ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΞΩΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *NOSTOC CALCICOLA*

ΧΑΤΖΗΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

LABORATORY OF CHEMISTRY

BACHELOR THESIS

EFFECTS OF GROWTH CONDITIONS ON THE PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES IN THE PHOTOSYNTHETIC CYANOBACTERIUM *NOSTOC CALCICOLA*

CHATZIATHANASIOU ANGELIKI

SUPERVISOR PROFESSOR: GHANOTAKIS DEMETRIOS

HERAKLION 2020

Ευχαριστίες

Για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας, αρχικά, ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την εξαιρετική εκπαίδευση, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο, που μου παρείχε στα χρόνια των σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Δημήτριο Γανωτάκη, ο οποίος μου επέτρεψε να εκπαιδευτώ στο εργαστήριό του και μου έδωσε την ευκαιρία να ταξιδέψω στην Ιταλία για επιπλέον εκπαίδευση στα πλαίσια του προγράμματος Erasmus Placement.

Παράλληλα, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου, με τα οποία έζησα πολύ όμορφες στιγμές, παρά τις όποιες αντιξοότητες προέκυπταν. Πρώτα, ευχαριστώ θερμά την υπεύθυνή μου Ελένη Πολωνιατάκη, η οποία μου έμαθε να σκέφτομαι και να εργάζομαι ορθά κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες. Επίσης, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτωρ Γεώργιο Σφενδουράκη, τον Ναπολέων Στρατηγάκη, την Μαρία-Ελένη Ψυχογυιού και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μαλαματένια Παπαβασιλείου και Ελένη Χρυσουλάκη, για την στήριξη και την καθοδήγησή τους το διάστημα που εργάστηκα μαζί τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στις προπτυχιακές φοιτήτριες Δέσποινα Δεσποτοπούλου και Σοφία Λιουδάκη, μιας και δεν θα μπορούσα να έχω καλύτερους συνοδοιπόρους σε αυτό το ταξίδι. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη των εργαστηρίων του κ. Τσιώτη και του κ. Παυλίδη για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης ποικίλων συνθηκών ανάπτυξης στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το κυανοβακτηρίο *Nostoc calcicola*.

Η διπλωματική εργασία χωρίστηκε σε δύο μέρη: Στο πρώτο, η ανάπτυξη των καλλιεργειών έγινε σε κλειστό σύστημα υπό έλλειψη αζώτου, προκειμένου να δημιουργηθούν συνθήκες στρες για τα κύτταρα. Επιπρόσθετα, στο θρεπτικό σε κάθε συνθήκη υπήρχε μια μόνο μορφή άνθρακα, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδρασή της στην παραγωγή EPS. Οι πηγές άνθρακα ήταν το ανθρακικό νάτριο, το διοξείδιο του άνθρακα, η γλυκόζη και το οξικό νάτριο.

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος, μελετήθηκε η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών σε συνθήκες συνεχούς παροχής αέρα σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες, παρουσία όλων των συστατικών, με έλλειψη αζώτου, με έλλειψη αζώτου και άνθρακα και με έλλειψη θείου. Για την εξαγωγή επιπλέον αποτελεσμάτων, έγινε παρατήρηση των κυττάρων αυτών με οπτική μικροσκοπία.

Σε όλες τις παραπάνω καλλιέργειες, μετρούνταν, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, η ανάπτυξη των καλλιεργειών, μέσω της μέτρησης της συγκέντρωσης χλωροφύλλης α και της ξηρής μάζας, η ποσότητα εξωπολυσακχαριτών, καθώς και η ποσότητα αμινοξέων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

Λέξεις κλειδιά: φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, κυανοβακτήρια, *Nostoc calcicola*, εξωπολυσακχαρίτες (EPS) .

Abstract

In the present work, the effect of growth conditions on the production of exopolysaccharides by photosynthetic microorganisms was investigated.

The experiment was divided in two parts: In the first one, the microorganism was cultivated without air inflow under stress conditions for the cells, which was achieved by removing nitrogen from the growth medium. Also, the effect of a carbon source, like sodium carbonate, carbon dioxide, glucose and sodium acetate, on the production of exopolysaccharides by the cyanobacterium *Nostoc calcicola* was investigated, due to the absence of any other carbon source in the medium.

In the second part of the experiment, EPS production with air inflow was studied in four different growth conditions, in the presence of all components, in the absence of nitrogen, in the absence of both nitrogen and carbon, and in the absence of sulfur. Finally, in these conditions, the cells were studied by optical microscopy.

In the aforementioned cultivations, the cell growth (concentration of chlorophyll a and dry weight), the concentration of exopolysaccharides and the quantity of peptides in the supernatant fluid of the cultures were measured at regular intervals.

Keywords: photosynthetic microorganisms, cyanobacteria, *Nostoc calcicola*, exopolysaccharides (EPS).

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες 5

Περίληψη 7

Abstract 9

Περιεχόμενα 11

Συντομογραφίες 13

1.Θεωρητικό Μέρος 15

1.1Φωτοσύνθεση 15

1.2.Κυανοβακτήρια 16

1.4.Εξωπολυσακχαρίτες 17

1.5.Εφαρμογές εξωπολυσαγχαριτών 18

1.7.Σκοπός εργασίας 21

2.Πειραματικό Μέρος 23

2.1.Οργανισμός και Συνθήκες ανάπτυξης 23

2.2.Προσδιορισμός κυτταρικής συγκέντρωσης 29

2.2.1.Μέτρηση χλωροφύλλης α 29

2.2.2.Μέτρησης βάρους ξηρής μάζας 29

2.3.Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών 30

2.3.1.Καλλιέργειες Κλειστού Τύπου 30

2.3.2.Καλλιέργειες με συνεχή παροχή αέρα 31

2.4.Δειγματοληψία 33

2.5.Ποσοτικός προσδιορισμός εξωπολυσακχαριτών 33

2.6.Ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας 34

2.7.Παρατήρηση με οπτική μικροσκοπία 34

3.Αποτελέσματα και Συζήτηση 35

3.1.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου και άνθρακα και σε θρεπτικό παρουσία αμμωνιακών και άνθρακα 35

3.2.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα με μορφή ανθρακικών ιόντων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 39

3.3.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα ως διοξείδιο του άνθρακα σε τρεις διαφορετικές ποσότητες 42

3.4.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα ως γλυκόζη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 45

3.5.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα ως οξικά ιόντα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 48

3.6. Μελέτη της παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα, παρουσία όλων των θρεπτικών στοιχείων, με έλλειψη αζώτου, με έλλειψη αζώτου και άνθρακα και με έλλειψη θείου έχοντας συνεχή παροχή αέρα......51

3.7. Παρατήρηση κυττάρων Nostoc calcicola με οπτική μικροσκοπία σε τέσσερα θρεπτικά μέσα, παρουσία όλων των συστατικών, σε έλληψη αζώτου, σε έλληψη αζώτου και άνθρακα και σε έλλειψη θείου......55

Συμπεράσματα.....57

Προοπτικές και Μελλοντικοί Στόχοι.....59

Βιβλιογραφία 61

Συντομογραφίες

EPS: εξωπολυσακχαρίτες

BG11: θρεπτικό μέσο για ανάπτυξη κυανοβακτηρίων

Chla: χλωροφύλλη a

NH_4^+: θρεπτικό μέσο που τα νιτρικά άλατα του έχουν αντικατασταθεί με αμμωνιακά

-N: θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ενώσεις αζώτου

-N-C: θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ενώσεις άνθρακα και αζώτου

-S: θρεπτικό μέσο πού δεν περιέχει ενώσεις θείου

1.Θεωρητικό Μέρος

1.1Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι μια από τις σημαντικότερες φυσικοχημικές διαδικασίες του πλανήτη, μέσω της οποίας οργανισμοί, όπως φυτά και φωτοσυνθετικά βακτήρια, μετατρέπουν την ηλιακή σε χημική ενέργεια. Η διαδικασία αυτή έχει ιδιαίτερη αξία λόγω της βαρύτητας που έχει στην διατήρηση της ζωής, μιας και:

- Παρέχει υδατάνθρακες για την παραγωγή ενέργειας στους οργανισμούς
- Είναι το κύριο μονοπάτι μέσω του οποίου ο άνθρακας επιστρέφει στη βιόσφαιρα.
- Είναι η κύρια πηγή οξυγόνου και εμπλουτισμού της γήινης ατμόσφαιρας στο στοιχείο αυτό.[1]

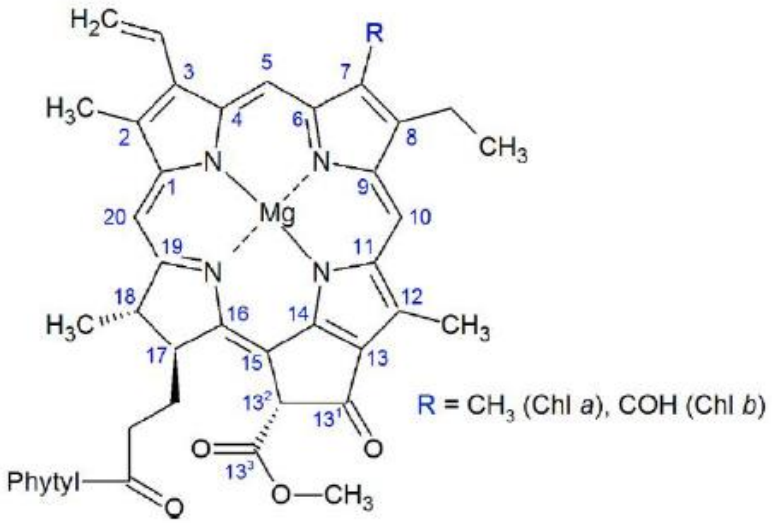
Οι οργανισμοί που μπορούν να φωτοσυνθέσουν ονομάζονται φωτοτροφικοί ή φωτότροφοι [2]. Αυτοί με την σειρά τους χωρίζονται σε δυο υποκατηγορίες: τους φωτοαυτότροφους (που λαμβάνουν μόνο το CO_2 ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή οργανικών ενώσεων χρησιμοποιώντας την ενέργεια του φωτός) και τους φωτοετερότροφους οργανισμούς (που χρησιμοποιούν οργανικό άνθρακα ως πηγή άνθρακα).

Τα πράσινα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια πραγματοποιούν οξυγονική φωτοσύνθεση, δηλαδή χρησιμοποιούν ως πηγή ηλεκτρονίων το H_2O για να απελευθερώνουν οξυγόνο και να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό CO_2, το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση υδατανθράκων[3]. Σε άλλα είδη βακτηρίων, αντίθετα, η αναγωγική ισχύ αποκτάται από ηλεκτρονιοδότες που υπάρχουν στο περιβάλλον, όπως πηγές θείου σε ανηγμένη μορφή (H_2S). Χρησιμοποιώντας την ηλιακή ενέργεια, συνθέτουν οργανικές ενώσεις, αλλά δεν παράγουν οξυγόνο, κάνουν δηλαδή ανοξυγονική φωτοσύνθεση[4].

Η φωτοσύνθεση μπορεί να χωρισθεί σε δύο ομάδες αντιδράσεων:

- Τις φωτεινές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την απορρόφηση του φωτός, τη μεταφορά της ενέργειας στα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή NADPH, ATP και O_2 ως παραπροϊόν.
- Και τις σκοτεινές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO_2 και τη σύνθεση υδατανθράκων, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP τα οποία είχαν προηγουμένως παραχθεί κατά τις φωτεινές αντιδράσεις [1].

Η φωτοσυνθετική ικανότητα των φωτοτροφικών οργανισμών εξαρτάται από την παρουσία φωτοευαίσθητων χρωστικών, δηλαδή ουσιών που απορροφούν ορατό φως. Σε φυτά, φύκη και ορισμένα βακτήρια συναντάται η χρωστική χλωροφύλλη, η οποία είναι φωτοϋποδοχέας στους χλωροπλάστες και συνδέεται με πρωτεΐνες των θυλακοειδών [1].



Εικόνα 1.1.1. Δομή της χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b αριθμημένη κατά IUPAC [5].

1.2.Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν μια κατηγορία προκαρυωτών, τα οποία μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Ως δότη ηλεκτρονίων, κατά την φωτοσύνθεση, χρησιμοποιούν το νερό, και παράγουν οξυγόνο ως παραπροϊόν. Επίσης, χρησιμοποιούν ως φωτοσυνθετική χρωστική την χλωροφύλλη a, και τη φυκοκυανίνη, μια χρωστική των φυκοβιλιπρωτεϊνών, στην οποία οφείλεται το χαρακτηριστικό τους μπλε-πράσινο χρώμα. Αυτός είναι και ο λόγος που τα κυανοβακτήρια ονομάζονται μπλε-πράσινα φύκη (blue-green algae) [6].

1.3.Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι μία από τις 4 κύριες κατηγορίες βιομορίων, με μεγάλη βιολογική σημασία. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, μιας και είναι αποτέλεσμα συνδυασμού ενός μεγάλου αριθμού μονοσακχαριτών, όπως οι εξόζες και οι πεντόζες. Εκτός αυτού, η ποικιλία γλυκοζιτικών δεσμών, επιπλέον ομάδων, που μπορούν να εμφανιστούν προσδεμένες πάνω στον εκάστοτε μονοσακχαρίτη, αλλά και ο τρόπος διασύνδεσης των μονομερών, συντελούν στην ποικιλία των πολυμερών[7]. Σημειώνεται ότι

οι πολυσακχαρίτες συναντώνται συχνά συνδεδεμένοι και με άλλα βιομόρια, όπως πρωτεΐνες και λιπίδια [1].

Οι υδατάνθρακες χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, λόγω των ιδιοτήτων τους ως πηκτωματοποιητές. Συγκεκριμένα, διαθέτουν ρεολογικές ιδιότητες [8,9], αλλά και ορισμένες βιολογικές, όπως ανοσορρυθμιστική, αντιβακτηριδιακή, αντιπηκτική, αντιμυκητιακή, ακτινοπροστατευτική, αντιοξειδωτική, αντιμολυσματική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδες [10-12].

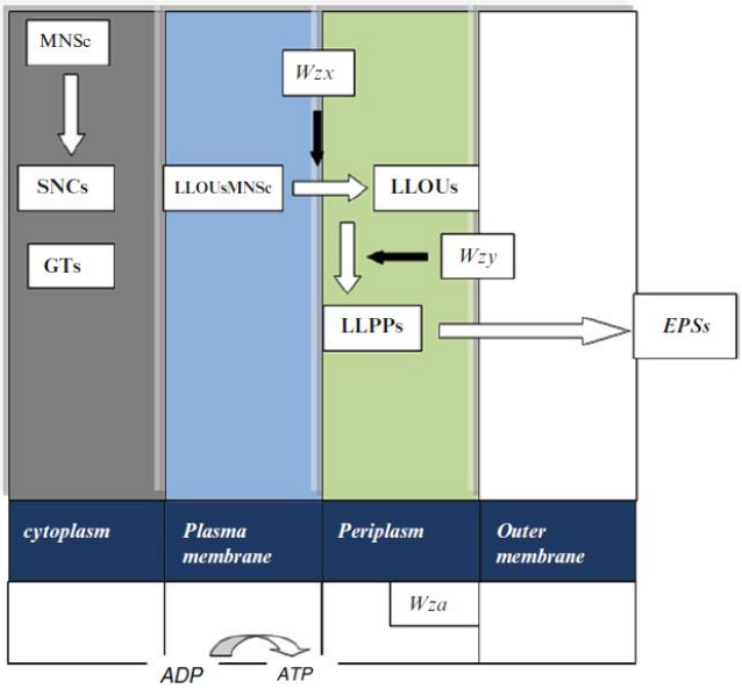
Η σύσταση και η τρισδιάστατη δομή των πολυσακχαριτών έχουν ιδιαίτερη σημασία στις φυσικές λειτουργίες τους στους μικροοργανισμούς, μιας και αποτελούν κύριο συστατικό των αποικιών και των βιολογικών υμενίων (biofilms) και λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας και άνθρακα. Τέλος, όταν απελευθερωθούν στο εξωτερικό των κυττάρων, σχηματίζουν σε συνθήκες καταπόνησης ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από αυτά, για να τα προστατεύσουν [13,14].

1.4.Εξωπολυσακχαρίτες

Μικροοργανισμοί, όπως τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη, έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες πολυσακχαριτών [15]. Ο κύριος λόγος έκκρισης είναι για να παράξουν μια βλέννα πολυσακχαρίτη γύρω από το κύτταρο, η οποία έχει ως ρόλο να προστατεύει τα κύτταρα από δυσμενείς περιβαντολλογικές συνθήκες και από άλλους οργανισμούς [13, 14, 16].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [17], οι εξωπολυσακχαρίτες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτούς που απελευθερώνονται πλήρως στο περιβάλλον γύρω από το κύτταρο και σε αυτούς που διασυνδέονται με την κυτταρική επιφάνεια και κατατάσσονται σε τρεις υποκατηγορίες: θήκες (sheaths), κάψουλες (capsule) και γλοιώδες υγρό (slime). Ο διαχωρισμός τους σε υποομάδες στηρίζετε στην διαλυτότητα τους με το νερό [18].

Στα μικροφύκη, η σύνθεση των πολυσακχαριτών λαμβάνει χώρα στο σύμπλεγμα Golgi [19,20], ενώ στα κυανοβακτήρια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το κύριο στάδιο σύνθεσης των EPS στα μικροφύκη και στα κυανοβακτήρια είναι η παραγωγή ενεργοποιημένων σακχάρων (πρόδρομα μόρια). Έπειτα, οι γλυκοζυλοτρανσφεράσες, που αποτελούν το ένζυμο-κλειδί στη βιοσύνθεση των EPS, συνεισφέρουν στη συναρμολόγηση μεταξύ τους. Τέλος, οι πολυσακχαρίτες τροποποιούνται και εξάγονται ως πολυμερή στο εξωκυττάριο διαμέρισμα ή ως συστατικά ενδομεβράνης [21].



Εικόνα 1.4.1. Προτεινόμενο μονοπάτι σύνθεσης EPS και διαμερισματοποίηση. MNS monosaccharides, SNCs sugar nucleotides, GTs glycosyltransferases, LLOUs lipid-linked oligosaccharide units, LLPPS lipid-linked polymerized polysaccharide units [21].

1.5.Εφαρμογές εξωπολυσαγχαριτών

Οι εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται από τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία λόγω των πολλών τους βιολογικών δράσεων (Πίνακας 1.5.1). Επιπλέον έχουν μελετηθεί για τις ρεολογικές και λειτουργικές τους ιδιότητες ως παράγοντες πηκτωματοποίησης στη βιομηχανία τροφίμων. Παρά την ποικιλία στις εφαρμογές τους [11,12, 22-24], πέρα από τη βιομηχανία καλλυντικών η αξιοποίησή τους είναι περιορισμένη σε άλλους τομείς, όπως στη θεραπεία, στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο υψηλό κόστος απομόνωσης και στην έλλειψη γνώσης της επακριβής τους δομής και των δράσεων τους.

Πίνακας 1.5.1. Κύριες βιολογικές δράσεις εξωπολυσακχαριτών από μικροφύκη και κυανοβακτήρια [25].

Species (phylum)	Polys.	Biological activities	References
Phaeodactylum tricornutum (Ba)	EPS	Anti-inflammatory, immunomodulatory activities	Guzman et al. (2003)
Chlorella stigmatophora	EPS	Anti-inflammatory, immunomodulatory activities	Guzman et al. (2003)
Arthrospira platensis (Cy)	EPS	Antiviral, anti-tumor activities	Rechter et al. (2006); Morais et al. (2010)
Arthrospira maxima (Cy)	EPS	Antiviral activity	Hernandez-Corona et al. (2002)
Gyrodinium impudicum (Mi)	EPS	Antiviral, immunomodulatory, anti-tumor activities	Yim et al. (2004, 2005)
Cochlodinium polykrikoides (Mi)	EPS	Antiviral activity	Hasui et al. (1995)
Porphyridium sp. (Rh)	EPS	Antioxidant, antiviral, hypocholesterolemic, immunomodulatory, anti-tumor activities	Dvir et al. (2009); Huleihel et al. (2002); Tannin-Spitz et al. (2005); Matsui et al. (2003); Geresh et al. (2002b)
Porphyridium cruentum (Rh)	EPS	Antioxidant, antiviral, hypoglycaemic, anti-tumor activities	Huang et al. (2006); Raposo et al. (2013); Sun et al. (2009); Gardeva et al. (2009)
Porphyridium marinum (Rh)	EPS	Antimicrosporidian activity	Roussel et al. (2015)
Porphyridium purpureum (Rh)	EPS	Antiviral, antimicrosporidian activities	Raposo et al. (2013); Roussel et al. (2015)
Rhodella maculata (Rh)	EPS	Antimicrosporidian activity	Roussel et al. (2015)
Rhodella reticulata (Rh)	EPS	Antioxidant, antiviral, hypoglycaemic, anti-tumor activities	Chen et al. (2010); Huleihel et al. (2001); Geresh et al. (2002b)
Rhodella violaceae (Rh)	EPS	Antimicrosporidian activity	Roussel et al. (2015)

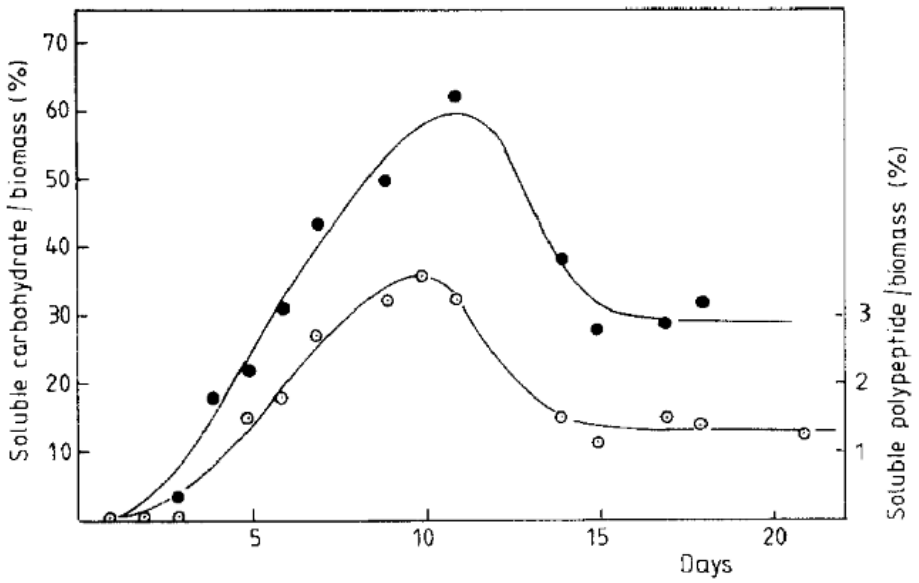
Ba: Bacillariophyta; Ch: Chlorophyta; Cy: Cyanobacteria; Ha: Haptophyta; Mi: Miozoa; Rh: Rhodophyta.

Μια άλλη εφαρμογή τους είναι στον τομέα της διαχείρισης αποβλήτων, καθώς οι EPS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πολλές εξωγενείς οργανικές και ανόργανες ενώσεις λόγω των άφθονων λειτουργικών τους ομάδων (COOH, -OH, -CHO, κ.τ.λ.) [26]. Παραδείγματος χάριν, EPS από μικροφύκη και κυανοβακτήρια μπορούν να επάγουν την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων (όπως Cu^{2+} και Cd^{2+}) [27-29].

1.6.EPS και *Nostoc calcicola*

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μελέτη παραγωγής των EPS με το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola*. Ο μικροοργανισμός παράγει ποσότητες εξωπολυσακχαρίτη, υπό φυσιολογικές συνθήκες [30], με μέγιστη παραγωγή κατά την στατική φάση της καμπύλης ανάπτυξης. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [31], παρατηρείται αύξηση της παραγωγής υπό συνθήκες στρες.

Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο παραγόμενος πολυσακχαρίτης είναι μίγμα πεπτιδογλυκάνων [29, 30]. Η σύσταση της πεπτιδογλυκάνης βρέθηκε να είναι 17% πρωτεΐνη, D-ριβόζη 1.32%, D-αραβινόζη 1.13%, L-ραμνόζη 2.03%, L-φουκόζη 11.21%, D-ξυλόζη 2.44%, D-μαννόζη 30.02%, D-γλυκόζη 38.45%, D-γαλακτόζη 12.53%, 3-μεθυλ-D-αραβινόζη 0.87% [32].



Εικόνα 1.6.1. Απελευθέρωση των διαλυτών υδατανθράκων (•) και πολυπεπτιδίων (ο), εκφρασμένη ως ποσοστό της βιομάζας του *Nostoc calcicola* σε καλλιέργεια στους 31°C. D-γλυκόζη και αλβουμίνη βόειου ορού (bovine serum albumin) χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ενώσεις για τους υδατάνθρακες και τα πολυπεπτίδια αντίστοιχα [30].

Το ιξώδες του εξωπολυσακχαρίτη ήταν 55-56 cps και εμφάνισε ικανότητα απορρόφησης νερού 282g $H_2O \cdot g^{-1}$ πολυμερούς [32]. Όπως και οι λοιποί πολυσακχαρίτες, έτσι και οι EPS είχαν βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιικές, ιδιαίτερα όταν ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε άλατα θείου [33]. Εκτός αυτού, εμφάνισε και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες (*E.coli* > *B. amyloloquifaciens* = *S. aureus* > *B. cereus*) [32]

Μέσω της βιβλιογραφίας, επίσης, έχουν βρεθεί οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής των EPS. Ειδικότερα, το βέλτιστο pH και θερμοκρασία για την μεγαλύτερη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών είναι pH=10 και T=35°C. Ανάλογα τις παραμέτρους του εκάστοτε πειράματος, ωστόσο, οι βέλτιστες συνθήκες μπορεί να διαφέρουν (παραδείγματος χάριν σε έλλειψη φωσφόρου βρέθηκε πως το βέλτιστο pH είναι το 7 [32]).

Η μελέτη των φωτοπεριόδων έδειξε ότι η παραγωγή των EPS αυξάνεται με την διάρκειά τους (4h < 8h < 12h < 16h < 24h), ενώ στην παραγωγή επιδρά και το είδος του φωτός (λευκό φως > κίτρινο > κόκκινο > πράσινο > μπλε) [33].

Μια εφαρμογή της πεπτιδογλυκάνης του *Nostoc calcicola* ήταν η χρήση του για απομάκρυνση ιόντων όπως ασβεστίου και καδμίου [29,34].

1.7.Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών από το κυανοβακτηρίο *Nostoc calcicola*. Αυτό επιτεύχθηκε με δυο σειρές πειραμάτων. Στην πρώτη, ελέγχθηκε η επίδραση ποικίλων πηγών άνθρακα σε διάφορες συγκεντρώσεις στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, χρησιμοποιώντας θρεπτικά μέσα με διάφορες πηγές άνθρακα (ανθρακικό νάτριο, διοξείδιο του άνθρακα, γλυκόζη και οξικό νάτριο) σε κλειστό σύστημα και υπό έλλειψη αζώτου, για τη διαμόρφωση συνθηκών καταπόνησης. Στην δεύτερη πειραματική σειρά, εξετάστηκε η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών σε τέσσερα θρεπτικά μέσα (χωρίς καμία έλλειψη, σε έλλειψη αζώτου, σε έλλειψη αζώτου και άνθρακα και σε έλλειψη θείου) υπό συνεχή παροχή αέρα. Τέλος, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού με οπτική μικροσκοπία στις συνθήκες συνεχούς παροχής αέρα.

2.Πειραματικό Μέρος

2.1.Οργανισμός και Συνθήκες ανάπτυξης

Ο οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola*. Από στερεή καλλιέργεια δημιουργήθηκαν μητρικές καλλιέργειες σε θρεπτικό BG11 [35] μέσα σε ειδικούς γυάλινους σωλήνες (εικόνα 2.1.1.Α). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 15-18 μέρες αυτότροφα σε περιβάλλον με σταθερή θερμοκρασία 25±1°C και φωτονιακή ακτινοβολία 20,25μE m^{-2} s^{-1} με χρήση λευκών λαμπών φθορισμού (cool white).

Εικόνα 2.1.1: Εικόνα συστήματος ανάπτυξης κυττάρων *Nostoc calcicola* με συνεχής παροχή αέρα. Ειδικός υάλινος σωλήνας όπου καλλιεργήθηκε η μητρική καλλιέργεια (Α). Κωνική φιάλη με ειδικό πώμα στην οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα της ενότητας 3.6. (Β).

BG11:

Πίνακας 2.1.1.: Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου BG11 (pH=7,5).

Διαλύματα	**Ποσότητα**
100x BG11 χωρίς Fe, P, C	10 mL/L
1000x κιτρικό σιδήρου αμμωνίου (ferric ammonium citrate)	1 mL/L
1000x Na_2CO_3	1 mL/L
1000x K_2HPO_4	1 mL/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer)	50 mL/L

Πίνακας 2.1.2.: Συστατικά διαλύματος 100x BG11 χωρίς Fe, P, C.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
$NaNO_3$	149,60g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,49 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60g/L
Κιτρικό οξύ	0,60g/L
Na-EDTA, pH=8,0, 0,25M	1,12mL/L
Διάλυμα Ιχνοστοιχείων	100 mL/L

Πίνακας 2.1.3.: Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (trace minerals).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,39 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079 g/L
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,0494 g/L

Πίνακας 2.1.4. Συστατικά διαλύματος 1000x κιτρικό σιδήρου αμμωνίου (ferric ammonium citrate).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
κιτρικό σιδήρου αμμωνίου (ferric ammonium citrate)	6 g/L

Πίνακας 2.1.5. Συστατικά διαλύματος 1000x Na_2CO_3.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
Na_2CO_3	20 g/L

Πίνακας 2.1.6. Συστατικά διαλύματος 1000x K_2HPO_4.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
K_2HPO_4	30,5 g/L

Πίνακας 2.1.7. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate buffer) (pH=7,5).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
NaH_2PO_4	69 g/L

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH έως το pH=7,5.

Το ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφωρικών τοποθετείται σε ξεχωριστό δοχείο από το υπόλοιπο θρεπτικό για την αποστείρωση, διότι σχηματίζει δυσδιάλυτα άλατα με την παρουσία των υπόλοιπων συστατικών σε υψηλή θερμοκρασία (120°C).

BG11 NH_4^+:

Πίνακας 2.1.8. Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου BG11 NH_4^+ (pH=7,5).

Διαλύματα	**Ποσότητα**
100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N	10 mL/L
1000x κιτρικού σιδήρου (ferric citrate)	1 mL/L
1000x Na_2CO_3	1 mL/L
1000x K_2HPO_4	1 mL/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer)	50 mL/L
NH_4Cl	0,9414 g/L

Πίνακας 2.1.9. Συστατικά διαλύματος 100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,49 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60 g/L
κιτρικό οξύ	0,60 g/L
NaEDTA, pH=8.0, 0.25M	1,12 mL/L
διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace minerals)	100 mL/L

Πίνακας 2.1.10. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (trace minerals).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,39 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079 g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05 g/L

Πίνακας 2.1.11. Συστατικά διαλύματος 1000x κιτρικού σιδήρου (ferric citrate).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
κιτρικός σίδηρος (ferric citrate)	5,6 g/L

Πίνακας 2.1.12. Συστατικά διαλύματος 1000x Na_2CO_3.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
Na_2CO_3	20 g/L

Πίνακας 2.1.13. Συστατικά διαλύματος 1000x K_2HPO_4.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
K_2HPO_4	30,5 g/L

Πίνακας 2.1.14. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate buffer) (pH=7,5).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
NaH_2PO_4	69 g/L

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH έως το pH=7,5.

BG11 –N:

Πίνακας 2.1.15. Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου BG11 –N (pH=7,5).

Διαλύματα	**Ποσότητα**
100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N	10 mL/L
1000x κιτρικού σιδήρου (ferric citrate)	1 mL/L
1000x Na_2CO_3	1 mL/L
1000x K_2HPO_4	1 mL/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer)	50 mL/L

Πίνακας 2.1.16. Συστατικά διαλύματος 100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,49 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60 g/L
κιτρικό οξύ	0,60 g/L
NaEDTA, pH=8.0, 0.25M	1,12 mL/L
διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace minerals)	100 mL/L

Πίνακας 2.1.18. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (trace minerals).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,39 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079 g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05 g/L

Πίνακας 2.1.19. Συστατικά διαλύματος 1000x κιτρικού σιδήρου (ferric citrate).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
κιτρικός σίδηρος (ferric citrate)	5,6 g/L

Πίνακας 2.1.20. Συστατικά διαλύματος 1000x Na_2CO_3.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
Na_2CO_3	20 g/L

Πίνακας 2.1.21. Συστατικά διαλύματος 1000x K_2HPO_4.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
K_2HPO_4	30,5 g/L

Πίνακας 2.1.22. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate buffer) (pH=7,5).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
NaH_2PO_4	69 g/L

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH έως το pH=7,5.

BG11 –N-C :

Πίνακας 2.1.23. Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου BG11 –N-C (pH=7,5).

Διαλύματα	**Ποσότητα**
100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N	10 mL/L
1000x $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1 mL/L
1000x K_2HPO_4	1 mL/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer)	50 mL/L

Πίνακας 2.1.24. Συστατικά διαλύματος 100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,49 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60 g/L
NaEDTA, pH=8.0, 0.25M	1,12 mL/L
διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace minerals)	100 mL/L

Πίνακας 2.1.25. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (trace minerals).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,39 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079 g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05 g/L

Πίνακας 2.1.26. Συστατικά διαλύματος 1000x $FeCl_3 \bullet 6H_2O$.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	6,18 g/L

Πίνακας 2.1.27. Συστατικά διαλύματος 1000x K_2HPO_4.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
K_2HPO_4	30,5 g/L

Πίνακας 2.1.28. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate buffer) (pH=7,5).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
NaH_2PO_4	69 g/L

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH έως το pH=7,5.

BG11 NH_4^+ -S:

Πίνακας 2.1.29. Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου BG11 NH_4^+ -S (pH=7,5).

Διαλύματα	**Ποσότητα**
100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N	10 mL/L
1000x κιτρικού σιδήρου (ferric citrate)	1 mL/L
1000x Na_2CO_3	1 mL/L
1000x K_2HPO_4	1 mL/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer)	50 mL/L
NH_4Cl	0,9414 g/L

Πίνακας 2.1.30. Συστατικά διαλύματος 100x BG11 χωρίς Fe, P, C, N.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,1781 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60 g/L
κιτρικό οξύ	0,60 g/L
NaEDTA, pH=8.0, 0.25M	1,12 mL/L
διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace minerals)	100 mL/L

Πίνακας 2.1.31. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (trace minerals).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 g/L
$ZnCl_2$	0,1052 g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,39 g/L
$CuCl \cdot 5H_2O$	0,0539 g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05 g/L

Πίνακας 2.1.32. Συστατικά διαλύματος 1000x κιτρικού σιδήρου (ferric citrate).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
κιτρικός σίδηρος (ferric citrate)	5,6 g/L

Πίνακας 2.1.33. Συστατικά διαλύματος 1000x Na_2CO_3.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
Na_2CO_3	20 g/L

Πίνακας 2.1.34. Συστατικά διαλύματος 1000x K_2HPO_4.

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
K_2HPO_4	30,5 g/L

Πίνακας 2.1.35. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate buffer) (pH=7,5).

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**
NaH_2PO_4	69 g/L

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH έως το pH=7,5.

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 30 min για την αποφυγή μολύνσεων από της μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood), ο οποίος είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

2.2.Προσδιορισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε με δυο τρόπους: την μέτρησης της χλωροφύλλης α στο δείγμα, και την μέτρηση του βάρους της ξηρής μάζας.

2.2.1.Μέτρηση χλωροφύλλης α

Συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας (≤ 1 mL), τοποθετήθηκε σε eppendorf tube και φυγοκεντρήθηκε για 5 min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το πέλετ κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 1 mL μεθανόλης. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 60°C στο σκοτάδι τουλάχιστον για 1 ώρα μέχρι να απομακρυνθούν πλήρως οι χλωροφύλλες και τα καρετονεοειδή από τα κύτταρα. Στην συνέχεια, απομονώθηκε το υπερκείμενο με τις χρωστικές με φυγοκέντρηση και μετρήθηκε η απορρόφηση του στα 710, 665, και 650 nm.
Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a (Chla) προσδιορίστηκε με την χρήση του εξής τύπου [36]:

$$\text{Chla } (\mu g/mL) = 16{,}5\cdot(A_{665}-A_{710})-8{,}3\cdot(A_{650}-A_{710})$$

2.2.2.Μέτρησης βάρους ξηρής μάζας

Συγκεκριμένος όγκος καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η κυτταρική μάζα ξεπλύθηκε 2 φορές με υπερκάθαρο νερό για την απομάκρυνση αλάτων και εξωπολυσακχαριτών από αυτήν. Στην συνέχεια, μεταφέρθηκε σε ένα προζυγισμένο πιατάκι και τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 80°C, ώστε να ξεραθεί και να φτάσει σε ένα σταθερό βάρος. Τέλος, το βάρος μετρήθηκε σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

2.3.Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών

Κύτταρα από την μητρική καλλιέργεια συλλέχθηκαν μετά από 15-18 μέρες από την δημιουργία αυτής, με συγκέντρωση χλωροφύλλης α να έχει τιμή 5-7 μg/mL. Έπειτα, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 rpm για 10 min και επαναιωρήθηκαν σε νέο μέσο καλλιέργειας.

Μελετήθηκαν δύο διαφορετικές πειραματικές σειρές: η πρώτη περιελάμβανε καλλιέργειες σε κλειστό σύστημα στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση της πηγής άνθρακα στην παραγωγή EPS με στέρηση αζώτου, και η δεύτερη περιελάμβανε καλλιέργειες στις οποίες εξετάστηκε η παραγωγή EPS σε παρουσία όλων των συστατικών, σε έλλειψη αζώτου, σε έλλειψη αζώτου και άνθρακα και σε έλλειψη θείου με συνεχή παροχή αέρα..

2.3.1.Καλλιέργειες Κλειστού Τύπου

Στην πρώτη πειραματική σειρά εξετάστηκε η παραγωγή EPS καλλιεργειών *Nostoc calcicola* απουσία αζώτου με διάφορες πηγές άνθρακα σε κλειστό σύστημα. Οι πηγές άνθρακα που εξετάστηκαν ήταν δύο ανόργανες ενώσεις, το ανθρακικό νάτριο και το διοξείδιο του άνθρακα, και δύο οργανικές, η γλυκόζη και το οξικό νάτριο. Οι συγκεκριμένες ενώσεις εξετάστηκαν καθώς το ανθρακικό νάτριο είναι η κύρια πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο BG11, το διοξείδιο του άνθρακα είναι απαραίτητο συστατικό για την φωτοσύνθεση, η γλυκόζη είναι υπόστρωμα της κυτταρικής αναπνοής, ενώ το οξικό νάτριο αποτελεί ενδιάμεσο του μεταβολισμού του κυττάρου.

Ως θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε το BG11 –N-C, ούτως ώστε να μην περιέχει καθόλου άνθρακα και άζωτο και τα αποτελέσματα να εξαρτούνται αποκλειστικά από την επιπρόσθετη πηγή άνθρακα. Επιπλέον μελετήθηκαν και καλλιέργειες που περιείχαν άζωτο υπό την μορφή NH_4^+ (BG11 NH_4^+)[1]. Σημειώνεται ότι όλες οι συνθήκες εξετάστηκαν εις τριπλούν. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες χωρίς επιπλέον προσθήκη πηγής άνθρακα.

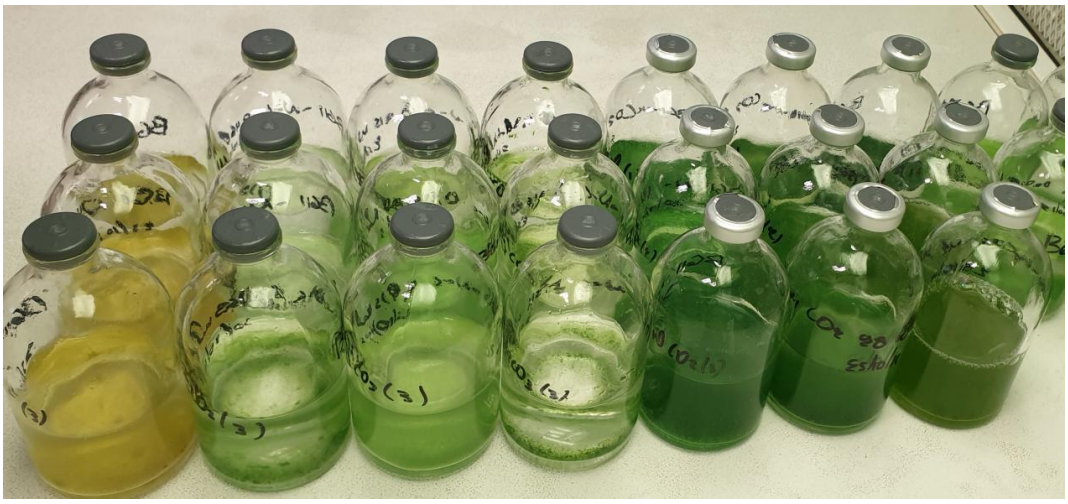
Αφού επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο και προστέθηκε και η απαραίτητη ποσότητα από την ένωση με άνθρακα, κατανεμήθηκαν σε ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκαλάκια με septa διαμέτρου 5 cm και ύψους 9,5 cm με 100 mL συνολική χωρητικότητα όγκου (εικόνα 2.2.1). Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στο μπουκαλάκι ήταν 70 mL και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με

[1] Δεν χρησιμοποιήθηκε το κανονικό BG11, καθώς αυτό περιέχει νιτρικά αλάτια για πηγή αζώτου, τα οποία αντιδρούν με την μέθοδο θυμόλη-θειικό που χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση των υδατανθράκων.

2mg/mL Chla. Τέλος, τα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) και αναδεύονταν κατά την διάρκεια του πειράματος με συχνότητα 140-145 min^{-1}, σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25±1°C υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 20,25 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Πίνακας 2.3.1.1.:Συγκεντρώσεις ενώσεων με άνθρακα σε κάθε συνθήκη που μελετήθηκαν στις καλλιέργειες *Nostoc calcicola.*

# συνθήκης	Όνομα συνθήκης	Συγκέντρωση ένωσης με άνθρακα
1	BG11 NH_4^+	-
2	BG11 –N-C	-
3	BG11 –N-C Na_2CO_3 1	43,62 μg/mL
4	BG11 –N-C Na_2CO_3 2	87,24 μg/mL
5	BG11 –N-C Na_2CO_3 3	130,86 μg/mL
6	BG11 –N-C CH_3COONa 1	145 μg/mL
7	BG11 –N-C CH_3COONa 2	290 μg/mL
8	BG11 –N-C CH_3COONa 3	435 μg/mL
9	BG11 –N-C CO_2 1	0,2 mL/mL
10	BG11 –N-C CO_2 2	0,4 mL/mL
11	BG11 –N-C CO_2 3	0,6 mL/mL
12	BG11 –N-C γλυκόζη 1	10,12 μg/mL
13	BG11 –N-C γλυκόζη 2	20,25 μg/mL



Εικόνα 2.3.1.1. Ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκαλάκια με septa διαμέτρου 5 cm και ύψους 9,5 cm με 100 mL συνολική χωρητικότητα όγκου.

2.3.2.Καλλιέργειες με συνεχή παροχή αέρα

Στην δεύτερη πειραματική σειρά, μελετήθηκε η παραγωγή EPS σε παρουσία όλων των συστατικών, σε έλλειψη αζώτου, σε έλλειψη αζώτου και άνθρακα και σε έλλειψη θείου με συνεχή παροχή αέρα. Με αυτό τον τρόπο, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αυτότροφα, εκμεταλλευόμενες το

διοξείδιο του άνθρακα μέσω της φωτοσύνθεσης και καθηλώνοντας άζωτο, παρά τις ελλείψεις στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Ως καλλιέργεια μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο που περιείχε άνθρακα, άζωτο και θείο (BG11 NH_4^+). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι συνθήκες που μελετήθηκαν:

Πίνακας 2.3.2.1. Συνθήκες που μελετήθηκαν στις καλλιέργειες *Nostoc calcicola* με διοχέτευση αέρα.

# συνθήκης	Όνομα συνθήκης
1	BG11 NH_4^+
2	BG11 –N
3	BG11 –N-C
4	BG11 –S

Αφού επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες 250mL (εικόνα 2.1.1). Χρησιμοποιήθηκε ειδικό πώμα από βαμβάκι και γάζα, το οποίο διαπερνούσε μια πιπέτα παστέρ για να διοχετεύει τον αέρα στο εσωτερικό της καλλιέργειας. Η πιπέτα στο εσωτερικό της είχε ένα κομμάτι βαμβάκι για να φιλτράρει τον αέρα από μικροοργανισμούς. Το πάνω μέρος της πιπέτας ήταν συνδεδεμένο με μια αντλία αέρα. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στην κωνική ήταν 200 mL και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με 2mg/mL Chla. Τέλος, συνδέθηκε το ειδικό πώμα με συσκευή διοχέτευσης αέρα.

Εικόνα 2.3.1.2. Καλλιέργειες *Nostoc Calcicola* σε κωνικές φιάλες με συνεχή παροχή αέρα.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25±1ºC και υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 20,25μE·m^{-2}·s^{-1}. Η παροχή αέρα παρείχε επιπλέον στις καλλιέργειες ανάδευση.

2.4.Δειγματοληψία

Κατά την διάρκεια του πειράματος συλλέγονταν δείγματα των 2 mL από την πρώτη πειραματική σειρά και 3 mL από την δεύτερη.

Από τα μπουκαλάκια, η δειγματοληψία γινόταν με την χρήση σύριγγας με βελόνα, η οποία προηγουμένως είχε αποστειρωθεί με αιθανόλη. Η βελόνα καιγόταν με φωτιά για να εξατμιστεί η αιθανόλη, ώστε να μην εισαχθεί στην καλλιέργεια και σκοτώσει τα κύτταρα. Τα πώματα από τα μπουκαλάκια είχαν προηγουμένως απολυμανθεί εξωτερικά με αιθανόλη. Στις κωνικές φιάλες, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με πιπέτες Gilson, αφού πρώτα τα tips είχαν αποστειρωθεί.

Και στις δύο περιπτώσεις, η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν μετά από καλή ανάδευση των καλλιεργειών και σε θάλαμο νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας.

2.5.Ποσοτικός προσδιορισμός εξωπολυσακχαριτών

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν μόνο οι ελεύθεροι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας και όχι αυτοί που είναι προσκολλημένοι στην κυτταρική επιφάνεια με μια τροποποιημένη μέθοδο θυμόλης-θειικού [37]. Σε 1 mL υπερκείμενου καλλιέργειας, που απομονώθηκε προηγουμένως, προστέθηκε 1 mL 4N HCl και επωάστηκε στους 100°C για 2 ώρες ώστε να υδρολυθεί ο πολυσακχαρίτης στα μονομερή του. Σε 100 μL από το μίγμα αυτό προστέθηκαν, έπειτα, 300μL διαλύματος θυμόλης (1 mg/mL θυμόλη διαλυμένη σε θειικό οξύ). Το μίγμα, αφού αναδεύτηκε καλά με την χρήση vortex, επωάστηκε στους 110°C για 30min. Αφότου τα δείγματα ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 509 nm. Ως τυφλό, χρησιμοποιήθηκαν 100μL διαλύματος HCl 4N:απιονισμένου νερού 1:1, το οποίο είχε και αυτό επωαστεί για 2 ώρες στους 100°C, σε 300μL διαλύματος θυμόλης. Παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με την χρήση διαλύματος γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση 1 mg/mL και πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις μέχρι η τελική συγκέντρωση να ήταν 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 και 0.01 mg/mL.

2.6.Ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford [38, 39]. Τα διαλύματα που χρησιμοποιηθήκαν σε αυτήν την μέθοδο ήταν τα εξής:

Stock διάλυμα Bradford:

- 100 mL 95% αιθανόλης
- 200 mL 88% φωσφορικού οξέος
- 350 mg χρωστικής Sterva Blue G

Διάλυμα Bradford:

- 425 mL νερό
- 15 mL 95% αιθανόλης
- 30 mL 88% φωσφορικού οξέος
- 30 mL Stock διάλυμα Bradford

Σε 100 μL δείγματος, τοποθετήθηκε 1 mL διαλύματος Bradford και αναδεύτηκαν καλά. Μετά από 5 min επώαση, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595nm. Για την πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πρωτεΐνης BSA από 2,5 έως 15 μg/mL.

2.7.Παρατήρηση με οπτική μικροσκοπία

Για την παρατήρηση των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση της ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού Plan Apo 60x και η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με χρήση της CCD κάμερας ProgRes CF.

3.Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου και άνθρακα και σε θρεπτικό παρουσία αμμωνιακών και άνθρακα

Στην παρούσα πειραματική διατριβή πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές σειρές για την μελέτη της παραγωγής EPS από τον μικρο-οργανισμό *Nostoc calcicola*. Στην πρώτη πειραματική σειρά μελετήθηκε η παραγωγή των EPS σε διάφορες πηγές άνθρακα (Na_2CO_3, CO_2, γλυκόζη και CH_3COONa) καθώς και σε απουσία άνθρακα υπό έλλειψη αζώτου. Συνεπώς, η έλλειψη αζώτου χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας καταπόνησης ώστε να επάγει την αύξηση παραγωγής EPS [31]. Στην συγκεκριμένη πειραματική σειρά οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε κλειστά συστήματα ώστε να μην γίνεται ανταλλαγή αερίων με την ατμόσφαιρα. Η δεύτερη πειραματική σειρά πραγματοποιήθηκε σε τέσσερεις διαφορετικές συνθήκες, παρουσία όλων των θρεπτικών στοιχείων, έλλειψη αζώτου, έλλειψη αζώτου και άνθρακα και έλλειψη θείου. Ωστόσο, στην δεύτερη πειραματική σειρά στις καλλιέργειες γινόταν συνεχής διοχέτευση ατμοσφαιρικού αέρα.

Σε αυτή την ενότητα, θα εξεταστούν 2 βασικές συνθήκες, σε έλλειψη αζώτου και άνθρακα, η οποία αποτελεί την καλλιέργεια-μάρτυρας και παρουσία αζώτου (NH_4^+) και άνθρακα. Ο λόγος που ελέγχθηκε η συνθήκη των αμμωνιακών ήταν ότι στο θρεπτικό μέσο BG11, το άζωτο υπήρχε κατά κύριο λόγο σε μορφή NO_3^-. Ωστόσο, βρέθηκε ότι τα νιτρικά έδιναν έγχρωμο προϊόν στην μέθοδο θυμόλης-θείου για την μέτρηση των υδατανθράκων, γι' αυτό αντικαταστήθηκαν με αμμωνιακά.

Στην εικόνα 3.1.1.a., παρουσιάζεται διαγραμματικά η συγκέντρωση της χλωροφύλλης α συναρτήσει του χρόνου σε θρεπτικά BG11 NH_4^+ και BG11 –N-C. Σε θρεπτικό χωρίς ελλείψεις, εμφανίστηκε μικρή αύξηση αυτής στα 2,3151μg/mL μέχρι την $3^η$ ημέρα. Αυτό οφειλόταν στην ύπαρξη άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, δηλαδή απόθεμα τροφής για την καλλιέργεια, η οποία μπορούσε, έτσι, να αναπτυχθεί. Στην συνέχεια, σημειώθηκε συνεχής μείωση της συγκέντρωσης της Chla μέχρι και το τέλος του πειράματος, με χαμηλότερη τιμή στα 1,5901μg/mL την τελευταία μέρα ($28^η$).

Από την άλλη πλευρά, στο θρεπτικό μέσο BG11 –N-C δεν σημειώθηκε καμία αύξηση στην ποσότητα χλωροφύλλης α. Τα κύτταρα της καλλιέργειας δεν διέθεταν άνθρακα στο περιβάλλον τους για να τον προσλάβουν ως επιπλέον ενέργεια, άρα χρησιμοποίησαν τα ενεργειακά τους αποθέματα σε άλλες δραστηριότητες και όχι στην ανάπτυξη. Επίσης, εξαιτίας του ότι το σύστημα των καλλιεργειών ήταν κλειστό, δεν λαμβα-

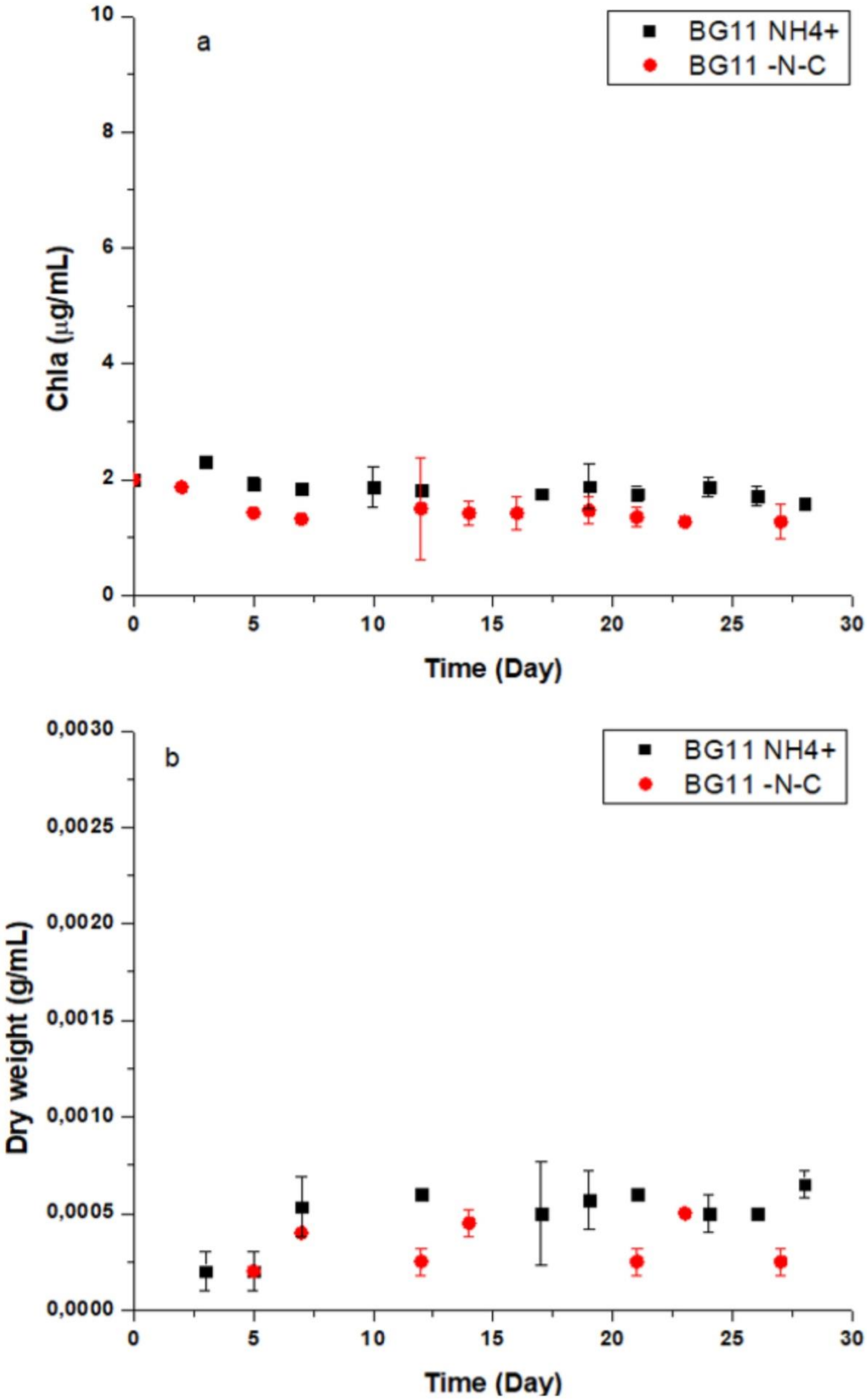
νόταν CO_2 από τα κύτταρα ως πηγή άνθρακα, η οποία θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μέσω της φωτοσύνθεσης. Η χαμηλότερη τιμή χλωροφύλλης α που εμφανίστηκε ήταν την τελευταία πειραματική μέρα ($27^η$) στα 1,2689μg/mL.

Στο διάγραμμα 3.1.1.b σημειώθηκαν οι τιμές συγκέντρωσης ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Στο διάγραμμα φαίνεται πως, από την μέρα 8 και έπειτα, δεν παρουσιάστηκε καμία ανάπτυξη της βιομάζας μέχρι το τέλος του πειράματος και στα δύο θρεπτικά μέσα. Η μέγιστη τιμή της βιομάζας στο μέσο BG11 NH_4^+ ήταν 0,0006g/mL την τελευταία πειραματική μέρα ($28^η$) κι στο θρεπτικό μέσο BG11–N-C 0,0005g/mL την $13^η$ μέρα.

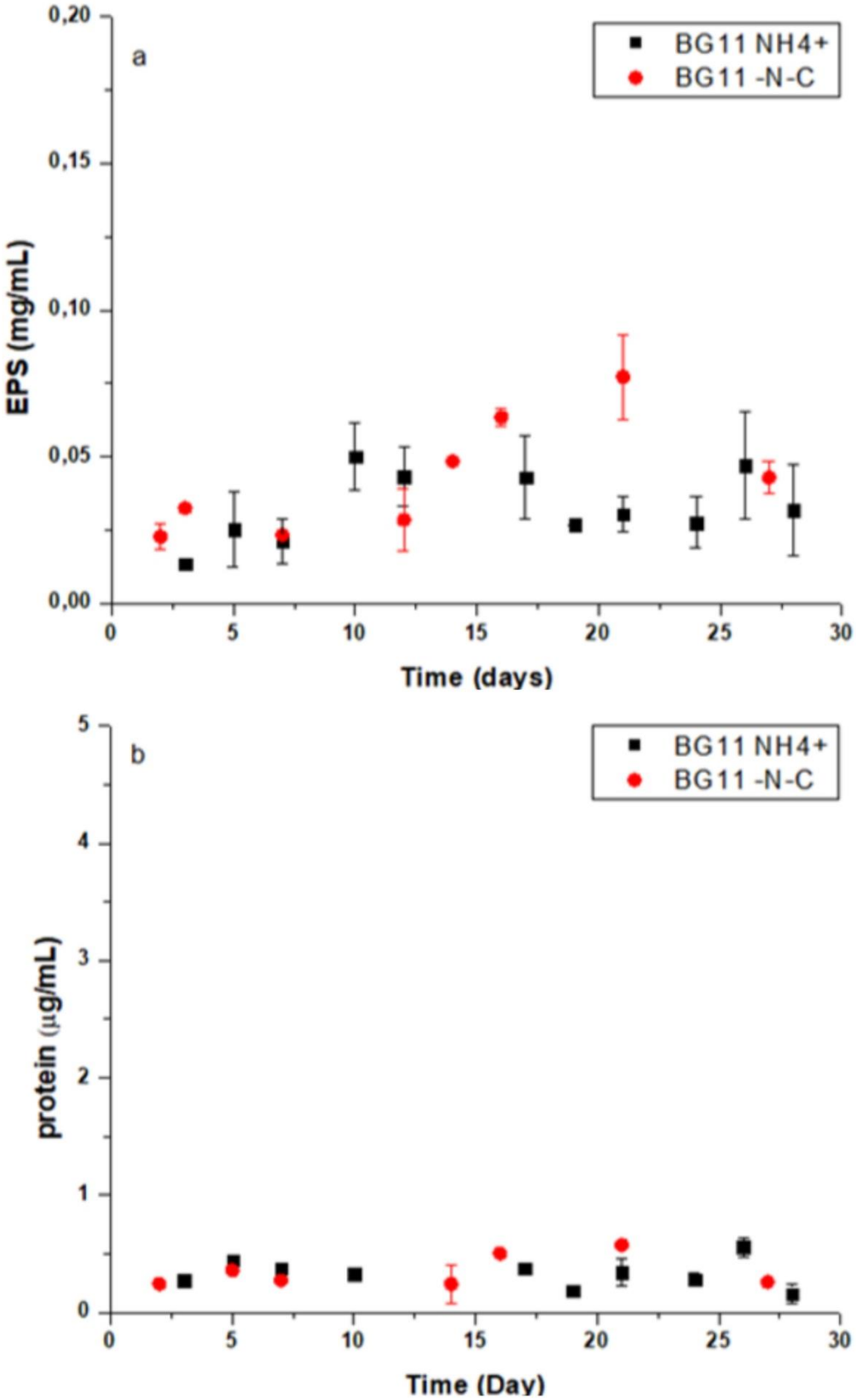
Στην συνέχεια, μέσω της εικόνας 3.1.2., λαμβάνονται αποτελέσματα για την παραγωγή EPS και πρωτεϊνών στο υπερκείμενο της καλλιέργειας σε θρεπτικά μέσα BG11 NH_4^+ και BG11 –N-C. Τα διαγράμματα που απεικονίζουν την ποσοτικοποίηση των πεπτιδίων εμφάνισαν ένα τεχνικό πρόβλημα. Σε όλες σχεδόν τις πειραματικές σειρές, υπήρχε ένας αριθμός δειγμάτων των οποίων τα υπερκείμενα, μετά την επεξεργασία απομόνωσης καθαρού υπερκείμενου, εμφάνιζαν μια ελαφριά μπλε απόχρωση που οφειλόταν στην χρωστική φυκοκυανίνη που απελευθερωνόταν στο διάλυμα. Ωστόσο, η μέτρηση βασίζεται σε ένα έγχρωμο σύμπλεγμα της πρωτεΐνης με την χρωστική Sterva Blue G. Επομένως, οι μετρήσεις των πρωτεϊνών δεν θα μπορούσαν να είναι αξιόπιστες, μιας και μετρήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης ανάλογα με την ένταση του χρώματος και δεν εμφάνισαν επαναληψιμότητα. Γι' αυτόν το λόγο, κάθε υπερκείμενο που είχε μπλε χρώμα θεωρήθηκε ακατάλληλο για την μέτρηση των πρωτεϊνών και έγινε επιλογή των τιμών που θα χρησιμοποιούνταν για τα διαγράμματα πέρα της στατιστικής ανάλυσης (εξ ου και ο μικρότερος αριθμός σημείων στα διαγράμματα). Οι μετρήσεις των υδατανθράκων ήταν όμοιες σε υπερκείμενα με ποικίλες αποχρώσεις του μπλε στην ίδια συνθήκη.

Σύμφωνα με το διάγραμμα, επιπλέον, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη παραγωγή EPS μεταξύ των δύο συνθηκών εμφάνισαν οι καλλιέργειες στο θρεπτικό μέσο –N-C. Το αποτέλεσμα συμβαδίζει με την βιβλιογραφία [31], καθώς η παραγωγή EPS είναι πιο έντονη στην συνθήκη που επιφέρει πιο πολύ στρες στο κύτταρο. Ειδικότερα, η μέγιστη συγκέντρωση EPS στην –N-C συνθήκη ήταν 0,07717mg/mL την $21^η$ ημέρα, ενώ στην συνθήκη NH_4^+ ήταν 0,05008 mg/mL την $10^η$ ημέρα.

Το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός παρήγαγε κάποια ποσότητα EPS και στην συνθήκη μάρτυρα (NH_4^+), αποτελεί ένδειξη ότι η παραγωγή EPS είναι μία φυσιολογική διαδικασία για τα κύτταρα αυτά, με την διαφορά ότι σε φυσιολογικές συνθήκες παράγεται με χαμηλότερο ρυθμό με σχέση τις συνθήκες που επιφέρουν στρες.



Εικόνα 3.1.1. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο BG11 NH_4^+ και BG11 –N-C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης a σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).



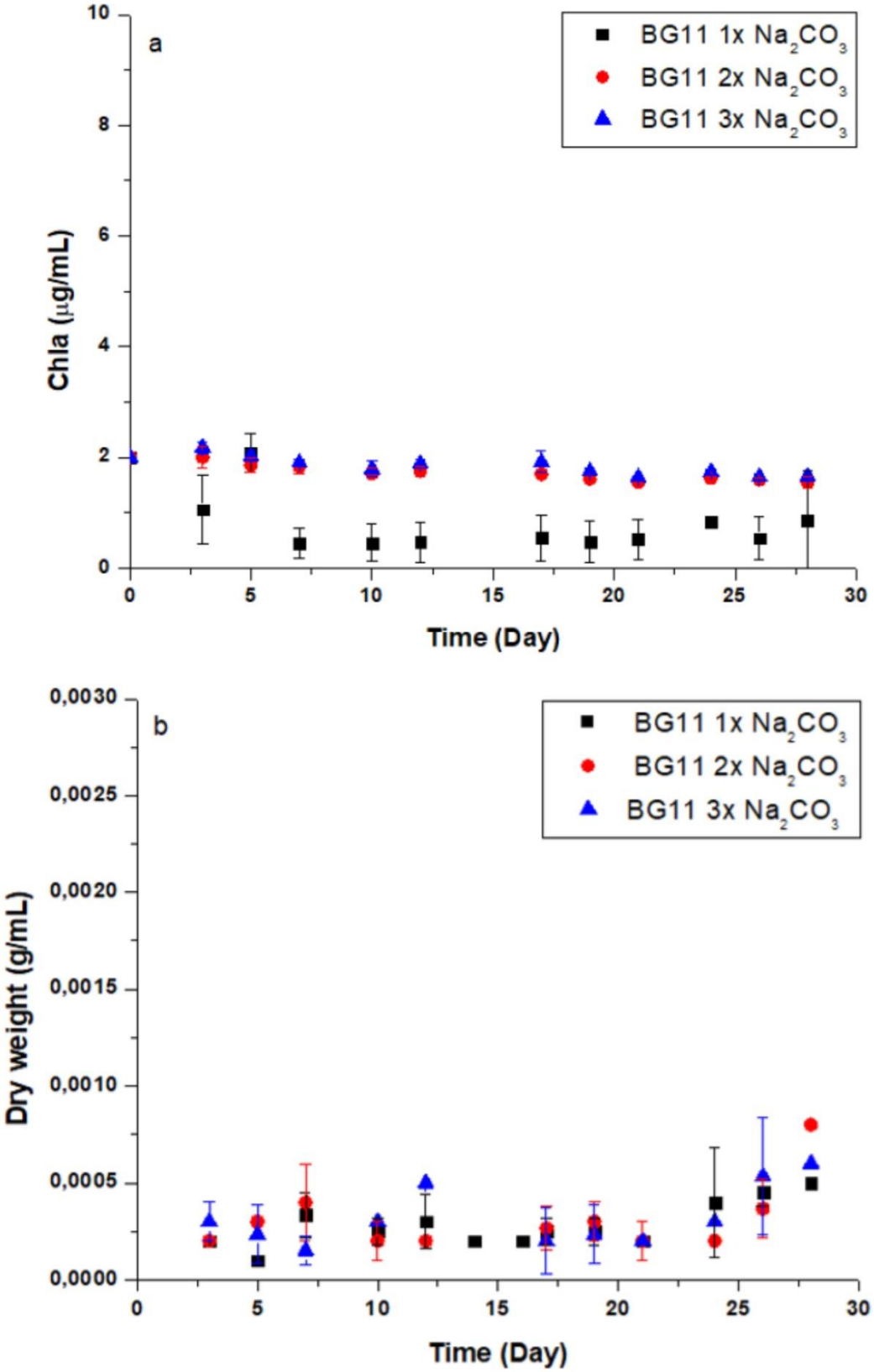
Εικόνα 3.1.2. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο BG11 NH_4^+ και BG11 –N-C. Συγκέντρωση EPS σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).

3.2.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα με μορφή ανθρακικών ιόντων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις

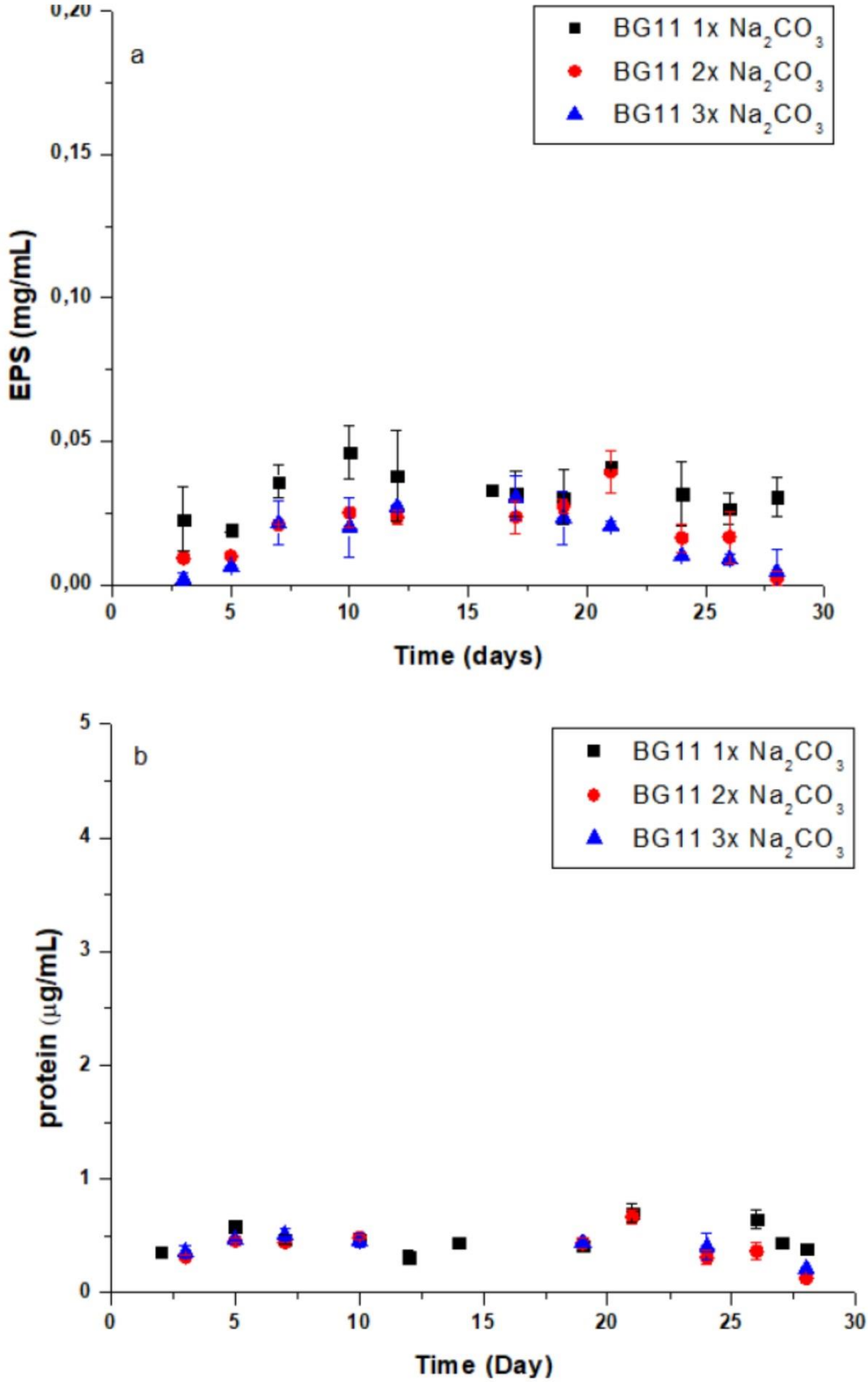
Σε αυτή την ενότητα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης παραγωγής εξωπολυσακχαρίτη παρουσία ανθρακικών ιόντων ως πηγή άνθρακα. Το κλειστό σύστημα όπου αναπτύχθηκε η καλλιέργεια περιείχε θρεπτικό χωρίς άζωτο παρουσία ανθρακικού νατρίου ως μοναδική μορφή άνθρακα. Μελετήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις ανθρακικών ιόντων : 1x Na_2CO_3, 2x Na_2CO_3, 3x Na_2CO_3 όπου 1x αντιστοιχούσαν στα mol άνθρακα που περιέχει κανονικά το θρεπτικό BG11.

Η εικόνα 3.2.1.α. αναπαριστά διαγραμματικά την συγκέντρωση χλωροφύλλης α στις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις ανθρακικών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο. Και στις τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α από την αρχική 2μg/mL. Σε κάθε πειραματική μέρα, οι συγκεντρώσεις είχαν την σχέση 3x > 2x > 1x, το οποίο ήταν ανάλογο με την ποσότητα άνθρακα που είχε προστεθεί σε κάθε συνθήκη. Εμπόδιο στην ανάπτυξη της καλλιέργειας, παρά την ύπαρξη αξιοποιήσιμης ποσότητας άνθρακα στάθηκε η έλλειψη αζώτου, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί η συνεχής μείωση της χλωροφύλλης. Την τελευταία πειραματική ημέρα οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a ήταν 0,8486 , 1,5489 και 1,6559μg/mL για τις συγκεντρώσεις 1x, 2x και 3x αντίστοιχα.

Στην εικόνα 3.2.2. αναπαριστάται η συγκέντρωση EPS και πρωτεϊνών σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η μέγιστη παραγωγή EPS σημειώθηκε στην BG11 1x Na_2CO_3 συνθήκη με ακόλουθες τις άλλες δυο συνθήκες με μικρή διαφορά μεταξύ τους. Ωστόσο, μεταξύ αυτών των δύο συνθηκών στα περισσότερα σημεία μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφάνισε η 2x Na_2CO_3 έναντι της 3x Na_2CO_3. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις EPS ανά συνθήκη ήταν 0,04623, 0,03934 και 0,02719mg/mL στις συνθήκες 1x Na_2CO_3, 2x Na_2CO_3 και 3x Na_2CO_3 αντίστοιχα. Συγκριτικά με την καλλιέργεια-μάρτυρα (0,05008mg/mL), η οποία αναπτύχθηκε με έλλειψη αζώτου και άνθρακα (αναλύθηκε στην ενότητα 3.1.), η παραγωγή EPS εδώ ήταν μειωμένη. Αυτό το αποτέλεσμα είναι λογικό, διότι, όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία [31], η παραγωγή EPS είναι πολύ μεγαλύτερη όσο το στρες αυξάνεται, δηλαδή όσο η ποσότητα άνθρακα στην καλλιέργεια μειώνεται.



Εικόνα 3.2.1. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο BG11 –N-C με επιπρόσθετο Na_2CO_3 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκέντρωση χλωροφύλλης α σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).



Εικόνα 3.2.2. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο BG11 –N-C με επιπρόσθετο Na_2CO_3 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκέντρωση EPS σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).

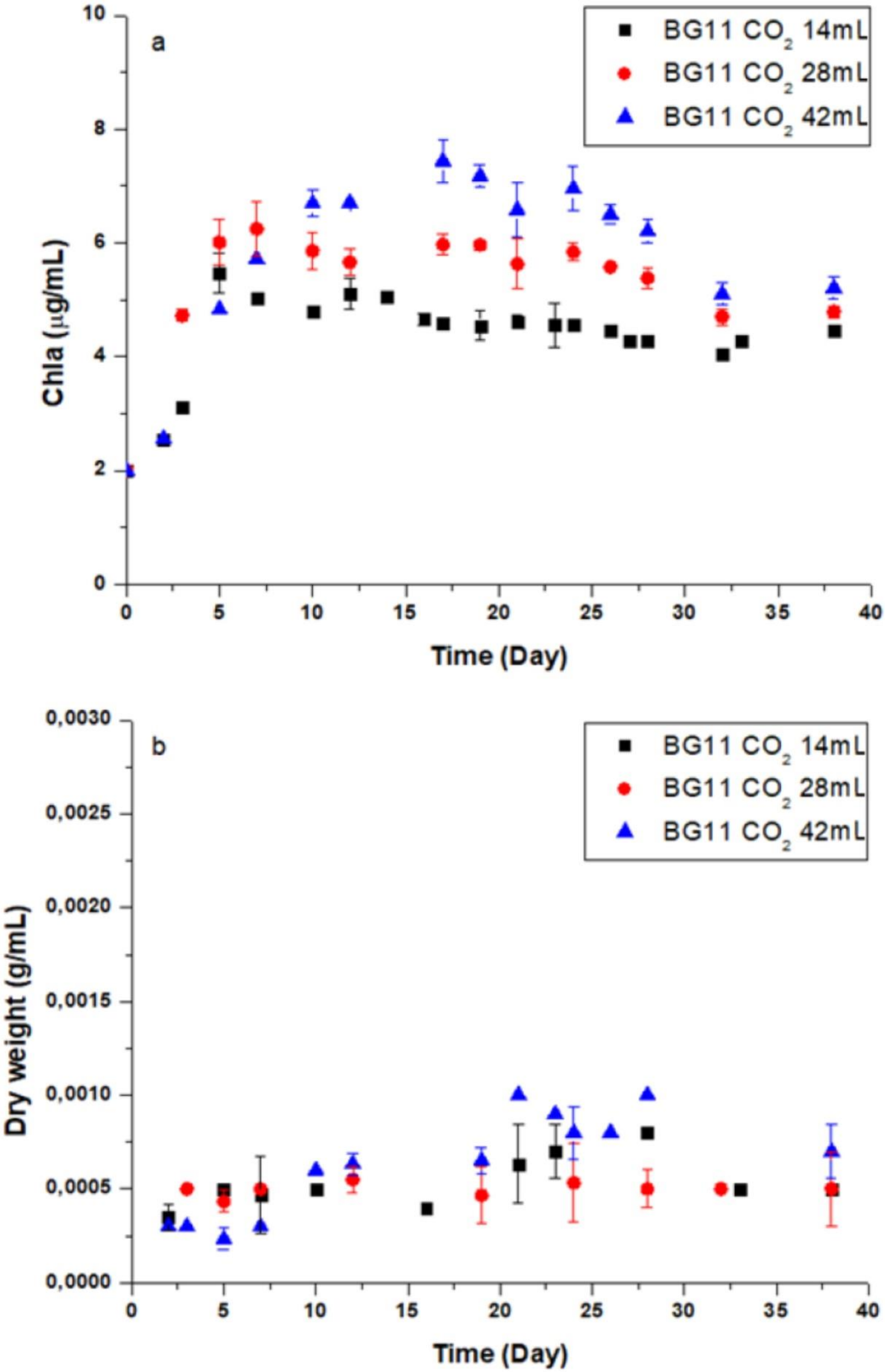
3.3.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα ως διοξείδιο του άνθρακα σε τρεις διαφορετικές ποσότητες

Στην συγκεκριμένη θεματική ενότητα, έγινε μελέτη της παραγωγής EPS σε έλλειψη αζώτου χρησιμοποιώντας CO_2 σε τρεις διαφορετικές ποσότητες. Τα mol άνθρακα του CO_2 δεν είχαν κάποια αντιστοιχία με τα mol άνθρακα του θρεπτικού BG11 όπως στις δύο προηγούμενες ενότητες. Προσεγγιστικά θα μπορούσε να ειπωθεί πως ήταν 10x, 20x και 30x mol άνθρακα του BG11 οι αντίστοιχες ποσότητες των 14 mL, 28 mL και 42 mL CO_2. Στόχος εδώ ήταν, επομένως, να παρατηρηθεί εάν υπάρχει ικανοποιητική παραγωγή EPS με παρουσία μεγάλης ποσότητας άνθρακα.

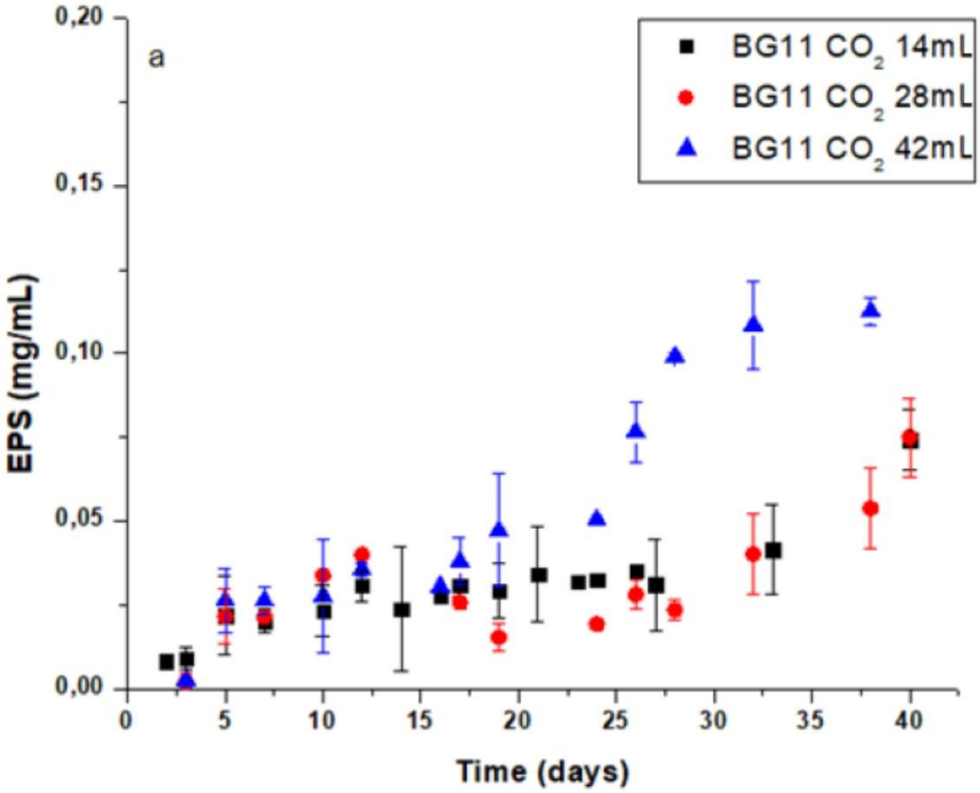
Η καμπύλη της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης έδειξε μια ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη συναρτήσει του χρόνου ήδη από τις πρώτες ημέρες. Σημειώθηκε μια αναλογική αύξηση της συγκέντρωση της ως προς την ποσότητα CO_2 που είχε προστεθεί. Η μέγιστη συγκέντρωση χλωροφύλλης που σημειώθηκε ήταν 5,46473, 6,24493 και 7,4397μg/mL για τις ποσότητες 14, 28 και 42mL CO_2 αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβαδίζουν και με την αύξηση της ξηρής βιομάζας όπως φαίνεται στο διάγραμμα b της εικόνας 3.3.1. Συνεπώς παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας παρόλο που ο οργανισμός βρισκόταν σε συνθήκη στέρησης αζώτου.

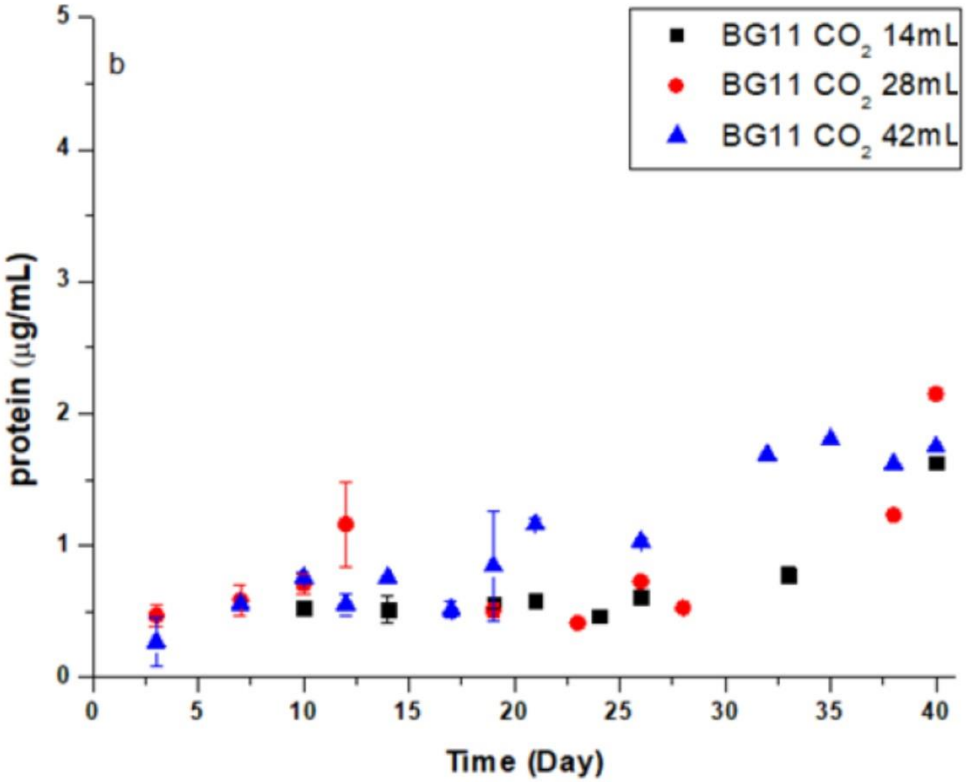
Το CO_2 εμφάνισε μια αντίθετη συμπεριφορά στην παραγωγή EPS σε σχέση με τα ανθρακικά (εικόνα 3.3.2.). Η μεγαλύτερη παραγωγή παρατηρήθηκε στα 42 mL CO_2 έναντι των 14 και 28mL. Επιπλέον, τις τελευταίες 10 πειραματικές ημέρες παρατηρήθηκε μία δεύτερη παραγωγή EPS (η πρώτη παραγωγή EPS ξεκίνησε την $5^{η}$ ημέρα και μετά η συγκέντρωσή τους παρέμεινε σχετικά σταθερή μέχρι την δεύτερη παραγωγή). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις EPS στην παρούσα ενότητα ήταν 0,07409, 0,07503 και 0,11258mg/mL αντίστοιχα για τα 14, 28 και 42 mL CO_2. Είναι εμφανές, από το διάγραμμα, πως η παραγωγή EPS θα συνέχιζε και μετά το πέρας των σαράντα ημερών (τελευταία πειραματική μέρα) στις συνθήκες 14 και 28 mL CO_2. Ωστόσο λόγω περιορισμένου όγκου καλλιέργειας αποφασίστηκε η διακοπή του πειράματος.

Συμπερασματικά, σε έλλειψη αζώτου παρουσία CO_2, η παραγωγή EPS αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας άνθρακα. Μάλιστα, η παραγωγή ξεπερνάει την μεγαλύτερη μέχρι τώρα παραγωγή της συνθήκης – N-C.



Εικόνα 3.3.1. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο BG11 –N-C παρουσία CO_2 σε τρεις διαφορετικές ποσότητες. Συγκέντρωση χλωροφύλλης a σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).





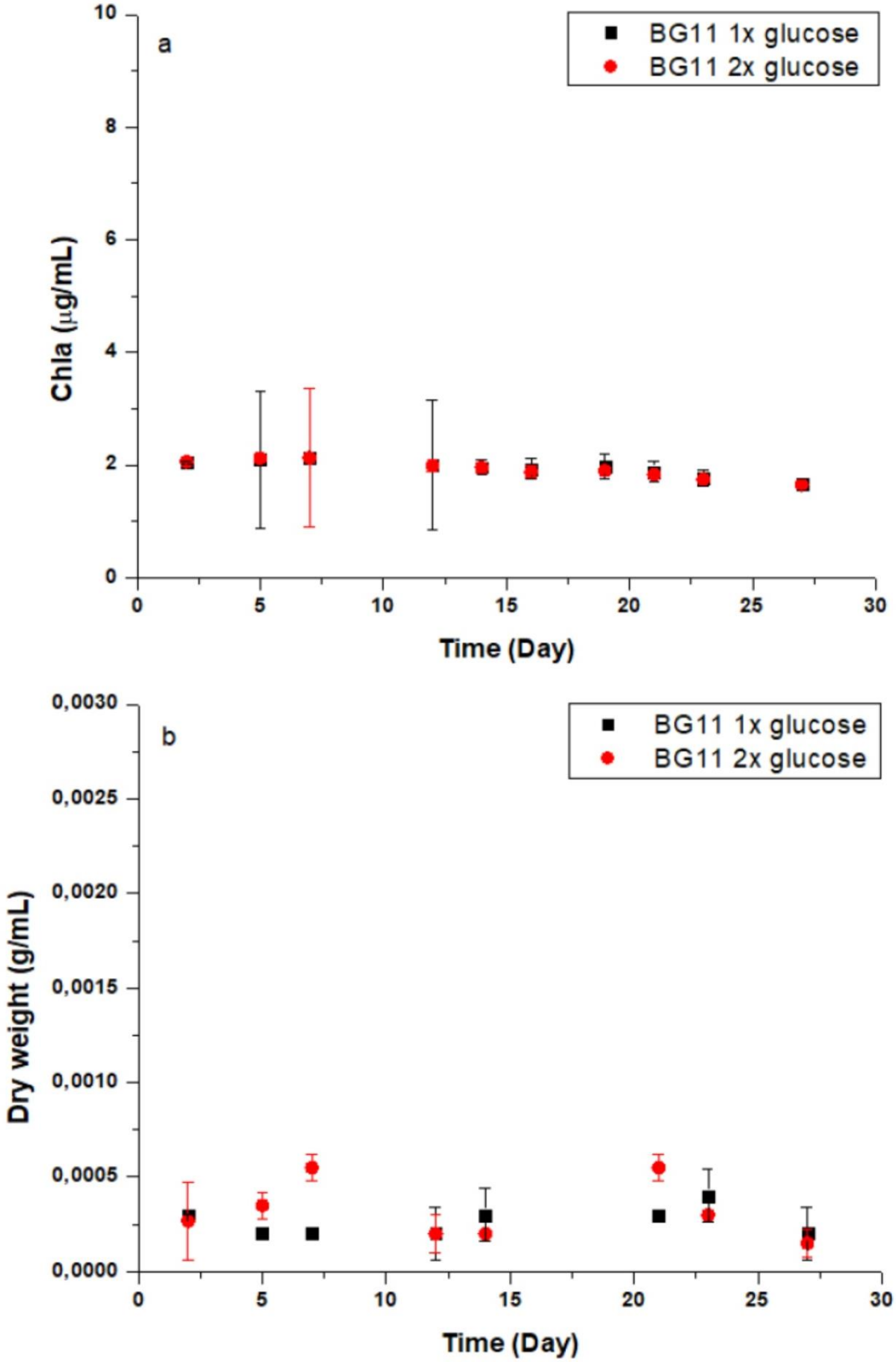
Εικόνα 3.3.2. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό μέσο BG11 –N-C παρουσία CO_2 σε τρεις διαφορετικές ποσότητες. Συγκέντρωση EPS σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).

3.4.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα ως γλυκόζη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις

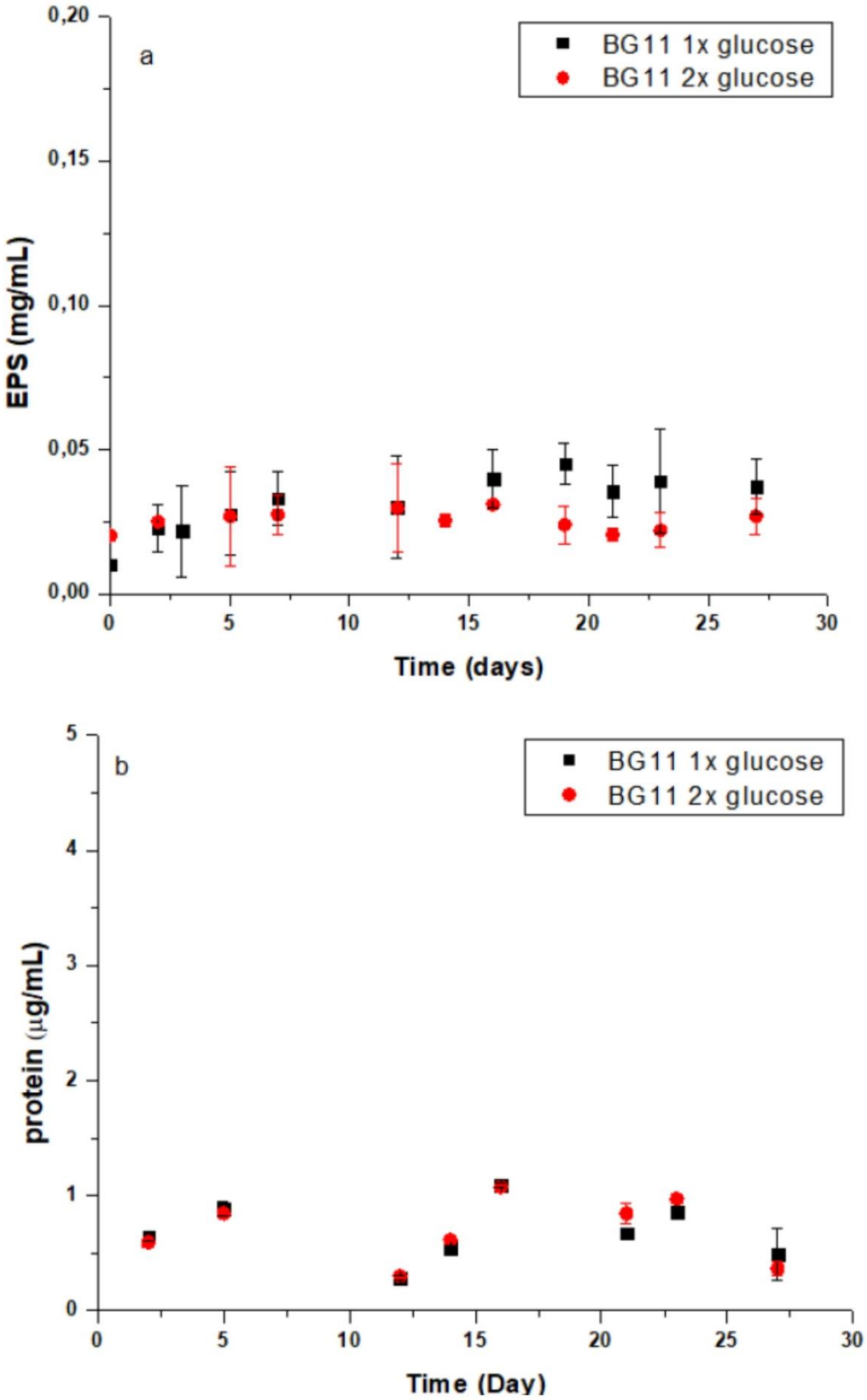
Στην παρούσα ενότητα εξετάστηκε η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα σε έλλειψη αζώτου. Μελετήθηκαν δύο συγκεντρώσεις γλυκόζης: BG11 1x και 2x όπου αντιστοιχούν στα mol άνθρακα του θρεπτικού μέσου BG11 και στα διπλάσια mol αντίστοιχα.

Όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα a της εικόνας 3.4.1., οι δύο διαφορετικές συνθήκες δεν εμφάνισαν διαφορά μεταξύ τους στην συγκέντρωση χρωστικών. Οι καλλιέργειες αυτές διατήρησαν σχετικά σταθερή συγκέντρωση της χλωροφύλλης κοντά στα 2μg/mL χωρίς καμία αύξηση της κατά την διάρκεια του χρόνου. Την τελευταία μέρα η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a ήταν γύρω 1,656μg/mL. Όσο αφορά τα ξηρά βάρη στο συγκεκριμένο πείραμα και στις δύο συγκεντρώσεις της γλυκόζης παρέμειναν σχετικά σταθερά κοντά στα 0,0003g/mL.

Το πείραμα της παρούσας ενότητας αποσκοπούσε κυρίως στην ποιοτική παρατήρηση του κατά πόσο η προσθήκη γλυκόζης, ενός σακχάρου που περιέχετε στην σύσταση του εξωπολυσακχαρίτη [32], επηρεάζει την παραγωγή EPS. Ωστόσο, ως σάκχαρο, η γλυκόζη αντιδρά με την μέθοδο θυμόλης-θειικού, με αποτέλεσμα να προσδίδει επιπλέον σήμα στην μέτρηση του εξωπολυσακχαρίτη και να μην είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της παραγόμενης ποσότητας EPS. Συμπερασματικά, από το διάγραμμα των υδατανθράκων στην εικόνα 3.4.2.α., αύξηση της ποσότητας της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο μείωνε την παραγωγή EPS. Συνεπώς, η γλυκόζη είχε παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των ανθρακικών.



Εικόνα 3.4.1. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε συνθετικό μέσο BG11 –N-C με επιπρόσθετη γλυκόζη σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκέντρωση χλωροφύλλης α σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).



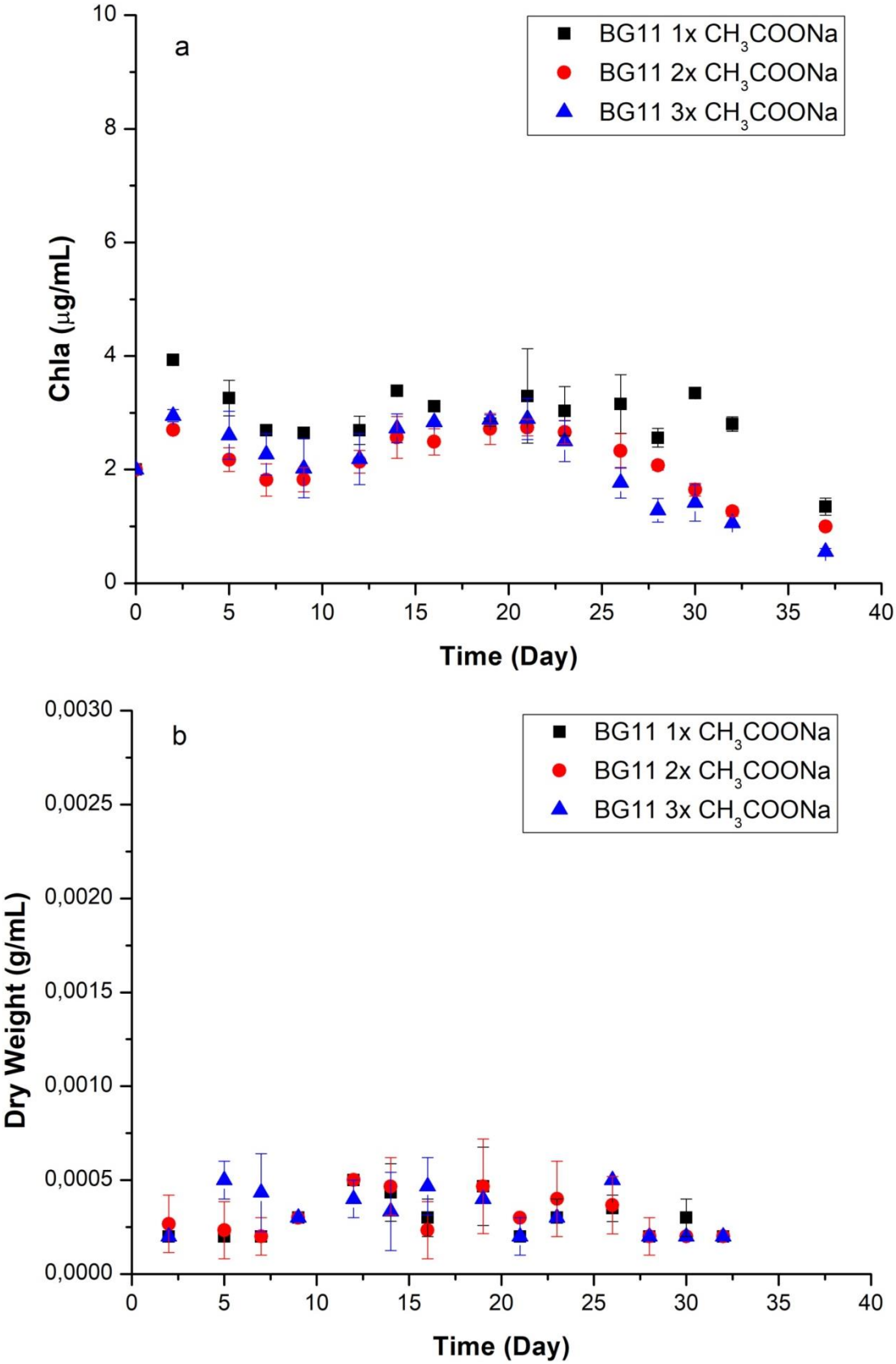
Εικόνα 3.4.2. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε συνθετικό μέσο BG11 –N-C με επιπρόσθετη γλυκόζη σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκέντρωση EPS σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε συνάρτηση με τον χρόνο.

3.5.Μελέτη παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε θρεπτικό με έλλειψη αζώτου και παρουσία άνθρακα ως οξικά ιόντα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις

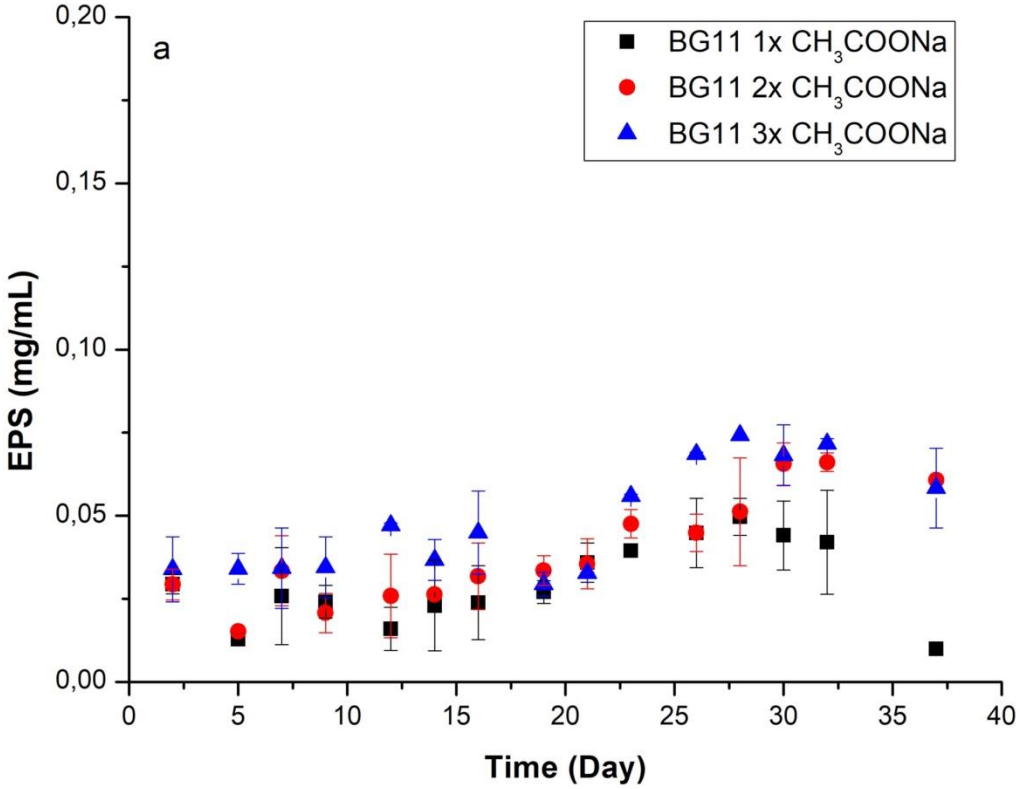
Σε αυτή την ενότητα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης παραγωγής εξωπολυσακχαρίτη σε έλλειψη αζώτου παρουσία οξικών ιόντων ως πηγή άνθρακα. Το κλειστό αυτό σύστημα περιείχε θρεπτικό χωρίς άνθρακα και άζωτο, με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων οξικού νατρίου. Μελετήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις ανθρακικών: 1x CH_3COONa, 2x CH_3COONa, 3x CH_3COONa όπου 1x αντιστοιχούσαν στα mol άνθρακα που περιέχει κανονικά το θρεπτικό BG11.

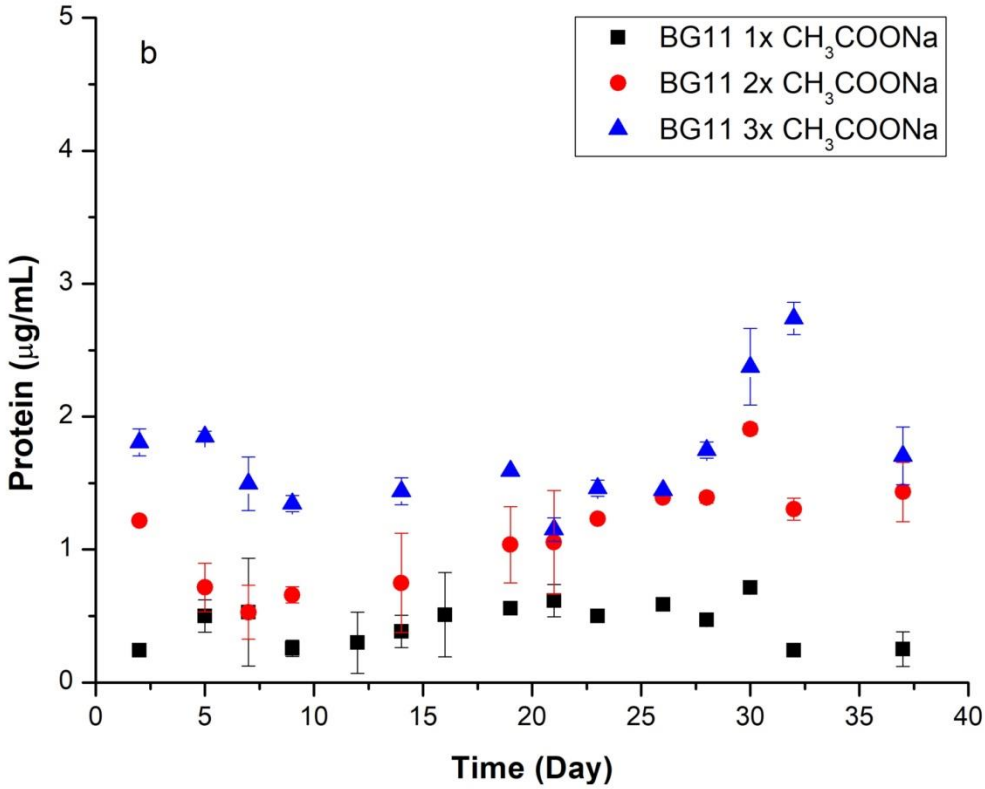
Η εικόνα 3.5.1.α. αναπαριστά διαγραμματικά την συγκέντρωση χλωροφύλλης α στις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις οξικών ιόντων συναρτήσει του χρόνου. Και στις τρεις περιπτώσεις σημειώθηκε παρόμοια συμπεριφορά: τις πρώτες 2 μέρες παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης χλωροφύλλης, και στην συνέχεια μείωση μέχρι και την 9η μέρα. Έπειτα, σημειώθηκε μια δεύτερη αύξηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης, που όμως δεν ξεπέρασε την πρώτη, μέχρι και την 21η μέρα. Τέλος, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης α εμφάνισε σταθερή μείωση μέχρι το τέλος του πειράματος. Σε κάθε πειραματική μέρα, οι συγκεντρώσεις είχαν την σχέση 1x > 2x ≅ 3x. Την τελευταία πειραματική ημέρα, η συγκέντρωση χλωροφύλλης που σημειώθηκε ήταν 1,3467 , 1,0000 και 0,5565μg/mL για τις συγκεντρώσεις 1x, 2x και 3x αντίστοιχα.

Στην εικόνα 3.5.2.α. αναπαριστάται η συγκέντρωση EPS και πρωτεϊνών σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η μέγιστη παραγωγή EPS σημειώθηκε στην BG11 3x CH_3COONa συνθήκη με ακόλουθες τις άλλες δυο συνθήκες, όμως, τις τελευταίες μέρες του πειράματος, η 2x CH_3COONa συγκέντρωση φτάνει την συγκέντρωση της 3x CH_3COONa. Επιπλέον, η συνθήκη αυτή εμφάνισε μεγάλη ομοιότητα με την περίπτωση του CO_2, μιας και τις τελευταίες 15 πειραματικές ημέρες παρατηρήθηκε μία δεύτερη παραγωγή EPS (η πρώτη παραγωγή EPS ξεκίνησε την $2^η$ ημέρα και μετά η συγκέντρωσή τους παρέμεινε σχετικά σταθερή μέχρι την δεύτερη παραγωγή). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις EPS ανά συνθήκη ήταν 0,04968, 0,06611 και 0,07427mg/mL στις συνθήκες 1x CH_3COONa, 2x CH_3COONa και 3x CH_3COONa αντίστοιχα. Συγκριτικά με την καλλιέργεια-μάρτυρα (0,05008mg/mL), η οποία αναπτύχθηκε με έλλειψη αζώτου και άνθρακα (αναλύθηκε στην ενότητα 3.1.), η παραγωγή EPS για τις συνθήκες 2x και 3x CH_3COONa είναι αυξημένη, ενώ η συνθήκη 1x CH_3COONa είναι παρόμοια.



Εικόνα 3.5.1. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε συνθετικό μέσο BG11 –N-C με επιπρόσθετο CH_3COONa σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκέντρωση χλωροφύλλης α σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).





Εικόνα 3.5.2. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε συνθετικό μέσο BG11 –N-C με επιπρόσθετο CH_3COONa σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκέντρωση EPS σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε συνάρτηση με τον χρόνο

3.6. Μελέτη της παραγωγής EPS από το κυανοβακτήριο *Nostoc calcicola* σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα, παρουσία όλων των θρεπτικών στοιχείων, με έλλειψη αζώτου, με έλλειψη αζώτου και άνθρακα και με έλλειψη θείου έχοντας συνεχή παροχή αέρα.

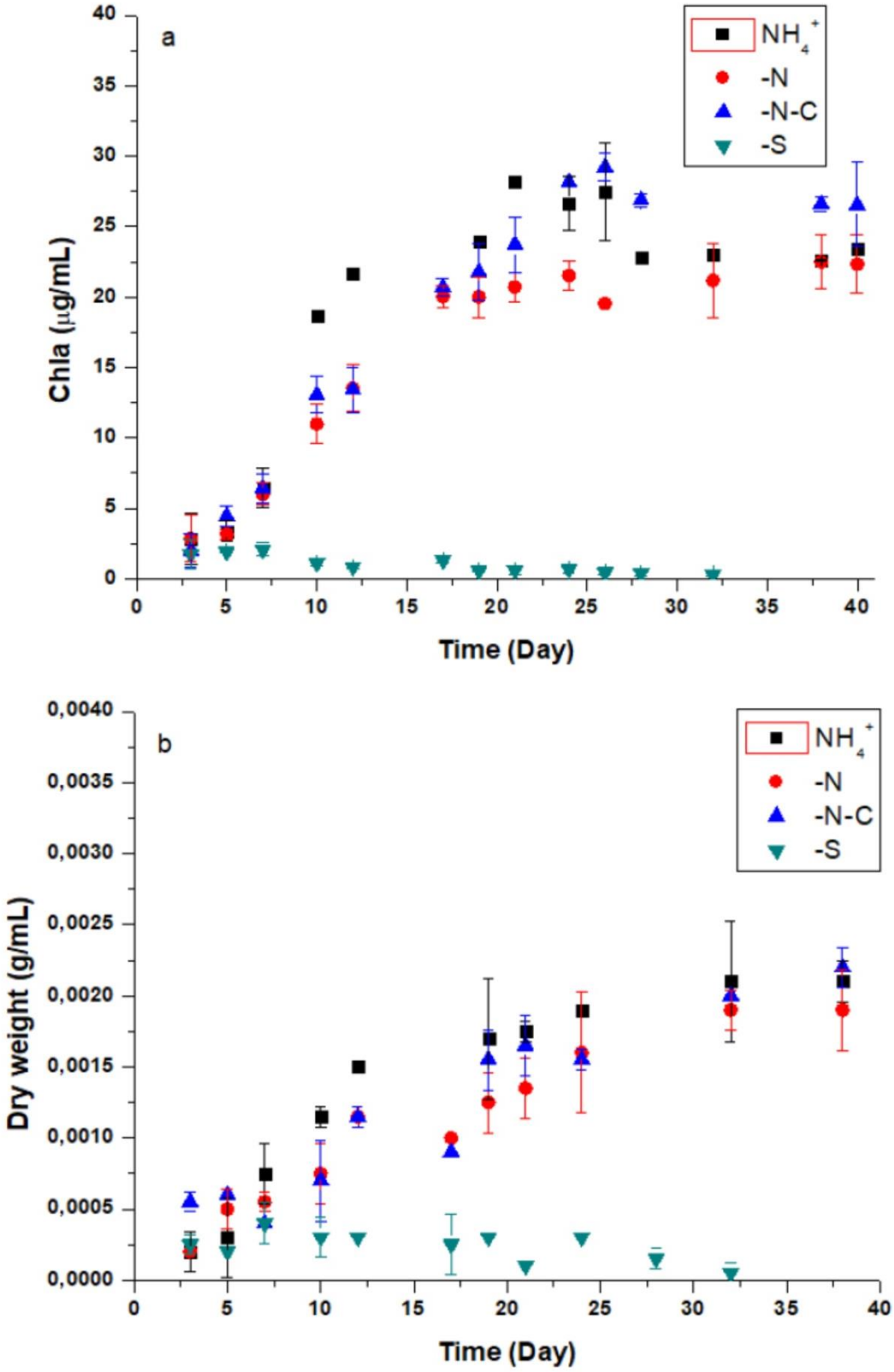
Η δεύτερη πειραματική σειρά αποτελείται από τέσσερεις διαφορετικές συνθήκες, στις οποίες γινόταν συνεχής διοχέτευση ατμοσφαιρικού αέρα (ανοιχτό σύστημα). Χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά θρεπτικά μέσα, παρουσία άνθρακα και αζώτου (NH_4^+), απουσία αζώτου (–N), απουσία αζώτου και άνθρακα (-N-C) και απουσία θείου (-S). Σκοπός ήταν η μελέτη του αν ο ρυθμός φωτοσύνθεσης και καθήλωσης αζώτου επαρκεί για τις κυτταρικές ανάγκες σε διάφορες συνθήκες, αλλά και της καταπόνησης των κυττάρων, λόγω στρες. Η παραγωγή EPS είναι μια φυσιολογική διαδικασία, όταν το κύτταρο βρίσκεται υπό συνθήκες στρες [31] συνεπώς είναι μια σημαντική ένδειξη για την κατάσταση του κυττάρου.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.6.1.α, οι καλλιέργειες εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη από την πειραματική σειρά με το κλειστό σύστημα, χάρη στην συνεχή διοχέτευση άνθρακα (CO_2) και αζώτου (N_2) μέσα στο σύστημα από τον ατμοσφαιρικό αέρα που εισαγότανε. Όμως, η συνθήκη –S δεν εμφάνισε καθόλου κυτταρική ανάπτυξη, αλλά αντίθετα μείωση της κυτταρικής μάζας και της χλωροφύλλης ήδη από τις πρώτες μέρες. Η έλλειψη θείου, η οποία δεν αναπληρώθηκε μέσω της παροχής αέρα, οδήγησε σε μείωση της Chla. Η μέγιστη συγκέντρωση αυτής ήταν 28,1666, 22,4888, 29,20854 και 2,0478μg/mL στις συνθήκες NH_4^+, –N, -N-C και –S αντίστοιχα. Για την ξηρή βιομάζα, η μέγιστη μέτρηση ήταν 0,0021, 0,0019, 0,00195 και 0,0004 g/mL. Συνεπώς, για την ανάπτυξη των καλλιεργειών ισχύει: NH_4^+ > -N-C > –N > –S.

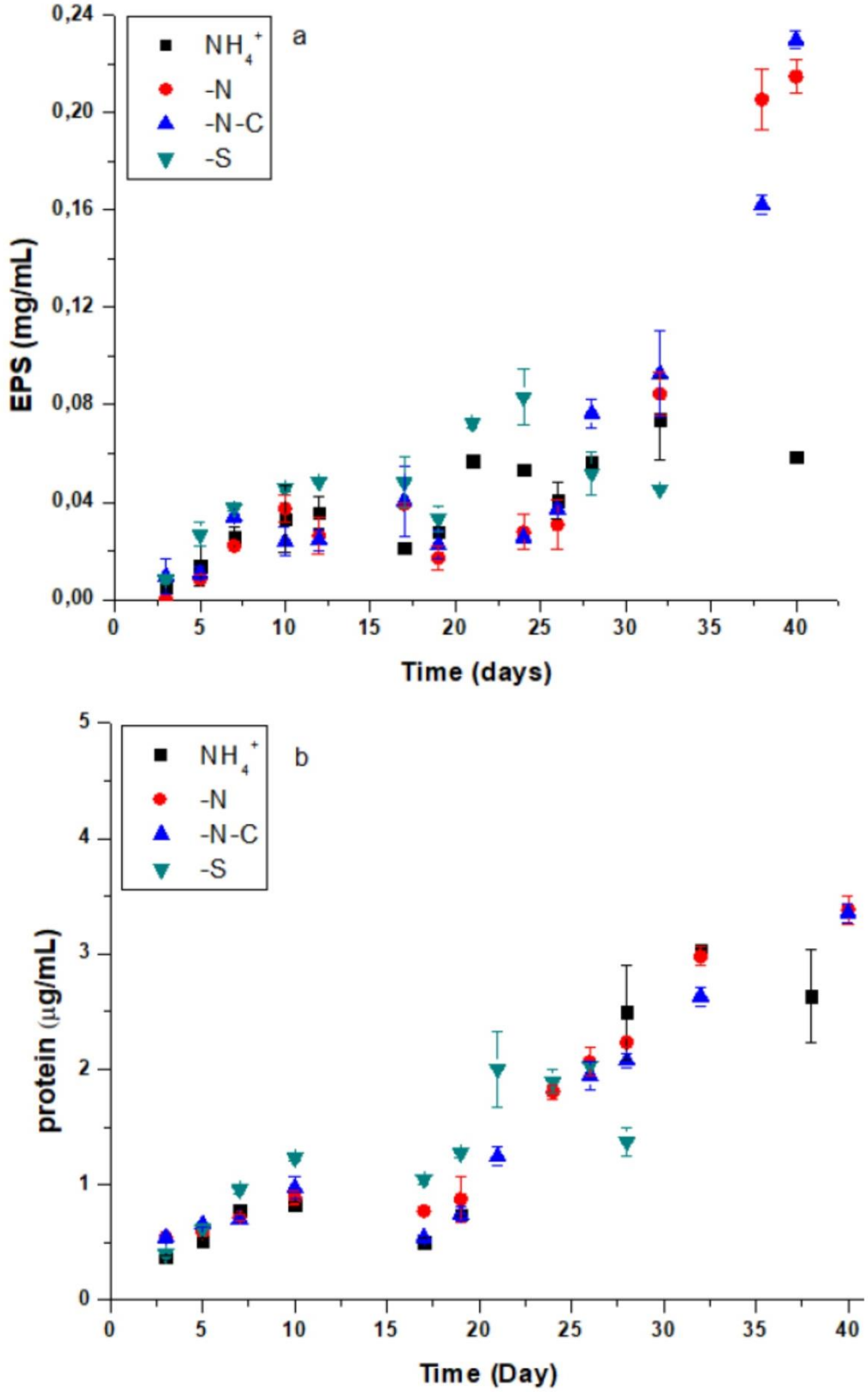
Η παραγωγή των EPS, στις τέσσερις συνθήκες, με την συνεχή παροχή αέρα αναπαριστάται στην εικόνα 3.6.2. Μεγαλύτερη παραγωγή EPS εμφάνισαν οι συνθήκες –N και –N-C στα 0,2148 και 0,2299mg/mL, λόγω των ελλείψεων των θρεπτικών και παρουσίασαν την ιδία συμπεριφορά με τα πειράματα του CO_2 και CH_3COONa σε έλλειψη αζώτου παρόλο που γινόταν συνέχεια διοχέτευση αέρα που περιέχει ατμοσφαιρικό άζωτο. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με την βιβλιογραφία [31], σύμφωνα με την οποία το κύτταρο παρουσία μόνο ατμοσφαιρικού αζώτου μπορεί να βρίσκεται σε συνθήκες καταπόνησης, καθώς ο ρυθμός καθήλωσης του αζώτου μπορεί να μην επαρκεί για τις ανάγκες του κυττάρου. Από την εικόνα 3.6.2.a, επίσης, φαίνεται πως η καλλιέργεια εμφανίζει πάλι δύο στάδια παραγωγής EPS ($5^η$ και $26^η$ ημέρα), όπως σε συνθήκες CO_2 και CH_3COONa . Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από την συμπεριφορά παρουσία NH_4^+, διότι η

καλλιέργεια αυτή εμφανίζει μόνο ένα στάδιο παραγωγής EPS με μέγιστη συγκέντρωση τα 0,07404mg/mL. Επιπρόσθετα, η συνθήκη –N φαίνεται, προς το τέλος, να πλησίασε το σημείο καμπής στην παραγωγή των EPS, σε αντίθεση με τη συνθήκη –N-C που έδειξε περαιτέρω δυνατότητες παραγωγής EPS. Προκύπτει, λοιπόν, ότι πηγές άνθρακα, όπως τα ανθρακικά, μείωσαν την παραγωγή EPS.

Όσον αφορά την συνθήκη –S, εμφάνισε την μεγαλύτερη παραγωγή EPS μέχρι την μέρα 20, όμως από εκεί και έπειτα, τα αποτελέσματα δεν θεωρήθηκαν αξιόπιστα. Αυτό οφείλεται στα διαλυμένα κύτταρα καλλιέργειας, ο αριθμός των οποίων αυξανόταν διαρκώς, ιδιαίτερα μετά την 20η μέρα. Αυτή η παρατήρηση έγινε με οπτικό μικροσκόπιο (ενότητα 3.7.). Έτσι, από την παρατήρηση με μικροσκόπιο σε συνδυασμό με την φθίνουσα πορεία ανάπτυξης συμπεραίνεται ότι ένα μεγάλο μέρος των κυττάρων είχε σπάσει με αποτέλεσμα το σήμα στο υπερκείμενων να οφείλεται και σε υδατάνθρακες που προέρχονται από το εσωτερικό των κυττάρων και όχι μόνο από την παραγόμενη πεπτιδογλυκάνη. Η μέγιστη συγκέντρωση EPS στην συνθήκη -S που σημειώθηκε μέχρι την μέρα 20 ήταν 0,0483mg/mL. Το σπάσιμο των κυττάρων και η χαμηλή σχετικά παραγωγή EPS χαρακτηρίζουν την συνθήκη –S μη αποδοτική για την παραγωγή EPS.



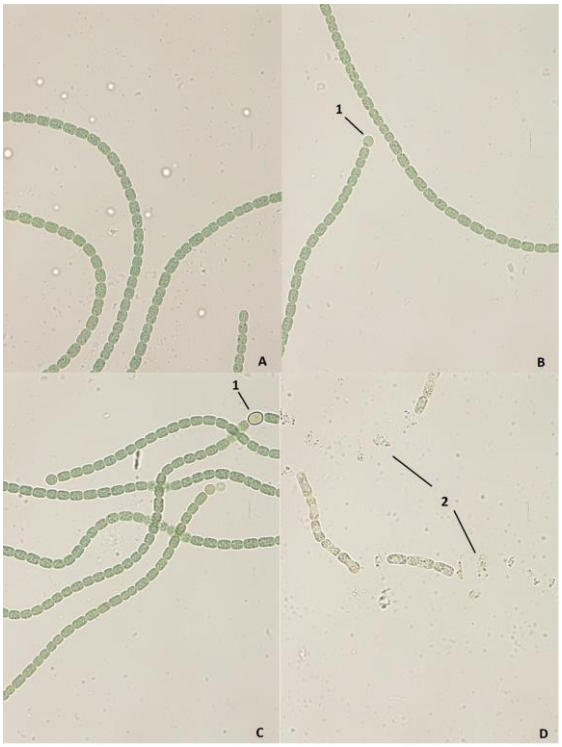
Εικόνα 3.6.1. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα BG11 NH_4^+, –N, -N-C και –S με συνεχή παροχή αέρα. Συγκέντρωση χλωροφύλλης α σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση ξηρής βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο. (b).



Εικόνα 3.6.2. Ανάπτυξη του *Nostoc calcicola* σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα BG11 NH_4^+, –N, -N-C και –S με συνεχή παροχή αέρα. Συγκέντρωση EPS σε συνάρτηση με τον χρόνο (a) και συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο σε συνάρτηση με τον χρόνο (b).

3.7. Παρατήρηση κυττάρων Nostoc calcicola με οπτική μικροσκοπία σε τέσσερα θρεπτικά μέσα, παρουσία όλων των συστατικών, σε έλληψη αζώτου, σε έλληψη αζώτου και άνθρακα και σε έλλειψη θείου.

Στην παρούσα ενότητα, θα μελετηθούν εικόνες του *Nostoc calcicola* από το οπτικό μικροσκόπιο στις τέσσερις συνθήκες της ενότητας 3.6. (παρουσία όλων των συστατικών, σε έλλειψη αζώτου, σε έλλειψη αζώτου και άνθρακα και σε έλλειψη θείου). Οι παρακάτω εικόνες είναι από την 21η πειραματική ημέρα. Οι συνθήκες με παρουσία όλων των συστατικών, με έλειψη αζώτου και με έλλειψη αζώτου και άνθρακα (Εικόνα 3.7.1. A, B και C) εμφάνισαν μεγάλες κυτταρικές αλυσίδες και παρόμοιου μεγέθους και χρώματος κύτταρα. Η μόνη διαφορά της εικόνας A με B και C ήταν ότι στην B και C (δηλαδή στην –N και –N-C συνθήκη) ήταν μεγαλύτερη η συχνότητα ετεροκυστών για την καθήλωση αζώτου [6]. Η συνθήκη με στέρηση θείου (εικόνα 3.7.1. D) ήταν η μόνη που παρουσίασε διαφορετική εικόνα. Τα κύτταρα, εδώ, ήταν πιο μεγάλα σε μέγεθος από τις προηγούμενες συνθήκες, με μικρότερου μήκους κυτταρικών αλυσίδων, με κιτρινωπό χρώμα και εμφάνισαν εσωτερικά κυστιδία. Το αξιοσημείωτο, όμως, ήταν ότι στην συγκεκριμένη συνθήκη μόνο εμφανίστηκαν θραύσματα κυττάρων, τα οποία πρωτοπαρατηρήθηκαν από την 21^{η} ημέρα και μετά.



Εικόνα 3.7.1. Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο με χρήση της ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού Plan Apo 60x του κυανοβακτηρίου *Nostoc calcicola* σε τέσσερις συνθήκες: παρουσία όλων των θρεπτικών (A), σε έλλειψη αζώτου (B), σε έλλειψη αζώτου και άνθρακα (C) και σε έλλειψη θείου (D). (1) ετεροκύστες, (2) θραύσματα κυττάρων.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, επιβεβαιώθηκε ότι ο μικροοργανισμός *Nostoc calcicola* έχει την ικανότητα να παράξει EPS. Σε πρώτη φάση, εξετάζοντας την παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη σε συνθήκες έλλειψης αζώτου με τέσσερις διαφορετικές πηγές άνθρακα (ανθρακικό νάτριο, διοξείδιο του άνθρακα, γλυκόζη και οξικό νάτριο) σε κλειστό σύστημα χωρίς παροχή αέρα, διαπιστώθηκαν δύο ειδών συμπεριφορές:

1. Απουσία αζώτου και παρουσία πηγών άνθρακα, όπως το ανθρακικό νάτριο και η γλυκόζη, η αύξηση της συγκέντρωσης τους στο θρεπτικό μέσο μειώνει την παραγωγή EPS.
2. Απουσία αζώτου και παρουσία πηγών άνθρακα, όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το οξικό νάτριο, η αύξηση της συγκέντρωσης τους στο θρεπτικό μέσο επάγει την μεγαλύτερη παραγωγή EPS.

Επιπλέον, η πιο αποδοτική πηγή άνθρακα για την παραγωγή EPS σε έλλειψη αζώτου είναι το διοξείδιο του άνθρακα, ενώ η παραγωγή με αυτό πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια.

Επιπροσθέτως, εξετάστηκε η παραγωγή EPS στις συνθήκες ανάπτυξης παρουσία όλων των θρεπτικών συστατικών (NH_4^+), απουσία αζώτου (–N), απουσία αζώτου και άνθρακα (-N-C) και απουσία θείου (-S) με συνεχής παροχή αέρα. Η πιο αποδοτική συνθήκη ανάπτυξης για παραγωγή EPS αναδείχθηκε η –N-C συνθήκη. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο μειώνει την παραγωγή των EPS και, επίσης, επιβεβαιώθηκε για μία ακόμη φορά πως σε συνθήκες έλλειψης αζώτου η παρουσία άνθρακα μειώνει την παραγωγή EPS (-N< -N-C). Η συνθήκη θείου δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική συνθήκη για παραγωγή EPS, καθώς τα κύτταρα μετά από ένα χρονικό σημείο σπάνε και απελευθερώνουν τους εσωτερικούς υδατάνθρακες.

Προοπτικές και Μελλοντικοί Στόχοι

Ο μικροοργανισμός *Nostoc calcicola* έχει δυνατότητες να χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία για παραγωγή EPS. Οι EPS έχουν εμφανίσει σημαντικές βιολογικές δραστικότητες. Ωστόσο, πρέπει, πρώτα, να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη της δομής τους, για το προσδιορισμό επιπλέον πρόσθετων λειτουργικών ομάδων στα σάκχαρα που μπορούν να συνεπάγουν επιπλέον ιδιότητες. Επίσης, είναι αναγκαίο να ερευνηθούν περαιτέρω και οι συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού για την παραγωγή EPS, με τροποποίηση παραμέτρων όπως άλλες πηγές άνθρακα (μόρια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του κυττάρου), η θερμοκρασία και ο φωτισμός, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη παραγωγή. Παράλληλα, η χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των κυττάρων συναρτήσει της παραγωγής EPS.

Επιπλέον, θα ήταν καλό να ελεγχθεί το εσωτερικό των ετεροκυστών, ώστε να διαπιστωθεί η μορφή στην οποία αποθηκεύει C και N ο οργανισμός σε περιόδους στρες. Χρήσιμο θα ήταν επίσης να αναλυθεί εάν ο μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα να παράξει κάποιο άλλο προϊόν το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί από τη βιομηχανία. Ειδικότερα, σε συνθήκες έλλειψης θείου, υπάρχουν ενδείξεις ο συγκεκριμενος μικροοργανισμός να αποτελέσει ικανοποιητική πηγή πολυμερών, τα οποία πρέπει να ταυτοποιηθούν και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες παραγωγής τους σε στέρηση θείου.

Συμπερασματικά, οι ιδιότητες των EPS του φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού *Nostoc calcicola,* υπογραμμίζουν τη σημασία της συνέχισης της έρευνας πάνω στο πεδίο αυτό, λόγω των εφαρμογών που μπορεί να έχουν σε θέματα βιοαπομάκρυνσης και προστασίας του περιβάλλοντος.

Βιβλιογραφία

[1] Berg J., Tymoczko J., Gatto G. JR., Stryer L., *Biochemistry*, 2017.

[2] Bryant, D.A., *Phototrophy and Phototrophs.* 2019.

[3] Tymoczko, J.L et al., *Biochemistry: A short course*. 2011: Macmillan.

[4] Frigaard, N.-U. and C. Dahl, *Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria.* Advances in microbial physiology, 2008. **54**: p. 103-200.

[5] Khyasudeen, M.F., et al., *Studying the spectral diffusion dynamics of chlorophyll a and chlorophyll b using two-dimensional electronic spectroscopy.* Chemical Physics, 2019. **527**: p. 110480.

[6] Whitton, B. and M. Potts, *The Ecology of Cyanobacteria in the Netherlands*. 2000, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

[7] Edens, R.E., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd ed Edited by Severian Dumitriu (University of Sherbrooke, Quebec). *Marcel Dekker: New York. 2005. xviii + 1204 pp.. ISBN 0-8247-5480-8.*

[8] Delattre, C., et al., *Bacterial and fungal polysaccharides produced by fermentation–an overview.* Advances in fermentation technology, 2009: p. 484-521.

[9] Delattre, C., et al., *Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides.* Brazilian archives of biology and technology, 2011. **54**(6): p. 1075-1092.

[10] Mišurcová, L., J. Orsavová, and J.V. Ambrožová, *Algal polysaccharides and health.* Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology, 2015: p. 109-144.

[11] Raposo, M.F.d.J., et al., *Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae.* Marine drugs, 2013. **11**(1): p. 233-252.

[12] de Jesus Raposo, M.F., et al., *Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications.* Marine drugs, 2015. **13**(5): p. 2967-3028.

[13] Colica, G., et al., *Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soils.* Soil Biology and Biochemistry, 2014. **68**: p. 62-70.

[14] Mager, D. and A. Thomas, *Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: a review of their role in dryland soil processes.* Journal of Arid Environments, 2011. **75**(2): p. 91-97.

[15] Passow, U., *Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments.* Progress in oceanography, 2002. **55**(3-4): p. 287-333.

[16] Chen, L., et al., *Macromolecular and chemical features of the excreted extracellular polysaccharides in induced biological soil crusts of different ages.* Soil Biology and Biochemistry, 2014. **78**: p. 1-9.

[17] Pereira, S., et al., *Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly.* FEMS microbiology reviews, 2009. **33**(5): p. 917-941.

[18] Underwood, G.J. and D.M. Paterson, *The importance of extracellular carbohydrate productionby marine epipelic diatoms.* Advances in botanical research, 2003. **40**: p. 183-240.

[19] Domozych, D.S., *Disruption of the Golgi apparatus and secretory mechanism in the desmid, Closterium acerosum, by brefeldin A.* Journal of Experimental Botany, 1999. **50**(337): p. 1323-1330.

[20] Keidan, M., et al., *Assimilation of sulphur into the cell-wall polysaccharide of the red microalga Porphyridium sp.(Rhodophyta).* Phycologia, 2006. **45**(5): p. 505-511.

[21] Rossi, F. and R. De Philippis, *Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis*, in *The physiology of microalgae*. 2016, Springer. p. 565-590.

[22] Arad, S.M. and O. Levy-Ontman, *Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects.* Current opinion in biotechnology, 2010. **21**(3): p. 358-364.

[23] De Philippis, R., et al., *Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers.* Appl. Environ. Microbiol., 1998. **64**(3): p. 1130-1132.

[24] Gügi, B., et al., *Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms.* Marine drugs, 2015. **13**(9): p. 5993-6018.

[25] Delattre, C., et al., *Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides.* Biotechnology advances, 2016. **34**(7): p. 1159-1179.

[26] Chen, B., et al., *Role of extracellular polymeric substances from Chlorella vulgaris in the removal of ammonium and orthophosphate under the stress of cadmium.* Bioresource technology, 2015. **190**: p. 299-306.

[27] Yin, Y., Y. Hu, and F. Xiong, *Biosorption properties of Cd (II), Pb (II), and Cu (II) of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from Aspergillus fumigatus and determined by polarographic method.* Environmental monitoring and assessment, 2013. **185**(8): p. 6713-6718.

[28] d'Abzac, P., et al., *Metal binding properties of extracellular polymeric substances extracted from anaerobic granular sludges.* Environmental Science and Pollution Research, 2013. **20**(7): p. 4509-4519.

[29] Zhao, C., et al., *Calcifying cyanobacterium (Nostoc calcicola) reactor as a promising way to remove cadmium from water.* Ecological Engineering, 2015. **81**: p. 107-114.

[30] Flaibani, A., et al., *Polysaccharides in desert reclamation: compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae.* Carbohydrate Research, 1989. **190**(2): p. 235-248.

[31] Delattre, C., et al., *Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides.* Biotechnology advances, 2016. **34**(7): p. 1159-1179.

[32] Bhatnagar, M., et al., *Rheology and characterization of a low viscosity emulsifying exopolymer from desert borne Nostoc calcicola.* 2014.

[33] Singh, S. and S. Das, *Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011. **27**(9): p. 1971-1980.

[34] Painter, T.J., *Biofertilizers: exceptional calcium binding affinity of a sheath proteoglycan from the blue-green soil alga Nostoc calcicola.* Carbohydrate polymers, 1995. **26**(3): p. 231-233.

[35] Stanier, R.Y., et al., *Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales).* Bacteriological reviews, 1971. **35**(2): p. 171-205.

[36] Lichtenthaler, H.K., *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes.* Methods in Enzymology, 1987. **148**: p. 350-382.

[37] Schulze, C., et al., *Screening of microalgae for primary metabolites including β-glucans and the influence of nitrate starvation and irradiance on β-glucan production.* Journal of applied phycology, 2016. **28**(5): p. 2719-2725.

[38] Berges, J.A., et al., *A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom Thalassiosira pseudonana.* Marine Biology, 1993. **115**(2): p. 187-193.

[39] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.