P., Szilágyi G. 2010. **A Hortobágy új felszínfejlődési modellje és a szikesedés eredete.** Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungaricae. Fasc. 22. pp. 27-35.
  25. Raven J.A. 1998. **The twelfth Transley lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton.** Funct. Ecol. 12: 503-513.
  26. Rusznyák A., Tóth E.M., Schumann P., Sproer C., Makk J., Szabó G., Vladár P., Márialigeti K., Borsodi A.K. 2011. ***Cellulomonas phragmiteti* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from reed (*Phragmites australis*) periphyton in a Hungarian shallow soda pond.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61,1662-1666.
  27. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
  28. Vaulot D., Eikrem W., Viprey M., Moreau H. 2008. **The diversity of small eukaryotic phytoplankton ( $\leq 3 \mu\text{m}$ ) in marine ecosystems.** FEMS Microbiol. Rev. 32: 795-820.
  29. Vörös L. 1991. **Importance of picoplankton in Hungarian shallow lakes.** Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 984-988.
  30. Vörös L., V.-Balogh K., Boros E. 2005. **Pikoplankton dominancia szikes tavakban.** Hidrol. Közl. 85: 166-168.
  31. Vörös L., Boros E., V. Balogh K., Németh B., Somogyi B. 2009. **Szikes tavaink különleges élővilága és ökológiai rendszere.** MHT. XXVII. Orsz. Vándorgy. 2009. júl. 1-3. Előadás.
  32. Yamamoto M., Fujishita M., Hirata A., Kawano S. 2004. **Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*).** J. Plant. Res. 117: 257-264.

33. Yamamoto M., Nishikawa T., Kajitani H., Kawano S. 2007. **Patterns of asexual reproduction in *Nannochloris bacillaris* and *Marvania geminata* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).** Planta 226: 917-927.
34. Zhu F., Massana R., Not F., Marie D., & Vaulot, D. 2005. **Mapping of picoeukaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene.** FEMS Microbiology Ecology 52: 79–92.

## **10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Elsősorban szeretném megköszönni **Dr. Márialigeti Károlynak**, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetőséget biztosított TDK munkám elkészítéséhez, valamint engedélyezte a tanszéki eszközök és laboratóriumok használatát.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Felföldi Tamásnak** a rengeteg hasznos szakmai tanácsért, a fáradhatatlan segítőkészségéért, amelyet TDK munkám elkészítése közben tapasztalhattam. A támogatása és bátorítása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Hálával tartozom *a Mikrobiológia Tanszék dolgozóinak*, akikhez bármikor fordulhattam segítségért és hasznos tanácsokért.

Szeretném megköszönni **Somogyi Boglárkának** és **Vörös Lajosnak** (MTA Balatoni Limnológiai Intézet) közreműködését a dolgozatomhoz.

Köszönöm **barátaimnak** a sok biztatást és figyelmet.

Végül, de nem utolsó sorban, hálás vagyok **családomnak** a türelmükért, folyamatos támogatásukért, és azon körülmények biztosításáért, amelyek lehetővé tették a dolgozatom megírását.