

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την
αυτότροφη και μικτότροφη ανάπτυξη του μονοκύτταρου
χλωροφύκου *Chlorella minutissima*.

Πτυχιακή εργασία
Επιβλέπων: Καθηγητής Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Αναστασία Πιπή
Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2012

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση που μου μετέδωσε τον ενθουσιασμό του για την φωτοσύνθεση και που διαμόρφωσε τις καλύτερες συνθήκες εμπιστοσύνης και συνεργασίας κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στην Δρ. Κατερίνα Παπαζή που με εκπαίδευσε στις βασικές τεχνικές για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Επίσης, στον Δρ. Νίκο Ιωαννίδη που με καθοδήγησε υπομονετικά κατά την επεξεργασία των δεδομένων και με ώθησε να στοχεύω όλο και ψηλότερα. Τέλος, ευχαριστώ την μητέρα μου Χαρίκλεια για την οικονομική αλλά κυρίως την πολύτιμη ηθική στήριξη που μου προσέφερε.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή

1.1.Φωτοσύνθεση-μοριακή δομή και λειτουργία.....	3
1.2.Βιοσύνθεση χλωροφύλλων.....	7
1.3.Συστηματική της <i>Chlorella</i>	10
1.4.Κύκλος ζωής της <i>Chlorella</i>	12
1.5.Η επίδραση της μεθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων (Methanol effect)	13
Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	14

2.Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Οργανισμός.....	15
2.2. Συνθήκες καλλιέργειας	16
2.3. Θρεπτικό μέσο.....	17
2.4. Εκτίμηση βιομάζας ως Packed Cell Volume (PCV).....	18
2.5. Πολαρογραφική μέτρηση φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας.....	18
2.6. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και JIP-test.....	19
2.6.1 Φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II σε συνθήκες χημικής ισορροπίας (steady state) (ΦPSII).....	21
2.7. Ποσοτικός προσδιορισμός μεθανόλης.....	22

3.Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1.Μελέτη αυτότροφων θρεπτικών για την ανάπτυξη του χλωροφύκου <i>Chlorella minutissima</i>	
3.1.1.Θρεπτικό F2P.....	23
3.1.2.Θρεπτικό Bishop.....	25
3.2.Στοχευμένες αλλαγές στο αυτότροφο θρεπτικό Bishop για βέλτιστη ανάπτυξη του χλωροφύκου <i>Chlorella minutissima</i>	
3.2.1.Επίδραση βιταμινών B ₁₂ , B ₁ και B ₇	26
3.2.2.Επίδραση σιδήρου και πεπτόνης.....	28
3.2.3.Αναζήτηση του συστατικού της πεπτόνης που ευθύνεται για την αύξηση της χλωροφύλλης - Επίδραση γλουταμικού οξέος.....	31
3.2.3.1.Συσχέτιση επίδρασης γλουταμικού με ένταση ακτινοβολίας.....	34
3.2.4.Επίδραση αλατότητας.....	36
3.2.5.Συμβολή αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων στην αύξηση της καλλιέργειας.....	39
3.2.6.Επίδραση θερμοκρασίας.....	41
3.3.Χρήση μεθανόλης για μια εναλλακτική αξενική μικτότροφη ανάπτυξη του χλωροφύκου <i>Chlorella minutissima</i>	
3.3.1.Επίδραση μεθανόλης σε αυτότροφο θρεπτικό Bishop.....	44
3.3.2. Επίδραση μεθανόλης σε θρεπτικό Bishop με προσθήκη βιταμινών και γλουταμικού.....	47

4.Συμπεράσματα.....	48
---------------------	----

Βιβλιογραφία.....	49
-------------------	----

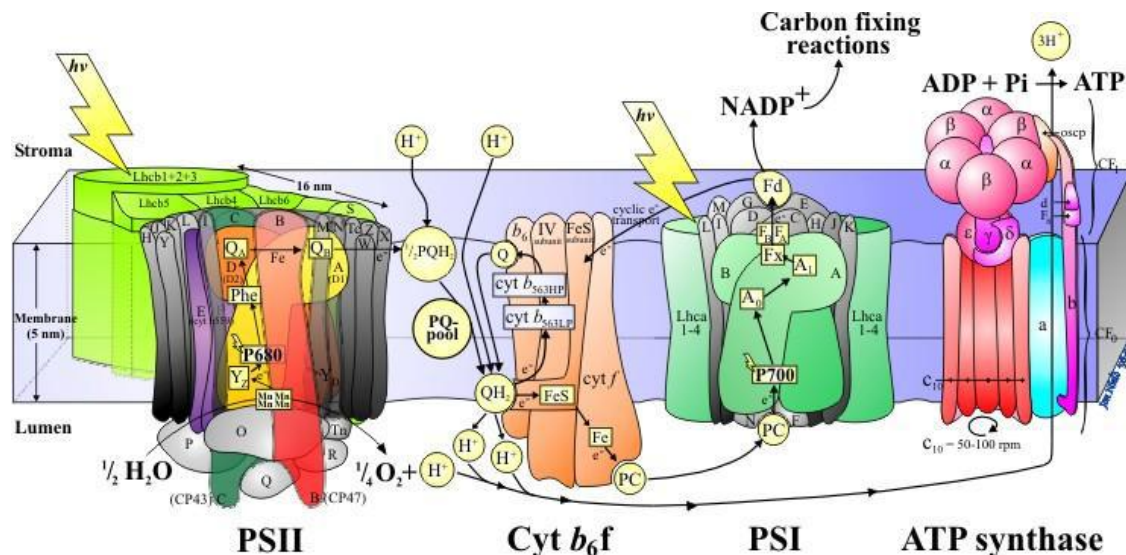
1.Εισαγωγή

Τα μικροφύκη αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών προκαρυωτών και ευκαρυωτών. Περιβαλλοντικές παράμετροι όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα, το pH και η διαθεσιμότητα θρεπτικών επηρεάζουν την μορφολογία και το μέγεθος τους, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ταυτοποίησή χωρίς μοριακά εργαλεία. Τα μικροφύκη αποτελούν την βάση της υδάτινης τροφικής αλυσίδας και έχουν καταλάβει όλους τους διαθέσιμους θάλους, ενώ εντοπίζονται ακόμα και στα πλέον αφιλόξενα περιβάλλοντα. Η τεράστια ποικιλομορφία τους ανοίγει επιδοφόρους βιοτεχνολογικούς ορίζοντες, αν και οι γνώσεις για τους ίδιους τους οργανισμούς αλλά και για τις καταλληλότερες τεχνικές καλλιέργειας είναι ακόμα πολύ ελλιπείς (Cadoret et al., 2012). Οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές είναι πολυάριθμες σε τομείς όπως βιοκαύσιμα, παραγωγή χημικών ουσιών, ιχθυοκαλλιέργειες, βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων.

Η πιο κοινή καλλιέργεια μικροφυκών σήμερα είναι η φωτοαυτότροφη, η οποία όμως παρουσιάζει αισθητά χαμηλότερη παραγωγικότητα σε βιομάζα από την αντίστοιχη ετερότροφη ή μικτότροφη. Τους καλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης εμφανίζουν μικτότροφες καλλιέργειες όπου τα κύτταρα προσλαμβάνουν ενέργεια από οργανική ύλη και παράλληλα φωτοσυνθέτουν. Οι οργανικές ουσίες που έχουν μελετηθεί περισσότερο για μικτότροφη καλλιέργεια μικροφυκών είναι η γλυκόζη (Liang et al., 2009), η μεθανόλη (Kotzabasis et al., 2009), η γλυκερίνη (Li et al., 2011) και το οξικό οξύ (Wood et al., 1999).

1.1.Φωτοσύνθεση-μοριακή δομή και λειτουργία

Η δέσμευση της ηλιακής ενέργειας συμβαίνει στα φωτοσυστήματα I και II. Μετά τη δέσμευση του φωτός από τις χρωστικές των κεραιών, η ενέργεια μεταφέρεται στα κέντρα αντίδρασης και ακολουθεί διαχωρισμός φορτίων κατά μήκος της μεμβράνης (φωτεινές αντιδράσεις). Οι φωτεινές αντιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ATP και NADPH που είναι απαραίτητα εκτός των άλλων και για τον κύκλο Calvin-Benson, δηλαδή για την μετατροπή του ανόργανου CO₂ σε οργανικά σάκχαρα (βλ. εικόνες 1 και 2).



Εικόνα 1: Δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αποτελείται από τρία σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών (PSII, Cyt b₆f, PSI) και το σύμπλοκο της ATP συνθάσης.

Η φωτοσύνθεση λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών όπου βρίσκονται οι φωτοσυνθετικές χρωστικές ενσωματωμένες σε λειτουργικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και άλλα μόρια. Για την αποδοτικότερη δέσμευση της φωτονιακής ενέργειας αλλά και για λόγους φωτοπροσαρμογής και φωτοπροστασίας, τα χλωροφύκη όπως και τα ανώτερα φυτά διαθέτουν εκτός από τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Τα πρωτογενή καροτενοειδή των χλωροφυκών είναι το α-καροτένιο, το β-καροτένιο, η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, η βιολαξανθίνη, η νεοξανθίνη και η ανθεραξανθίνη (Gouveia et al.,1996). Οι χρωστικές εντοπίζονται στα σύμπλοκα συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex) και στα κέντρα αντίδρασης (Reaction Centers) των φωτοσυστημάτων I και II.

Φωτοσύστημα II (PSII)

Το Φωτοσύστημα II είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από δύο διακριτά ενζυμικά σύμπλοκα, το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHC II) και τον πυρήνα (PSII core). Το LHC II αποτελεί την κύρια μονάδα συλλογής φωτός του κυττάρου που διοχετεύει την δεσμευμένη ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης, και περιέχει έξι περίπου πρωτεΐνες, χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b και καροτενοειδή. Οι πρωτεΐνες του LHC II κωδικοποιούνται από τουλάχιστον δεκαέξι πυρηνικά γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχεται κυρίως από την οξειδοαναγωγική κατάσταση της

πλαστοκινόνης. Ο πυρήνας του PSII περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης (RC) όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex) όπου πραγματοποιείται η φωτόλυση του νερού για την άντληση ηλεκτρονίων. Το κάθε RC αποτελείται από δύο πολυπεπίδια (D1 και D2) όπου εντοπίζεται ο πρωτογενής δότης ηλεκτρονίων P680, και δύο περιφερειακά μόρια χλωροφύλλης *a*, δύο φαιοφυτίνες, μια πλαστοκινόνη, ένα άτομο σιδήρου και δύο καροτένια.

Φωτοσύστημα I (PSI)

Αποτελείται από το LHC I και τον πυρήνα PSI. Το LHC I διαθέτει χλωροφύλλη *b*, ενώ ο πυρήνας διαθέτει τουλάχιστον δέκα πολυπεπίδια, περίπου εκατό μόρια χλωροφύλλης *a*, καροτένιο, δύο μόρια βιταμίνης K1 και τρία σύμπλοκα [4Fe-4S].

Το Φωτοσύστημα I λειτουργεί συμπληρωματικά με το PSII απορροφώντας φωτονιακή ενέργεια αλλά και διευκολύνοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων στο NADP⁺. Σύμφωνα με το μοντέλο του Butler (1978) όταν όλα τα μόρια πλαστοκινόνης είναι σε ανηγμένη κατάσταση το PSII φωσφορυλιώνεται και μεταφέρει μέρος της ενέργειάς του στο PSI (υπερχείλιση).

Κυτόχρωμα b_6/f

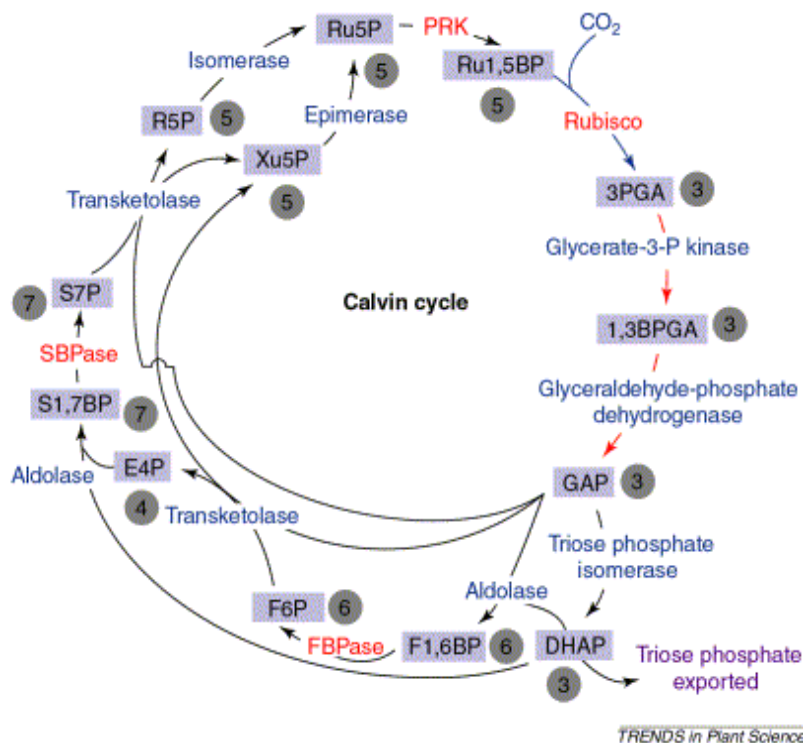
Αποτελείται από επτά υπομονάδες: το κυτόχρωμα b_6 , το κυτόχρωμα *f*, την υπομονάδα IV, την σιδηροπρωτεΐνη Rieske και άλλες τρεις μικρού μοριακού βάρους. Λειτουργικά μεταφέρει ηλεκτρόνια από την πλαστοκινόλη στην πλαστοκυανίνη. Αυτή η κίνηση ηλεκτρονίων συνοδεύεται από μεταφορά πρωτονίων από την μια πλευρά της μεμβράνης του θυλακοειδούς στην άλλη, συμβάλλοντας έτσι στην βαθμίδωση πρωτονίων (pmf) στο μικροχώρο που αποτελεί την κινητήρια δύναμη της ATP συνθάσης.

ATP συνθάση

Βρίσκεται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος και αποτελείται από τον υδρόφιλο παράγοντα CF₁ και τον παράγοντα CF₀, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Κατά την καταλυτική της δράση τα συσσωρευμένα πρωτόνια στην περιοχή του μικροχώρου διοχετεύονται προς το στρώμα μέσω ενός καναλιού του CF₀.

Κύκλος Calvin-Benson

Ο κύκλος Calvin-Benson πραγματοποιείται στο στρώμα του χλωροπλάστη και εκμεταλλεύεται το ATP και το NADPH που παρήχθησαν κατά τις φωτεινές αντιδράσεις (Εικόνα 2). Η καρβοξυλάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) είναι το ένζυμο που καταλύει την δέσμευση του ανόργανου CO₂ και την είσοδό του στον κύκλο (οδός C₃). Παρόλα αυτά, η υψηλή συγγένεια της Rubisco και με το O₂ μειώνει την αποτελεσματικότητά της ως καρβοξυλάση και για το λόγο αυτό ορισμένα φυτά υιοθετούν εναλλακτικές, βοηθητικές οδούς που συναντώνται κυρίως σε συνθήκες έλλειψης νερού και υψηλής ακτινοβολίας και θερμοκρασίας. Αυτές οι οδοί (C₄ και CAM) δεσμεύουν το CO₂ με καρβοξυλάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού. Τελικά, η δέσμευση του CO₂ οδηγεί άμεσα στην σύνθεση υδατανθράκων αλλά και έμμεσα στην σύνθεση ποικίλων άλλων ουσιών ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων.

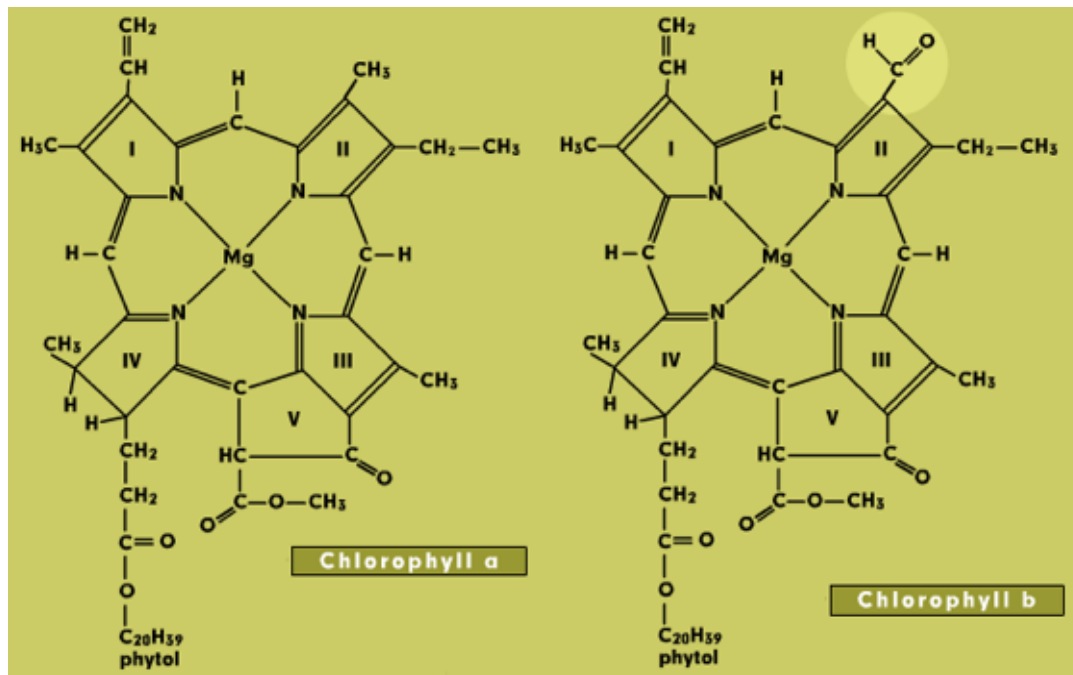


Εικόνα 2: Ο κύκλος Calvin-Benson. Αποτελείται από τρία διακριτά στάδια. Το πρώτο (μπλε βέλη) αφορά την καρβοξυλίωση του CO₂ από το ένζυμο Rubisco. Το δεύτερο (κόκκινα βέλη) περιλαμβάνει την αξιοποίηση του ATP και του NADPH που παράχθηκαν κατά τις φωτεινές αντιδράσεις για την μετατροπή του 3PGA σε GAP. Το τρίτο στάδιο (μαύρα βέλη) αναγεννά την Rubisco που απαιτείται για το πρώτο στάδιο. Πηγή: Paul et al., 2001.

1.2.Βιοσύνθεση χλωροφυλλών

Η χλωροφύλλη αποτελεί την κύρια ένωση των περισσότερων φωτοσυνθετικών οργανισμών για την απορρόφηση ακτινοβολίας. Ένα μόριο χλωροφύλλης δομείται από μια υδρόφιλη πορφυρίνη (τετραπυρρολικός δακτύλιος και άτομο μαγνησίου) και μια υδρόφοβη φυτόλη. Στη φύση συναντώνται οι χλωροφύλλες a, b, c (φύκη) και d (κυανοβακτήρια).

Το μονοπάτι σύνθεσης ενός μορίου χλωροφύλλης ξεκινά με την μετατροπή ενός μορίου γλουταμικού οξέος σε 5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA). Ο Beale (1970) συμπέρανε ότι ο ρυθμός βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης καθορίζεται από τον σχηματισμό και τη διαθεσιμότητα ALA. Σύμφωνα με τους Weistein & Beale (1984) για να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός 5-αμινολεβουλινικού οξέος (ALA) από γλουταμικό είναι απαραίτητη η διαθεσιμότητα γλουταμικού, ATP, NADPH και Mg^{2+} . Σε επόμενο στάδιο δύο μόρια ALA συμπυκνώνονται προς σχηματισμό μιας πυρρόλης, του πορφοβιλινογόνου (PBG). Τέσσερα μόρια PBG μέσα από μια διαδικασία έξι ενζυμικών βημάτων οδηγούν στον σχηματισμό τετραπυρρόλης, της πρωτοπορφυρίνης IX και ένα άτομο μαγνησίου εισάγεται στο κέντρο της (von Wettstein et al., 1995). Ο σχηματισμός του πρωτοχλωροφυλλιδίου (protochlorophyllide) εμπλέκει την δημιουργία του πέμπτου δακτυλίου και την αναγωγή διπλού δεσμού στον τέταρτο δακτύλιο με τη χρήση NADPH. Στα αγγειόσπερμα η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (POR) το οποίο απαιτεί φως, γεγονός που σημαίνει ότι η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης σταματά στο στάδιο του πρωτοχλωροφυλλιδίου μέχρι να υπάρξει έκθεση σε φως. Τα κυανοβακτήρια, τα φύκη και τα γυμνόσπερμα διαθέτουν εκτός της φωτοεξαρτώμενης οδού και φωτοανεξάρτητη που τους επιτρέπει να προχωρήσουν στο στάδιο του χλωροφυλλιδίου (chlorophyllide) ακόμα και απουσία φωτός. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη φυτόλης (μέσω εστεροποίησης) στον τέταρτο δακτύλιο του χλωροφυλλιδίου προς σχηματισμό χλωροφύλλης a. Η χλωροφύλλη b προκύπτει από μετατροπή μεθυλίου του δεύτερου δακτυλίου σε αλδεΰδη (von Wettstein et al., 1995).

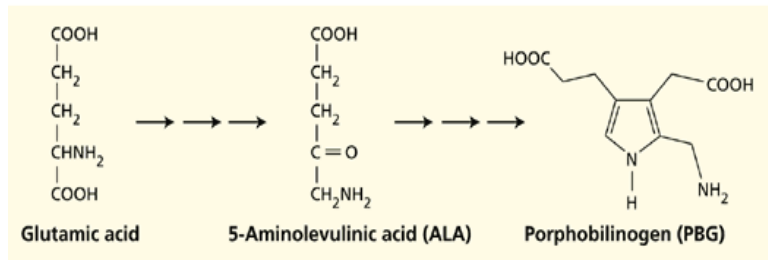


Εικόνα 3: Δομές χλωροφυλλών a και b.

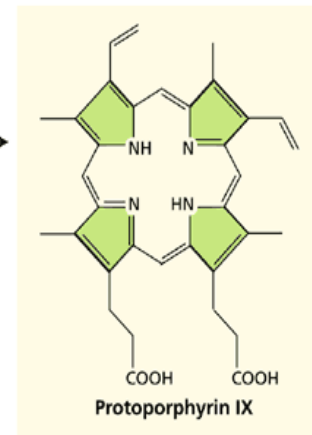
Πηγή: <http://www.photobiology.info/Brennan.htm>

Η σύνθεση των χλωροφυλλών στην *Chlorella* και η ρύθμιση της παρουσιάζουν κάποιες ιδιαιτερότητες. Όπως αναφέρεται παραπάνω η βιοσύνθεση πραγματοποιείται και απουσία φωτός, ενώ σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού συντίθεται μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφυλλών απ'ότι σε υψηλό φωτισμό (Beale & Appleman, 1971). Οι Beale & Appleman (1971) παρατήρησαν ότι ο ρυθμός αύξησης βιομάζας και ο ρυθμός βιοσύνθεσης χλωροφυλλών συσχετίζονται αντίστροφα. Συγκεκριμένα, σε επώαση αραιής σε κύτταρα καλλιέργειας υπό την επίδραση υψηλού φωτισμού, είδαν ότι στην αρχή (περίπου τις πρώτες είκοσι ώρες) η ανάπτυξη αυξανόταν εκθετικά ενώ ο σχηματισμός χλωροφυλλών εμφάνισε υστέρηση (lag phase). Τις επόμενες ώρες η ανάπτυξη έγινε γραμμική, ενώ το περιεχόμενο σε χλωροφύλλες άρχισε να αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι κάποιος σταθερά παρεχόμενος παράγοντας έγινε περιοριστικός. Οι Beale & Appleman (1971) σύμφωνα με τις μελέτες τους υποστηρίζουν ότι το διαθέσιμο για φωτοσύνθεση φως είναι ο παράγοντας που ρυθμίζει την ποσότητα χλωροφύλλης στα κύτταρα.

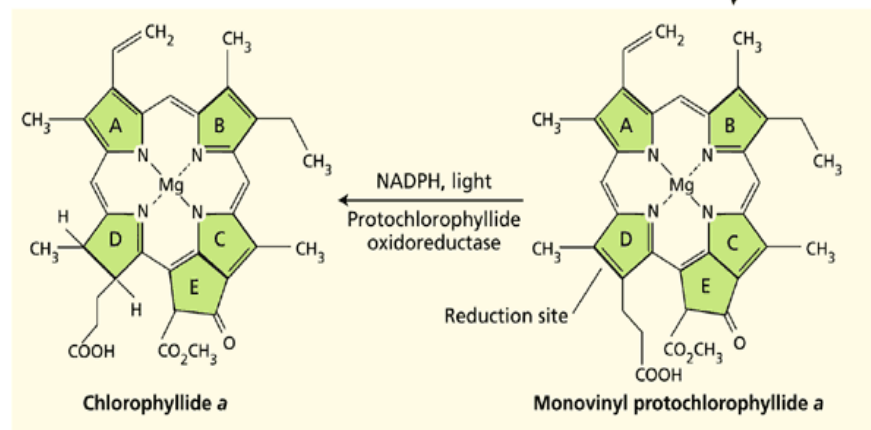
Phase I



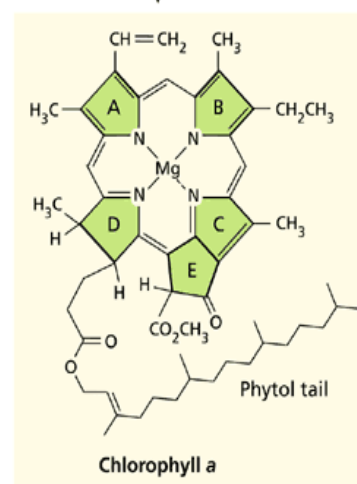
Phase II



Phase III



Phase IV



Εικόνα 4: Τα κομβικά σημεία του μονοπατιού βιοσύνθεσης χλωροφύλλης a

Πηγή: <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=76>

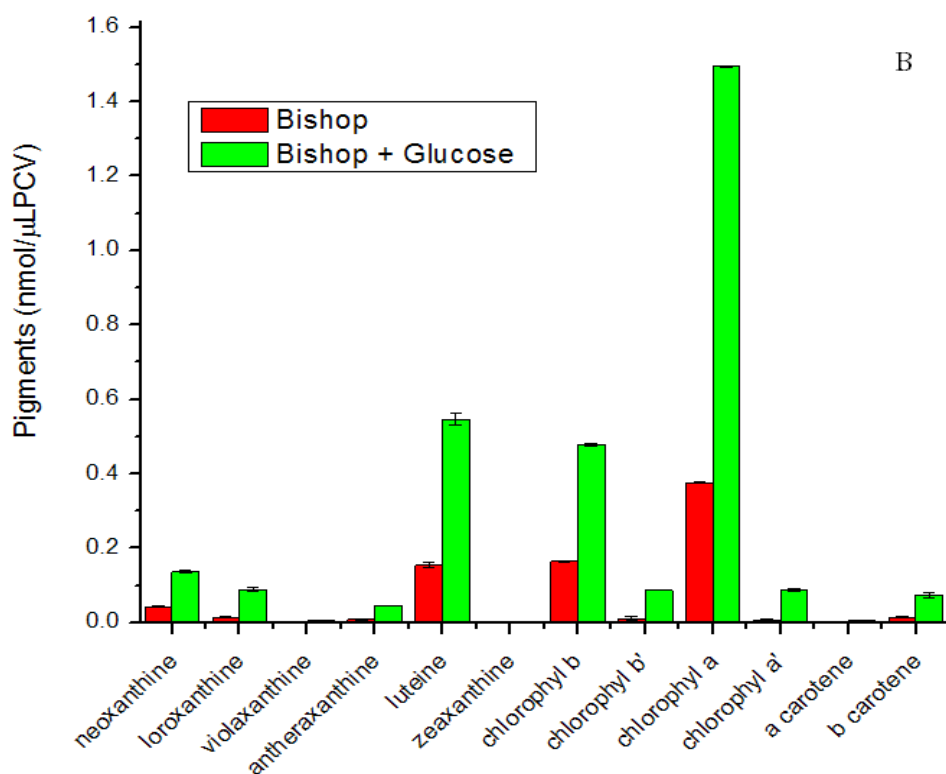
1.3.Συστηματική της Chlorella

Η συστηματική του γένους *Chlorella* εμφανίζεται περίπλοκη και συνεχώς μεταβαλλόμενη κυρίως λόγω της μεγάλης ετερογένειας της ομάδας (Huss et al., 1999). Από το 1890 που ο Beijerinck προσδιόρισε την *Chlorella vulgaris* ως τύπο του γένους, περίπου εκατό είδη χαρακτηρίστηκαν ως *Chlorella*. Μελέτες μορφολογίας και αναπαραγωγής από τους Fott & Novakova (1969) μείωσαν τον αριθμό των ειδών σε εννέα. Μεταγενέστερες βιοχημικές και μοριακές μελέτες αναφέρονται σε πέντε μόνο είδη: *C. vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana*, *C. heliozoae*, *C. variabilis* (Bock et al., 2011). Πρόσφατα μοριακά φυλογενετικά δεδομένα διαχώρισαν το γένος στους κλάδους *Chlorella* και *Parachlorella* (Luo et al., 2008), ενώ χαρακτηρίστηκε ως πολυφυλετικό με μέλη από τα Chlorophyceae και τα Trebouxiophyceae (Bock et al., 2011).

Το στέλεχος UTEX 2341 προσδιορισμένο ως *Chlorella minutissima*, έχει απασχολήσει πολύ την βιβλιογραφία λόγω των διαφορών του από τα υπόλοιπα είδη *Chlorella*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Kessler & Huss (1992) που επιχείρησαν να ταυτοποιήσουν τα στελέχη της συλλογής *Chlorella* του Πανεπιστημίου του Τέξας, παρατήρησαν ότι το UTEX 2341 είναι το μόνο στέλεχος που δεν αναπτύσσεται στο θρεπτικό Kessler-Czygan και γι' αυτό συμπέραναν ότι ίσως να μην ανήκει στο γένος *Chlorella*. Οι Huss et al. (1999) ομαδοποιούν φυλογενετικά την *Chlorella minutissima* και το *Nanochlorum eukaryotum*, που χαρακτηρίζονται από μικρό μέγεθος κυττάρων (2μm) και από τα μικρότερα γνωστά γονιδιώματα ευκαρυωτών. Οι Gladu et al. (1995) στηριζόμενοι σε ποικίλα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του UTEX 2341 υποστηρίζουν ότι παρουσιάζει μεγαλύτερες ομοιότητες με ευστιγματοφύκη παρά με τα υπόλοιπα είδη *Chlorella*. Κάποια βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του είναι το κιτρινοπράσινο χρώμα και η παρουσία εξωκυτταρικών βλεννοειδών δομών. Επιπλέον, με αέρια χρωματογραφία (GC) προσδιόρισαν τις κύριες στερόλες (χοληστερόλη, 24-μεθυλενχοληστερόλη, φουκοστερόλη και ισοφουκοστερόλη) και το κύριο λιπαρό οξύ (εικοσαπεντανοϊκό) του UTEX 2341, τα οποία δεν εντοπίζονται σε άλλα είδη *Chlorella*. Τέλος, με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) κατέγραψαν τις χρωστικές του UTEX 2341 (χλωροφύλλη a και βιολαξανθίνη), ενώ έκπληξη προκαλεί ότι δεν εντόπισαν καθόλου χλωροφύλλη b. Το σύνολο των δεδομένων αυτών οδήγησε τους ερευνητές να προτείνουν ότι το στέλεχος ανήκει στα

ευστιγματοφύκη και συγκεκριμένα στο γένος *Nannochloropsis*, ενώ δεν αποκλείουν να ανήκει στο είδος *Nannochloropsis oculata*.

Σε αντίθεση με τα ευρήματα των Gladu et al. (1995) όσον αφορά τις χρωστικές του UTEX 2341, αντίστοιχη HPLC ανάλυση που πραγματοποιήσαμε έδειξε ξεκάθαρα ότι τόσο σε αυτότροφες όσο και σε μικτότροφες συνθήκες το στέλεχος συνθέτει χλωροφύλλη b όπως και λουτεΐνη και νεοξανθίνη σε μετρήσιμες ποσότητες (Εικ.5).

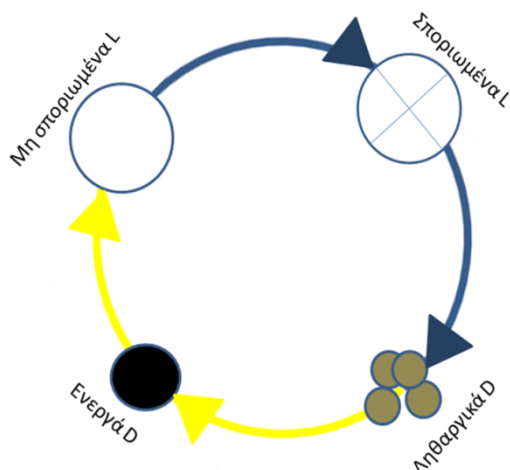


Εικόνα 5: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC των χρωστικών της *Chlorella minutissima* (UTEX 2341) σε αυτότροφες (θρεπτικό Bishop Senger) και μικτότροφες (Bishop Senger+glucose) συνθήκες καλλιέργειας.

1.4.Κύκλος ζωής της Chlorella

Σύμφωνα με τους Tamiya et al (1953), τα κύτταρα του γένους Chlorella λαμβάνουν στην πορεία ανάπτυξής τους δύο διακριτές μορφές, τις οποίες χαρακτηρίζουν ως D και L. Η D μορφή χαρακτηρίζεται από μικρό μέγεθος (<4.5μm), σκούρο πράσινο χρώμα, υψηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες, έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα αλλά χαμηλή αναπνευστική δραστηριότητα, ενώ αντίθετα τα κύτταρα L είναι μεγαλύτερου μεγέθους, κίτρινα, με λιγότερες χλωροφύλλες, χαμηλότερη φωτοσυνθετική απόδοση αλλά καλύτερη αναπνοή. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των D είναι έξι φορές υψηλότερη από των L. Η μετάβαση από D σε L κύτταρα είναι φωτοεξαρτώμενη, ενώ από L σε D φωτοανεξάρτητη με την μόνη προϋπόθεση αερόβιων συνθηκών. Ο κύκλος ανάπτυξης της Chlorella συνολικά αποτελείται από διαδοχή αύξησης όγκου (σχηματισμός L μορφών) και αύξησης αριθμού κυττάρων (απελευθέρωση D σπορίων). Τα L διακρίνονται περαιτέρω σε σποριωμένα (κάθε κύτταρο φέρει τέσσερα ή οκτώ αυτοσπόρια) και μη, ενώ τα D σε ληθαργικά και ενεργά. Τα ληθαργικά D κύτταρα λαμβάνονται από επώαση L κυττάρων στο σκοτάδι με επαρκή αερισμό, ενώ με έκθεση των ληθαργικών για μερικές ώρες στο φως προκύπτει η ενεργή D μορφή. Σύμφωνα με την μελέτη των Sorokin & Myers (1956), σε καλλιέργειες συνεχούς φωτισμού η ρήξη των L μορφών και η απελευθέρωση των D αυτοσπορίων ξεκινάει μετά από εννέα ώρες και τα D συναντώνται κυρίως σε ενεργή μορφή.

Η αναλογία L:D μορφών φαίνεται να επηρεάζεται από την θερμοκρασία και την ένταση φωτισμού, με υψηλές θερμοκρασίες (της τάξης των 25°C) και χαμηλές εντάσεις φωτός να ευνοούν την D μορφή. Συνοπτικά, ο ρυθμός ανάπτυξης της Chlorella σε χαμηλό φωτισμό καθορίζεται αποκλειστικά από την φωτοσύνθεση ενώ σε υψηλό φωτισμό εμπλέκονται και αερόβιες μεταβολικές διεργασίες.



Εικόνα 6: Στάδια ανάπτυξης της Chlorella. Τα κίτρινα βέλη υποδηλώνουν τις φωτοεξαρτώμενες διαδικασίες ενώ τα μπλε τις φωτοανεξάρτητες.

Τροποποιημένο από Tamiya et al., 1953

1.5. Η επίδραση της μεθανόλης στην ανάπτυξη των κυττάρων (methanol effect)

Η μεθανόλη (CH₃OH) έχει βιβλιογραφικά προταθεί ως εναλλακτική φτηνή πηγή οργανικού άνθρακα για δραστική αύξηση βιομάζας (methanol effect) φωτοσυνθετικών οργανισμών. Η πλειονότητα των μελετών του methanol effect έχει πραγματοποιηθεί σε ανώτερα φυτά (π.χ. τομάτα, βαμβάκι) και φαίνεται ότι ψέκασμα του φυλλώματος σε ποσότητες της τάξης του 10-50% v/v απαιτούνται για την εμφάνιση του methanol effect (Nonomura & Benson, 1992). Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι παράγωγα της φωτοαναπνοής όπως η γλυκίνη δείχνουν να μειώνουν την τοξικότητα της μεθανόλης και να ενισχύουν το methanol effect. Για τον λόγο αυτό πιθανολογείται ότι το methanol effect δεν εμφανίζεται σε C₄ φυτά που έχουν πολύ μειωμένη φωτοαναπνοή. Απλούστεροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί (π.χ. χλωροφύκη) απαιτούν πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις μεθανόλης, ενώ φαίνεται ότι συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3% v/v είναι τοξικές (Theodoridou et al., 2002; Navakoudis et al., 2007; Choi et al., 2011). Έχει αποδειχθεί ότι το methanol effect είναι αποκλειστικά φωτοεξαρτώμενο, αφού δεν σημειώνεται απουσία φωτός, ούτε σε ετερότροφες καλλιέργειες. Αυτό υποδεικνύει ότι η μεθανόλη εμπλέκεται σε κάποιο στάδιο της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Σήμανση με ραδιενεργό ισότοπο (¹⁴C) έδειξε ότι η CH₃OH αφού προσληφθεί ακολουθεί μια σειρά οξειδώσεων (φορμαλδεΰδη, φορμικό οξύ) με τελική μορφή CO₂ το οποίο στη συνέχεια εισάγεται στον κύκλο Calvin-Benson προς σύνθεση υδατανθράκων (Navakoudis et al., 2007). Οι Kotzabasis et al. (1998) μελέτησαν την επίδραση της μεθανόλης στην *Chlorella minutissima* και συμπέραναν ότι εξαρτάται από ποικιλία παραγόντων όπως η δόση, η συχνότητα χορήγησης και η φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων που με τη σειρά της επηρεάζεται από την διαθέσιμη ακτινοβολία ολικά αλλά και ανά κύτταρο (αυτοσκιασμός). Από την μελέτη αυτή προέκυψε ότι χαμηλές δόσεις με καθημερινή χορήγηση στα κύτταρα επάγουν το methanol effect, ενώ η εφάπαξ χορήγηση δεκαπλάσιας ποσότητας αρχικά προκαλεί έντονη ανάπτυξη αλλά τελικά οδηγεί σε χαμηλότερη βιομάζα. Μεταγενέστερες μελέτες της ίδιας ομάδας (Navakoudis et al., 2007) έδειξαν ότι η χορήγηση μεθανόλης σε συνθήκες υψηλού φωτισμού στο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* επιδρά στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και συγκεκριμένα στο LHC II με τρόπο παρόμοιο με το CO₂, δηλαδή με μείωση του μεγέθους των φωτοσυνθετικών κεραιών ανά κέντρο αντίδρασης και της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ). Οι έρευνες των Choi et al. (2011) σε *Chlorella* καθορίζουν το 1% v/v ως την μέγιστη ποσότητα MeOH για επαγωγή του methanol

effect με έκθεση σε ακτινοβολία έντασης $450 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Μάλιστα παρατήρησαν ότι επώαση των καλλιεργειών σε συνεχή φωτισμό βελτιστοποιεί την αύξηση βιομάζας, αλλά φωτοπερίοδος 12:12 ενισχύει την παραγωγή και ποιότητα των λιπιδίων, πολύτιμων για παραγωγή βιοντίζελ.

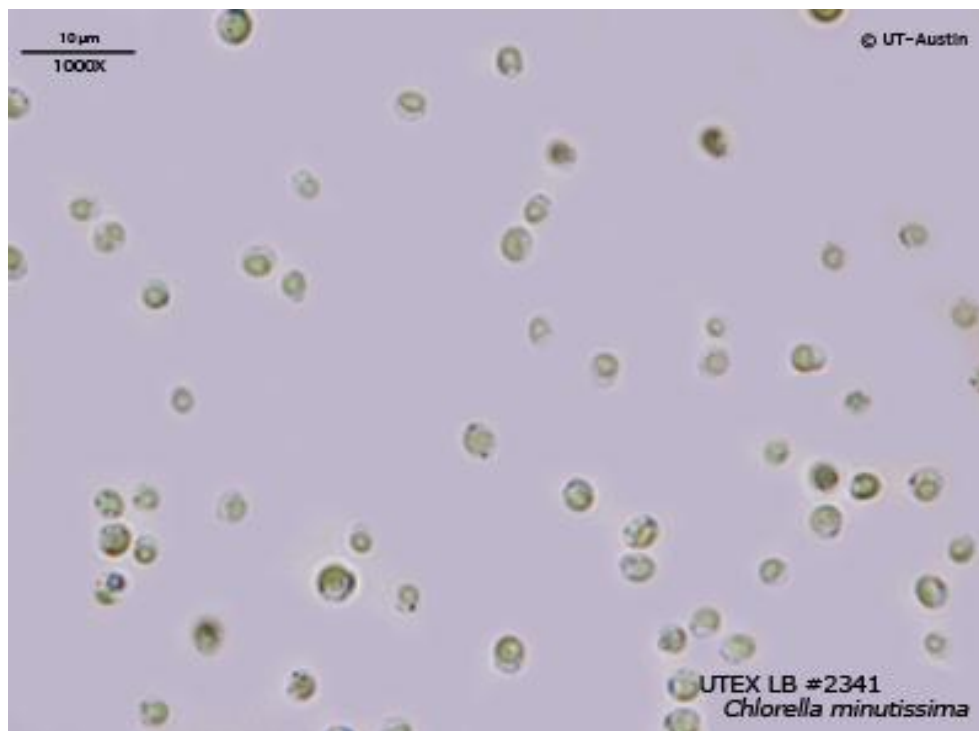
Σκοπός της παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής απόδοσης του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Chlorella minutissima* (strain UTEX 2341) σε συνάρτηση με ορισμένους παράγοντες. Οι παράγοντες που διερευνήθηκαν περιλαμβάνουν την θερμοκρασία, την αλατότητα και την αρχική συγκέντρωση κυττάρων στην καλλιέργεια καθώς και τον προσδιορισμό κατάλληλου θρεπτικού μέσου για τη βέλτιστη αυτότροφη ανάπτυξη. Στα πλαίσια εύρεσης μιας εναλλακτικής οργανικής πηγής για βέλτιστη μικρότροφη ανάπτυξη που θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες (βιοαντιδραστήρες), ελέγχθηκε παράλληλα με την χρήση πεπτόνης, η καταλληλότητα του γλουταμικού οξέος για την επαγωγή της φωτοανάπτυξης ενός αποδοτικότερου φωτοσυνθετικού μηχανισμού που στη συνέχεια θα συμβάλλει στην αύξηση της βιομάζας. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας εξετάστηκε και η δυνατότητα χρήσης μεθανόλης ως εναλλακτικής πηγής οργανικού άνθρακα, γνωρίζοντας ότι επάγει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και κατά συνέπεια την αύξηση βιομάζας, ενώ ταυτόχρονα είναι τοξική για βακτήρια και μύκητες.

2.Υλικά & Μέθοδοι

2.1.Οργανισμός

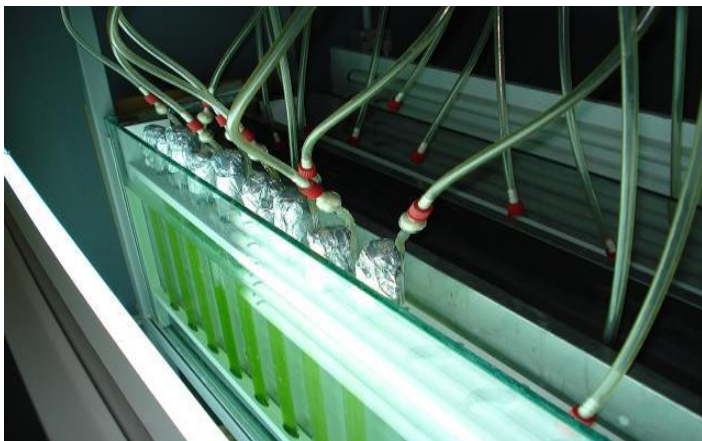
Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο ευκαρυωτικό χλωροφύκος *Chlorella minutissima* (strain UTEX 2341), το οποίο είναι θαλάσσιο πλαγκτονικό, δηλαδή δεν διαθέτει ικανότητα ενεργητικής κίνησης. Τα κύτταρα της *C.minutissima* είναι μικροσκοπικά και σφαιρικά (Dempsey et al., 1980). Το γένος *Chlorella* θα μπορούσαμε να πούμε ότι αποτελεί οργανισμό μοντέλο στην έρευνα για την φωτοσύνθεση, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την μελέτη των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης από τους Calvin και Benson (1948).



2.2. Συνθήκες καλλιέργειας

Λόγω του σχετικά μεγάλου αριθμού διαφορετικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, οι αναφερόμενες συνθήκες αλλά και η σύσταση θρεπτικών δεν αφορούν όλα τα πειράματα, αλλά την πλειονότητά τους. Στα πειράματα όπου οι συνθήκες ή τα θρεπτικά ήταν διαφορετικά γίνεται λόγος στην περιγραφή του εκάστοτε πειράματος.

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (μήκος 40cm, διάμετρος 5cm) με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος για αερισμό, υπό συνεχή φωτισμό ($170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) και σταθερή θερμοκρασία (30°C). Όλες οι μεταχειρίσεις πραγματοποιούνταν σε θρεπτικό όγκου 200mL και ξεκινούσαν με αρχικό κυτταρικό όγκο (ως Packed Cell Volume) $0.5 \mu\text{L PCV mL}^{-1}$ που προερχόταν είτε από καλλιέργειες σε τρυβλία Petri είτε από μητρικές καλλιέργειες ηλικίας 5 ημερών, ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Στα πειράματα με χορήγηση μεθανόλης, επειδή ήταν απαραίτητο τα ενεργειακά αποθέματα (π.χ. αμυλόκοκκοι) που είχαν τα κύτταρα από τα τρυβλία να καταναλωθούν μέσω κυτταρικού μεταβολισμού, χρησιμοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες των μητρικών ηλικίας πέντε ημερών.



Εικόνα 7: Οι καλλιέργειες στον θάλαμο επώασης

Στο πείραμα για την επίδραση της θερμοκρασίας οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε φιάλες Erlenmeyer σε θρεπτικό όγκου 150mL και με αρχικό κυτταρικό όγκο (ως Packed Cell Volume) $0.5 \mu\text{L PCV mL}^{-1}$. Οι φιάλες ήταν σφραγισμένες με βαμβάκι, τοποθετήθηκαν σε επωαστήρες ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτισμού ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) και τέθηκαν υπό συνεχή ανακίνηση για ανταλλαγή αερίων και αποφυγή καθίζησης των κυττάρων.

2.3.Θρεπτικό μέσο

Τα δύο θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν το F2P και το Bishop and Senger (1971) που από εδώ και πέρα θα αναφέρεται ως “Bishop” για λόγους συντομίας. Η σύσταση των εν λόγω θρεπτικών είναι η ακόλουθη:

Θρεπτικό “Bishop”

	mg L ⁻¹ καλλιέργειας
A (μακροστοιχεία)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	15
KNO ₃	810
MgSO ₄ .7 H ₂ O	246
Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O	178
NaH ₂ PO ₄ .1 H ₂ O	405
B (μικροστοιχεία)	
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ .4 H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0.222
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.079
MoO ₃ (85%)	0.0177
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .x H ₂ O	3
Fe(III)citrate	240

Θρεπτικό F2P

	mg L ⁻¹ καλλιέργειας
A.Μακροστοιχεία	
NaNO ₃	75
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	5.65
B.Μικροστοιχεία	
Na ₂ EDTA	4.16
FeCl ₃ .6 H ₂ O	3.15
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0.022
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.01
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0.18
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.006
Vitamin mix	
Cyanocobalamin (B ₁₂)	0.0005
Thiamine HCl (B ₁)	0.1
Biotin (B ₇)	0.0005

2.4. Εκτίμηση βιομάζας ως Packed Cell Volume (PCV)

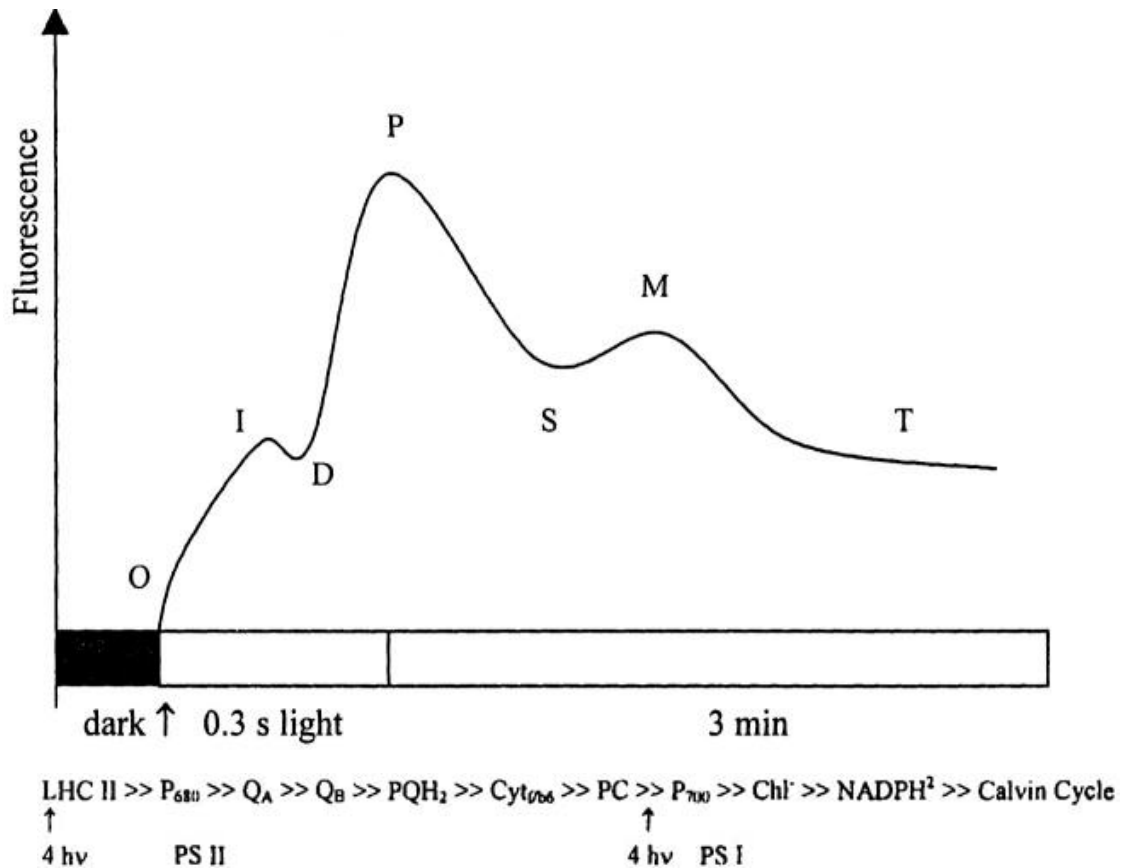
Η εκτίμηση της βιομάζας μιας καλλιέργειας παρουσιάζεται εκφρασμένη σε μL πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) ανά mL καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, 2mL δείγματος εισάγονται σε βαθμονομημένα αιματοκριτικά σωληνάρια και ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 min σε 1500g . Στη συνέχεια από την ένδειξη των σωληναρίων ανάγεται η ποσότητα πακεταρισμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.

2.5. Πολαρογραφική μέτρηση φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας

Η εκτίμηση έγινε με βάση τη μέθοδο του Walker (1988) και χρησιμοποιήθηκε Clark type ηλεκτρόδιο (Hansatech, UK). Μεταξύ ανόδου αργύρου και καθόδου λευκόχρυσου ασκείται μικρή τάση (50mV) μέσω ηλεκτρολύτη KCl . Για την μεταφορά ηλεκτρονίων είναι απαραίτητη η διάχυση του οξυγόνου από το υγρό δείγμα μέσω της επιλεκτικά περατής μεμβράνης. Η ένταση του ρεύματος αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξυγόνου και ανιχνεύεται από τον ειδικό αισθητήρα. Κατά τον φωτισμό του δείγματος για τον υπολογισμό της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε ένταση φωτός $550\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{sec}^{-1}$, φιλτραρισμένη από κυψελίδα (πάχους 4cm) που περιείχε διάλυμα 2% CuSO_4 για την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας και την αποφυγή θέρμανσης του δείγματος στο θάλαμο μέτρησης. Η αναπνευστική δραστηριότητα μετρήθηκε σε απόλυτο σκοτάδι. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου δεν αφορούν την ολική φωτοσύνθεση αλλά την καθαρή φωτοσύνθεση, δηλαδή το οξυγόνο που παράγεται συνολικά πλην αυτού που καταναλώνεται λόγω αναπνοής. Η κυτταρική συγκέντρωση των προς οξυγονομέτρηση δειγμάτων ρυθμίστηκε σε $10\ \mu\text{L PCV mL}^{-1}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα τρισίνης (10mM τρισίνης $\text{pH } 7.6$, 10mM NaHCO_3), ενώ οι μετρήσεις ανάχθηκαν σε $\text{nmol οξυγόνου } \mu\text{L}^{-1}\ \text{PCV h}^{-1}$.

2.6. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και JIP-test

Για τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η συσκευή handy Plant Efficiency Analyser (Hansatech) και τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Biolyser HP 4.0. Ο φθορισμός των δειγμάτων επάγεται από τρεις διόδους εκπομπής ερυθρής ακτινοβολίας (650 nm) έντασης $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η μέθοδος βασίζεται σε μέτρηση της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση έως και 10 μsec για χρονικό διάστημα 1 sec. Σε κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 2mL δείγματος και πριν την έναρξη κάθε μέτρησης το δείγμα αφηνόταν για πέντε λεπτά στο σκοτάδι ώστε τα κέντρα αντίδρασης να αδειάσουν από ηλεκτρόνια.



Εικόνα 8: Επαγωγικός φθορισμός χλωροφύλλης (Kautsky effect) μετά από φωτισμό δείγματος προσαρμοσμένου στο σκοτάδι. Στο κάτω μέρος της εικόνας αντιστοιχίζονται οι φάσεις της καμπύλης με τα σημεία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Πηγή: Reigosa Roger & Weiss (2001).

Χρησιμοποιώντας την καμπύλη επαγωγικού φθορισμού (Kautsky curve) και σύμφωνα με την μέθοδο των Strasser & Strasser (1995) καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός πληθώρας παραμέτρων που αποτελούν ένδειξη για την μοριακή δομή, λειτουργία και αποδοτικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η σημαντικότερη παράμετρος που αποτελεί ένδειξη της φωτοσυνθετικής απόδοσης είναι ο λόγος F_v/F_m . Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται συνοπτικά και οι 45 παράμετροι του JIP-test. Αξίζει να αναφερθεί ότι ορισμένες από αυτές επηρεάζονται από την κυτταρική συγκέντρωση και την σύσταση σε χλωροφύλλες του δείγματος. Επειδή η πλήρης εκχύλιση και ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών δεν ήταν εφικτή, πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι τα δείγματα δεν κανονικοποιήθηκαν ως προς το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη πριν τις μετρήσεις. Έτσι, είναι φανερό ότι σε ορισμένες περιπτώσεις και χειρισμούς κάποιες έντονες διαφορές στα radar plot των JIP-test οφείλονται σε ανόμοια κυτταρική συγκέντρωση ή ποσότητα χλωροφυλλών. Έτσι στα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στοχευμένες μόνο παράμετροι του JIP-test που δεν επηρεάζονται από την ανομοιογένεια των δειγμάτων.

Παράμετροι του JIP-test	Επεξήγηση παραγόντων
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη επαγωγικού φθορισμού και την ευθεία $F=F_m$
Fo	Ελάχιστη τιμή φθορισμού για $t=0$ (όλα τα RC ανοιχτά)
Fm	Μέγιστη τιμή φθορισμού για $t=t_{Fm}$ (όλα τα RC κλειστά)
Fv/Fm	Λόγος μεταβλητού (F_m-F_o) προς μέγιστο φθορισμό (Μέτρο φωτοσυνθετικής απόδοσης)
F1	Φθορισμός στα 0.05 msec
F2	Φθορισμός στα 0.10 msec
F3	Φθορισμός στα 0.30 msec
F4	Φθορισμός στα 2 msec (F_J)
F5	Φθορισμός στα 30 msec (F_I)
Fo/Fm	Λόγος ακραίων τιμών φθορισμού
Fv/Fo	Λόγος μεταβλητού (F_m-F_o) προς ελάχιστο φθορισμό
dV/dto	Αρχικός ρυθμός μεταβολής του σχετικού μεταβλητού φθορισμού
dVG/dto	Αρχικός ρυθμός μεταβολής του σχετικού μεταβλητού φθορισμού κανονικοποιημένος ως προς V_J (Specific trapping flux per RC)
V_J	Σχετικός μεταβλητός φθορισμός στο βήμα J
V_I	Σχετικός μεταβλητός φθορισμός στο βήμα I
PHI(Po)	Μέγιστη απόδοση πρωτογενούς φωτοχημείας
PSIo	Πιθανότητα ένα ηλεκτρόνιο να μεταφερθεί πέρα από την Q_A στην αλυσίδα μεταφοράς
PHI(Eo)	Κβαντική απόδοση μεταφοράς ηλεκτρονίων
PHI(Do)	Κβαντική απόδοση διάχυσης ενέργειας

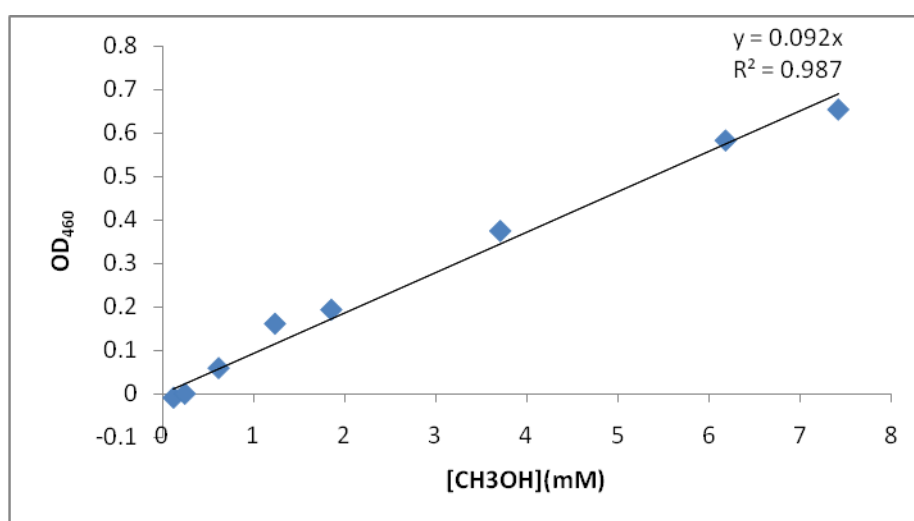
Sm	Αριθμός οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q _A για να κλείσουν όλα τα RCs
N	Κύκλοι αναγωγής της Q _A σε χρόνο t _{Fm}
Sm/T(fmax)	Μέση οξειδοαναγωγική κατάσταση των RCs μέχρι t _{Fm}
Sum K	Άθροισμα σταθερών μεταβολής (K _n +K _p)
K _n	Μη φωτοχημική σταθερά μεταβολής
K _p	Φωτοχημική σταθερά μεταβολής
ABS/RC	Απορροφώμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (Μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας)
TRo/RC	Παγιδευμένη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης
ETo/RC	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης
DIo/RC	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης
RC/CSo	Πυκνότητα ενεργών κέντρων (t=0)
ABS/CSo	Απορροφώμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (με βάση το F _o)
TRo/CSo	Παγιδευμένη ενέργεια ανά περιοχή (t=0)
ETo/CSo	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή (t=0)
DIo/CSo	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή (t=0)
RC/CSm	Πυκνότητα ενεργών κέντρων (t=t _{Fm})
ABS/CSm	Απορροφώμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (με βάση το F _m)
TRo/CSm	Παγιδευμένη ενέργεια ανά περιοχή (t=t _{Fm})
ETo/CSm	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή (t=t _{Fm})
DIo/CSm	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή (t=t _{Fm})
SFI(abs)	Δείκτης λειτουργικότητας
PI(abs)	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
PI(cso)	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t=0)
PI(csm)	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t=t _{Fm})
D.F.	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

2.6.1 Φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυστήματος II σε συνθήκες χημικής ισορροπίας (steady state) (ΦPSII)

Για την μέτρηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης των κυττάρων σε σταθερή κατάσταση το κάθε δείγμα εκτέθηκε σε ακτινικό φως 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 320 sec και στο τέλος της περιόδου είχε επιτευχθεί χημική ισορροπία. Το δείγμα μετά το ακτινικό φως αφέθηκε για 120 sec στο σκοτάδι προκειμένου να χαλαρώσει. Ανά 40 sec ακτινοβολούνταν με 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για τον ακριβή καθορισμό της μέγιστης τιμής φθορισμού. Το F_v'/F_m' που παρουσιάζεται αφορά την μέτρηση που το δείγμα είχε προσαρμοστεί (χημική ισορροπία), δηλαδή στα 320 sec.

2.7. Ποσοτικός προσδιορισμός μεθανόλης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεθανόλης ακολουθήθηκε η ιδιαίτερα ευαίσθητη (γραμμικότητα καμπύλης για εύρος 2-40μg) μέθοδος των Wood & Siddiqui (1971) που στηρίζεται στην οξείδωση της μεθανόλης σε φορμαλδεΰδη και στην φωτομέτρηση του έγχρωμου προϊόντος. Το πρωτόκολλο ξεκινάει με προσθήκη 1N H₂SO₄ στα δείγματα (τελικού όγκου 1mL) και ψύξη σε πάγο. Έπειτα προστίθενται στο κάθε δείγμα 200μL 2% (w/v) ένυδρου KMnO₄ (potassium permanganate, οξειδωτικός παράγοντας) που προσδίδει βαθύ ιώδες χρώμα, ακολουθεί ήπια ανάδευση και τα δείγματα παραμένουν στον πάγο για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 200μL 0.5M NaAsO₂ (sodium arsenite, αναγωγικός παράγοντας για περίσσεια KMnO₄) και 600μL απιονισμένο νερό, ακολουθεί έντονη ανάδευση. Στο σημείο αυτό τα δείγματα έχουν πάρει καφεπράσινο χρώμα και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά, οπότε και επέρχεται πλήρης αποχρωματισμός. Προστίθενται 2mL 0.02M C₅H₈O₂ (pentane-2,4-dione/acetylacetone) διαλυμένα σε 2M CH₃COONH₄ (ammonium acetate) και 0.05M CH₃COOH (acetic acid) δίνοντας κίτρινο χρώμα, και έπειτα από ανάδευση τα δείγματα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C, αφού σφραγιστούν με γυάλινες μπίλιες για να αποφευχθεί η εξάτμιση της μεθανόλης. Μετά από 15 min τα δείγματα αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και αφήνονται να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ξεκινήσει η φωτομέτρηση. Για την φωτομέτρηση στα 460nm χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο Ocean Optics USB4000, πηγή φωτός DH-2000-BAL και το λογισμικό Spectra Suite. Οι συγκεντρώσεις μεθανόλης στα δείγματα προσδιορίστηκαν με βάση την παρακάτω πρότυπη καμπύλη:



Εικόνα 9: Πρότυπη καμπύλη μεθανόλης για απορρόφηση στα 460nm

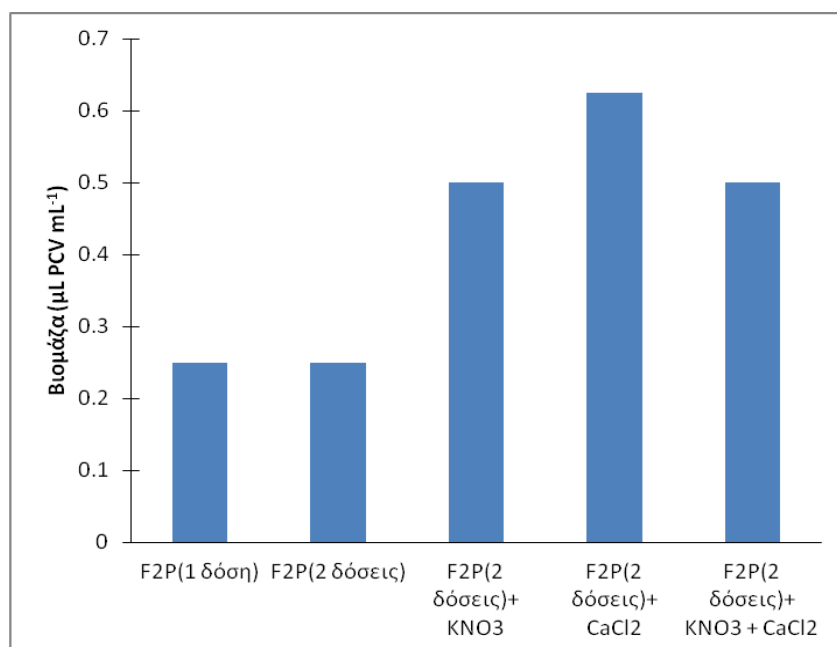
3.Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1.Μελέτη αυτότροφων θρεπτικών για την ανάπτυξη του χλωροφύκου *Chlorella minutissima*

3.1.1.Θρεπτικό F2P

Στη μελέτη αυτή ελέγχθηκε η καταλληλότητα του ευρέως χρησιμοποιούμενου θρεπτικού F2P για την ανάπτυξη της *C. minutissima*, η επίδραση διπλάσιας δόσης από την συνιστώμενη (0.1 g L^{-1} καλλιέργειας) καθώς και η επιπλέον προσθήκη αλάτων, συγκεκριμένα 8mM KNO_3 και 0.1mM CaCl_2 , αφού το F2P είναι ιδιαίτερα φτωχό (σύμφωνα με την σύσταση του θρεπτικού Bishop) στα εν λόγω άλατα. Το θρεπτικό παρασκευάστηκε με αλατότητα 25gr NaCl ανά λίτρο καλλιέργειας.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, το F2P δεν ευνοεί την ανάπτυξη της *C. minutissima*, η διπλάσια δόση δεν δείχνει να έχει κάποια θετική επίδραση, ενώ η επιπλέον προσθήκη αλάτων συμβάλλει αισθητά στην αποδοτικότητα του θρεπτικού. Συγκεκριμένα, η προσθήκη KNO_3 και συνδυασμού KNO_3 με CaCl_2 βελτιώνει κατά 100% την ανάπτυξη, ενώ η προσθήκη μόνο CaCl_2 κατά 150%.



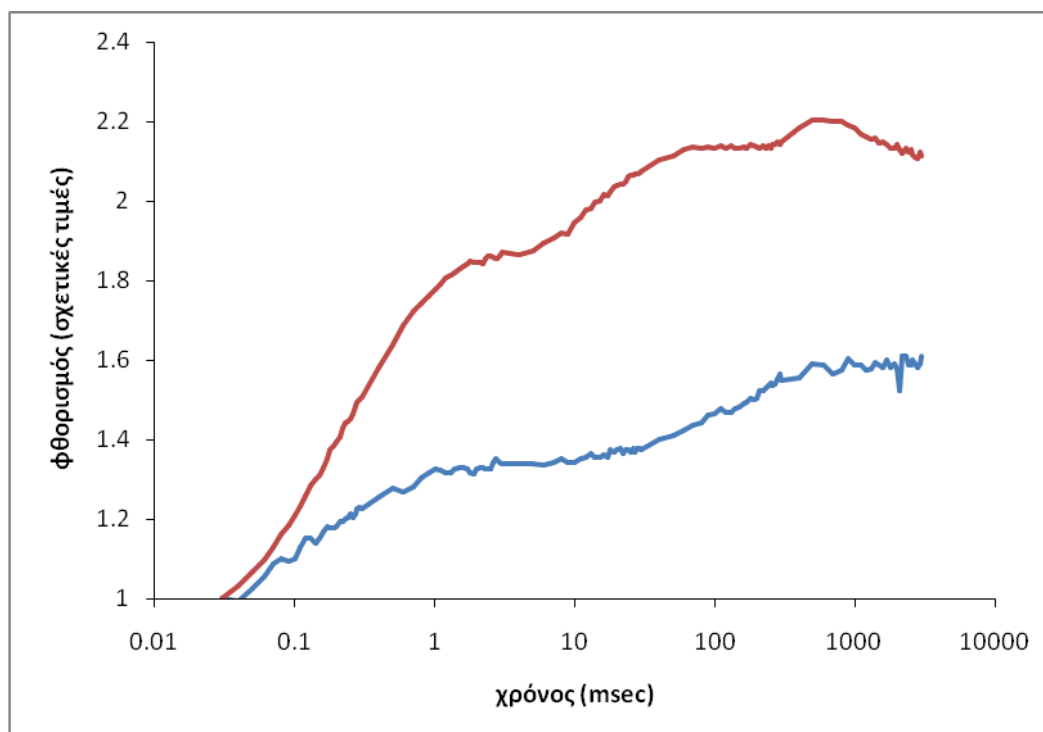
Εικόνα 10: Επίπεδα βιομάζας την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας σε διαφορετικά θρεπτικά: θρεπτικό F2P (0.1 g L^{-1} καλλιέργειας), διπλή δόση F2P (0.2 g L^{-1}), διπλή δόση F2P με προσθήκη 8mM KNO_3 , διπλή δόση F2P με προσθήκη 0.1mM CaCl_2 και διπλή δόση F2P με προσθήκη 8mM KNO_3 και 0.1mM CaCl_2 .

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εκφρασμένη ως Fv/Fm παρουσιάζει αρκετά χαμηλές τιμές (που κυμαίνονται μεταξύ 0.29 και 0.39) την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

Πίνακας 1: Επίδραση διπλάσιας δόσης F2P και προσθήκης αλάτων KNO₃ και CaCl₂ στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

Χειρισμοί	F2P (1δόση)	F2P (2δόσεις)	F2P (2 δόσεις) + KNO ₃	F2P (2 δόσεις) + CaCl ₂	F2P (2 δόσεις) + KNO ₃ + CaCl ₂
Fv/Fm	0.386	0.353	0.295	0.303	0.299

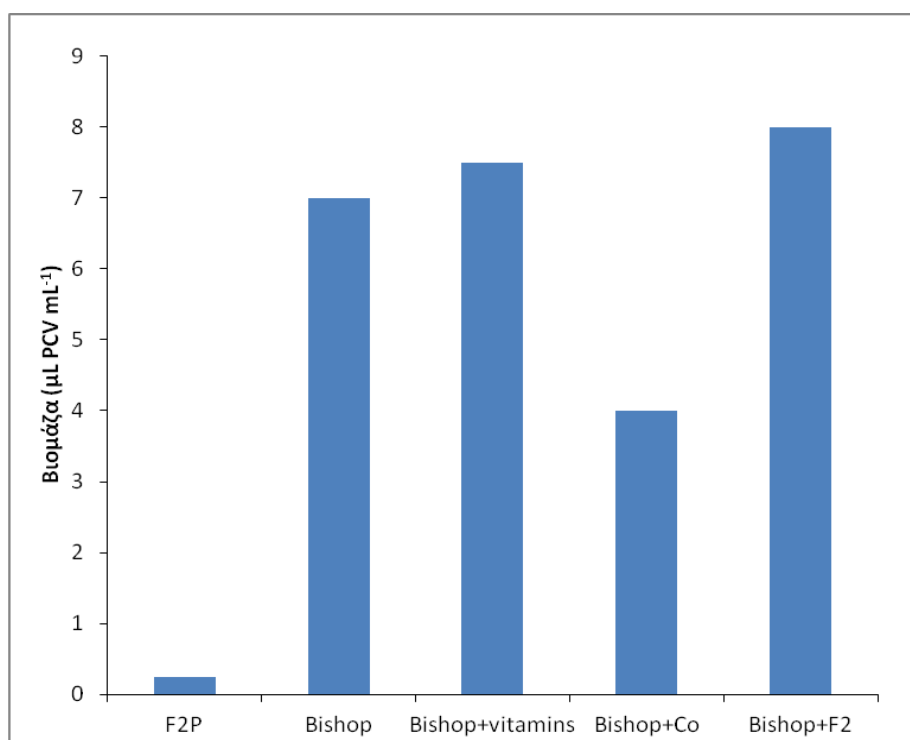
Η καμπύλη επαγωγικού φθορισμού για τον χειρισμό με μια δόση F2P δεν ακολουθεί την κλασική μορφή O-J-I-P γεγονός που αποτελεί ένδειξη μη πλήρως λειτουργικών PSII. Αντίθετα, η αντίστοιχη εικόνα για το θρεπτικό Bishop εμφανίζει χαρακτηριστική καμπύλη που αποτελεί ένδειξη για καλύτερη λειτουργία των φωτοσυνθετικών μονάδων.



Εικόνα 11: Καμπύλη επαγωγικού φθορισμού την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας για θρεπτικό με μια δόση F2P (μπλε) και για θρεπτικό Bishop (κόκκινο).

3.1.2.Θρεπτικό Bishop

Κατά την μελέτη αυτή εξετάστηκε η καταλληλότητα του θρεπτικού Bishop για την καλλιέργεια της *C.minutissima* και επιχειρήθηκε η βελτίωση του ως προς την σύσταση σε βιταμίνες. Συγκεκριμένα η βιταμίνη B₁₂ (κυανοκοβαλαμίνη) προτείνεται από τους Harisson & Berges (2004) ως η πιο σημαντική βιταμίνη για την ανάπτυξη μικροφυκών, για το λόγο αυτό δοκιμάστηκε η προσθήκη 10⁻⁷M Co (απαραίτητο για σύνθεση B₁₂). Το Co επέδρασε αρνητικά στην ανάπτυξη (μείωση κατά 42%) του φύκους κι έτσι φαίνεται ότι το φύκος δεν έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της B₁₂, για το λόγο επιχειρήθηκε προσθήκη B₁₂, B₁ (θειαμίνη) και B₇ (βιοτίνη) δείχνοντας μία οριακά θετική επίδραση (7% καλύτερη ανάπτυξη βιομάζας). Τέλος, στο θρεπτικό Bishop προστέθηκε υγρό τροποποιημένο F₂ (1mL L⁻¹) που περιλαμβάνει εκτός των άλλων βιταμίνες B₁₂, B₁ και B₇. Η προσθήκη αυτή ήταν πιο επιτυχής, αφού οδήγησε σε 14% υψηλότερη αύξηση βιομάζας (Εικόνα 12). Γενικά το θρεπτικό Bishop φαίνεται να είναι καταλληλότερο από το F2P υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.



Εικόνα 12: Επίπεδα βιομάζας την τρίτη ημέρα καλλιέργειας για χειρισμούς: Bishop, Bishop με προσθήκη βιταμινών B₁₂, B₁ και B₇, Bishop με προσθήκη 10⁻⁷M Co και Bishop με προσθήκη F₂ (1mL L⁻¹) σε σύγκριση με το θρεπτικό F2P.

3.2.Στοχευμένες αλλαγές στο αυτότροφο θρεπτικό Bishop για βέλτιστη ανάπτυξη του χλωροφύκου *Chlorella minutissima*

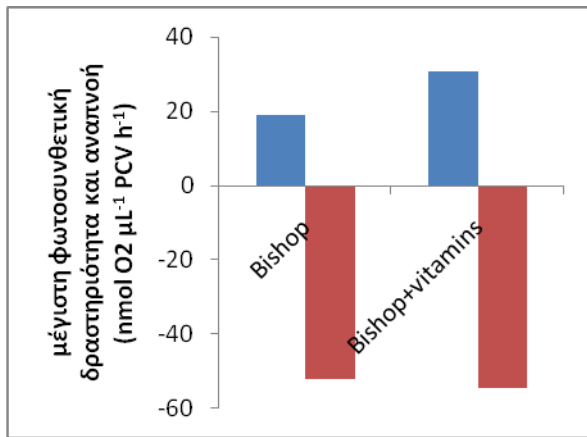
3.2.1.Επίδραση βιταμινών B₁₂, B₁ και B₇

Η επίδραση των βιταμινών στην ανάπτυξη και την φωτοσύνθεση της *C. minutissima* μελετήθηκε πιο αναλυτικά. Σύμφωνα με τους Harisson & Berges (2004) τρεις υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη μικροφυκών και η ιεραρχία σημαντικότητάς τους είναι B₁₂>B₁>B₇. Στο φυσικό περιβάλλον των μικροφυκών συναντώνται σε απειροελάχιστες ποσότητες και παραμένει αναπάντητο το πως προσλαμβάνονται επαρκώς. Μια θεωρία υποστηρίζει την συμβίωση των φυκών με βακτήρια που παράγουν τις βιταμίνες αυτές (Croft et al., 2006).

Η κυανοκοβαλαμίνη (B₁₂) είναι μια τετραπυρρόλη που περιέχει κοβάλτιο και αποτελεί συμπράγοντα αναγωγικών και μεθυλομεταφορικών ενζύμων. Η B₁₂, ως συμπράγοντας της συνθάσης της μεθειονίνης, εμπλέκεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης. Για τον λόγο αυτό η έλλειψη B₁₂ δείχνει να μειώνει την σύνθεση DNA και να διαταράσσει τον μεταβολισμό του φολικού που αποτελεί επίσης συμπράγοντα της συνθάσης της μεθειονίνης. Η θειαμίνη (B₁) λειτουργεί ως συμπράγοντας πολυάριθμων ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό υδατανθράκων και διακλαδισμένων αμινοξέων όπως η πυροσταφυλική αφυδρογονάση, η τρανσκετολάση, η α-κετοξική αποκαρβοξυλάση και η α-κετοξική οξειδάση. Η βιοτίνη (B₇) αποτελεί συμπράγοντα σημαντικών αποκαρβοξυλασών όπως η αποκαρβοξυλάση του ακετυλο-συνενζύμου A που συμμετέχει στην βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (Croft et al., 2006).

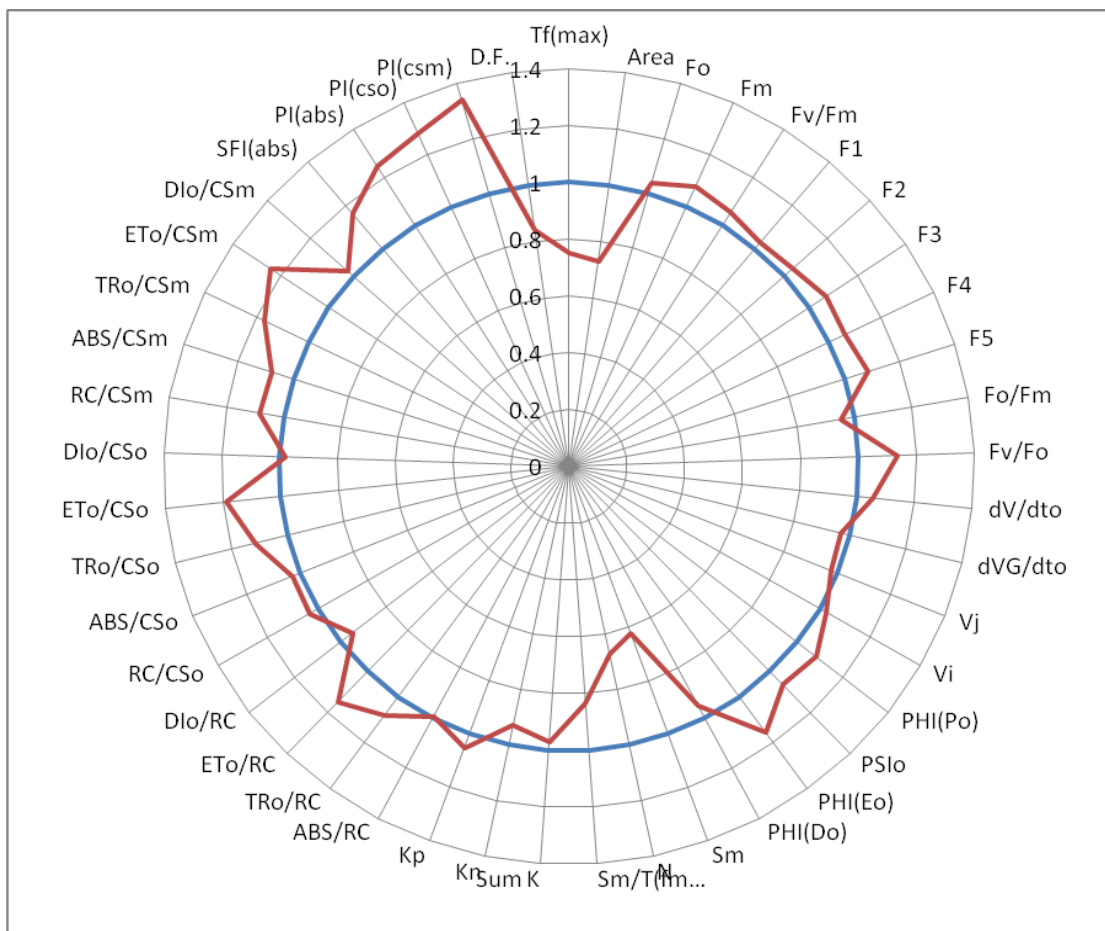
Στην δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό Bishop σε αλατότητα 25‰, ενώ οι ποσότητες των βιταμινών (B₁₂, B₁ και B₇) ακολουθούν αυτές του θρεπτικού F2. Η επίδραση τους φαίνεται να είναι θετική ως προς την αύξηση βιομάζας (7%) όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αλλά και ως προς την φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Εικ.13), όπου ο χειρισμός με βιταμίνες εμφανίζει 63% υψηλότερη φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου, ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα παραμένει ουσιαστικά σταθερή.

Εφόσον οι βιταμίνες έδειξαν να έχουν θετική επίδραση στην ανάπτυξη αλλά και στην φωτοσύνθεση των κυττάρων, το μίγμα των βιταμινών χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις επόμενες δοκιμασίες.



Εικόνα 13: Πολαρογραφική εκτίμηση κατανάλωσης (αναπνοή, κόκκινο) και έκλυσης οξυγόνου (καθαρή φωτοσύνθεση, μπλε) την πρώτη ημέρα καλλιέργειας για χειρισμούς με θρεπτικό Bishop και Bishop με προσθήκη B₁₂, B₁ και B₇.

Ο χειρισμός με προσθήκη βιταμινών φαίνεται ότι υπερέχει και σε συγκεκριμένες παραμέτρους του JIP-test. Για παράδειγμα οι δείκτες κβαντικής απόδοσης $\Phi(P_0)$, $\Phi(E_0)$, Ψ_0 , οι ενεργότητες ανά κέντρο αντίδρασης TR_0/RC , ET/RC και οι ευαίσθητοι δείκτες απόδοσης $PI(ABS)$, $PI(CS_0)$, $PI(CS_m)$ είναι υψηλότεροι στον χειρισμό βιταμινών, ενώ η μη φωτοχημική απόσβεση ανά ενεργό κέντρο (DI_0/RC) εμφανίζεται μειωμένη (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Οι παράμετροι του JIP-test για τους χειρισμούς Bishop (μπλε) και με προσθήκη B₁₂, B₁ και B₇ (κόκκινο) την πρώτη ημέρα της καλλιέργειας.

3.2.2. Επίδραση σιδήρου και πεπτόνης

Ο σίδηρος λόγω της ιδιότητάς του να εναλλάσσεται οξειδοαναγωγικά ανάμεσα στις καταστάσεις Fe(II) και Fe(III) αποτελεί κοινή προσθετική ομάδα ενζύμων που σχετίζονται με μεταφορά ηλεκτρονίων. Ο Sandmann (1985) μελέτησε τα συμπτώματα έλλειψης σιδήρου στο κυανοβακτήριο *Aphanocapsa* και παρατήρησε ότι η φωτοσυνθετική δραστηριότητα επηρεάζεται έντονα, αφού άτομα σιδήρου εντοπίζονται στο PSII, στο PSI και στο cyt b_6f . Συνολικά 21 άτομα σιδήρου απαιτούνται για μια πλήρη μη κυκλική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σύμφωνα με την μελέτη των Guikema & Sherman (1983) σε κυανοβακτήρια, σε συνθήκες σοβαρής έλλειψης επηρεάζεται και η βιοσύνθεση χλωροφύλλης αφού τα κύτταρα εμφανίζουν μόνο 35% της chl a σε σχέση με το φυσιολογικό. Επιπλέον παρατηρείται μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση, ελάττωση θυλακοειδών και διαφοροποίηση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών ως αποτέλεσμα της έλλειψης.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερή η ανάγκη για επάρκεια σιδήρου στις καλλιέργειες, τόσο σε ποσότητα όσο και σε διαθεσιμότητα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε προσθήκη σιδήρου εκτός αυτού που ήδη περιέχει το θρεπτικό με τη μορφή $Fe_2(SO_4)_3 \cdot x H_2O$ και Fe(III)citrate. Ο σίδηρος προστέθηκε σε μορφή $FeCl_3$ (0.011 M), ενώ δοκιμάστηκε και η χρήση του χηλικού παράγοντα Na_2EDTA (0.011 M) που εξασφαλίζει την διαθεσιμότητα του Fe σε μορφή προσλήψιμη από τα κύτταρα (Lewin & Chen, 1971) και αποτρέπει την καθίζηση των μεταλλικών αλάτων (Harisson & Berges, 2004). Οι συγκεκριμένες ποσότητες $FeCl_3$ και Na_2EDTA στηρίζονται στην σύσταση του F2. Τέλος δοκιμάστηκε η επίδραση της πεπτόνης σε ποσότητα $1 g L^{-1}$ καλλιέργειας, η οποία όμως προστέθηκε την πρώτη ημέρα του πειράματος. Η πεπτόνη είναι προϊόν ενζυματικής πέψης ζωικών ιστών και αποτελεί πλούσια πηγή θρεπτικών για καλλιέργεια μικροοργανισμών. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε αλατότητα 25‰ και περιείχαν βιταμίνες B_{12} , B_1 και B_7 .

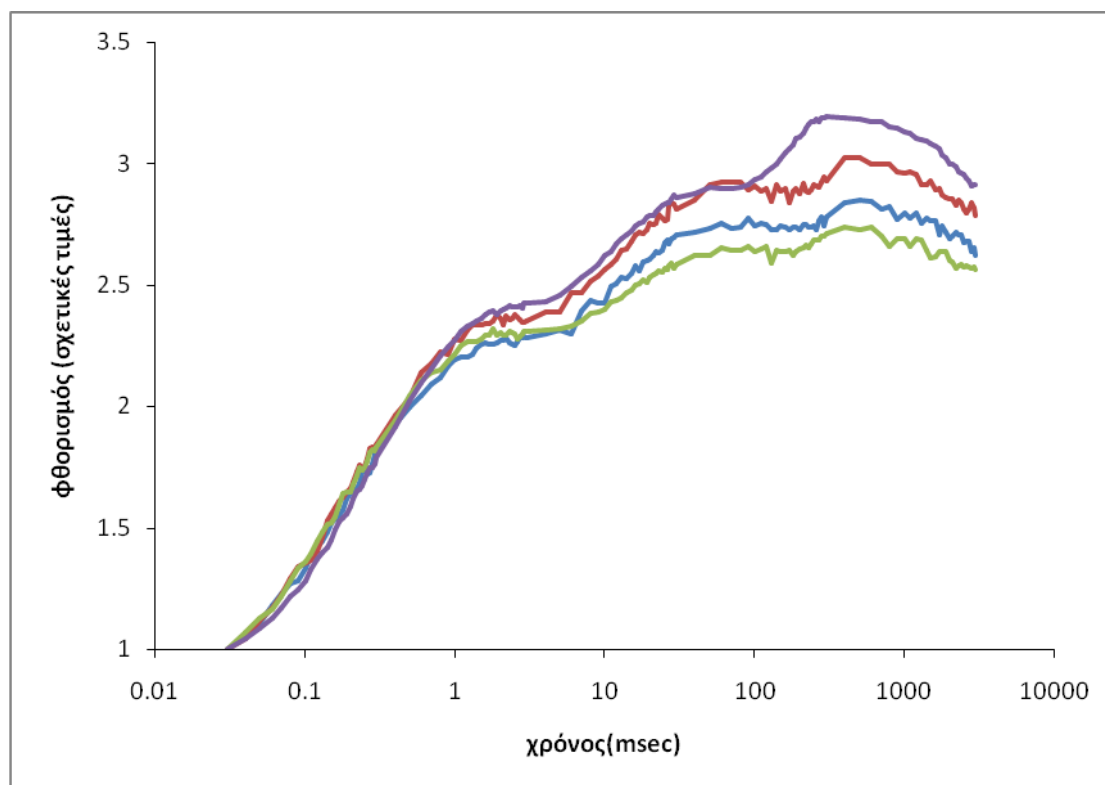
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη $FeCl_3$ και Na_2EDTA δεν είχε καμία επίδραση στην αύξηση των κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι οι ποσότητες σιδήρου του θρεπτικού Bishop είναι επαρκείς για την καλλιέργεια της *Chlorella minutissima*.

Η πεπτόνη δεν έδειξε να επηρεάζει την αύξηση βιομάζας, αλλά είχε έντονη επίδραση στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, όπως φαίνεται από την εικόνα 16, όπου διακρίνονται ξεκάθαρα οι διαφορές του χειρισμού αυτού από τους υπόλοιπους. Αφού τα δείγματα έχουν παραπλήσια κυτταρική συγκέντρωση μπορεί να θεωρηθεί ότι η πεπτόνη οδήγησε σε αυξημένη σύνθεση χλωροφυλλών.

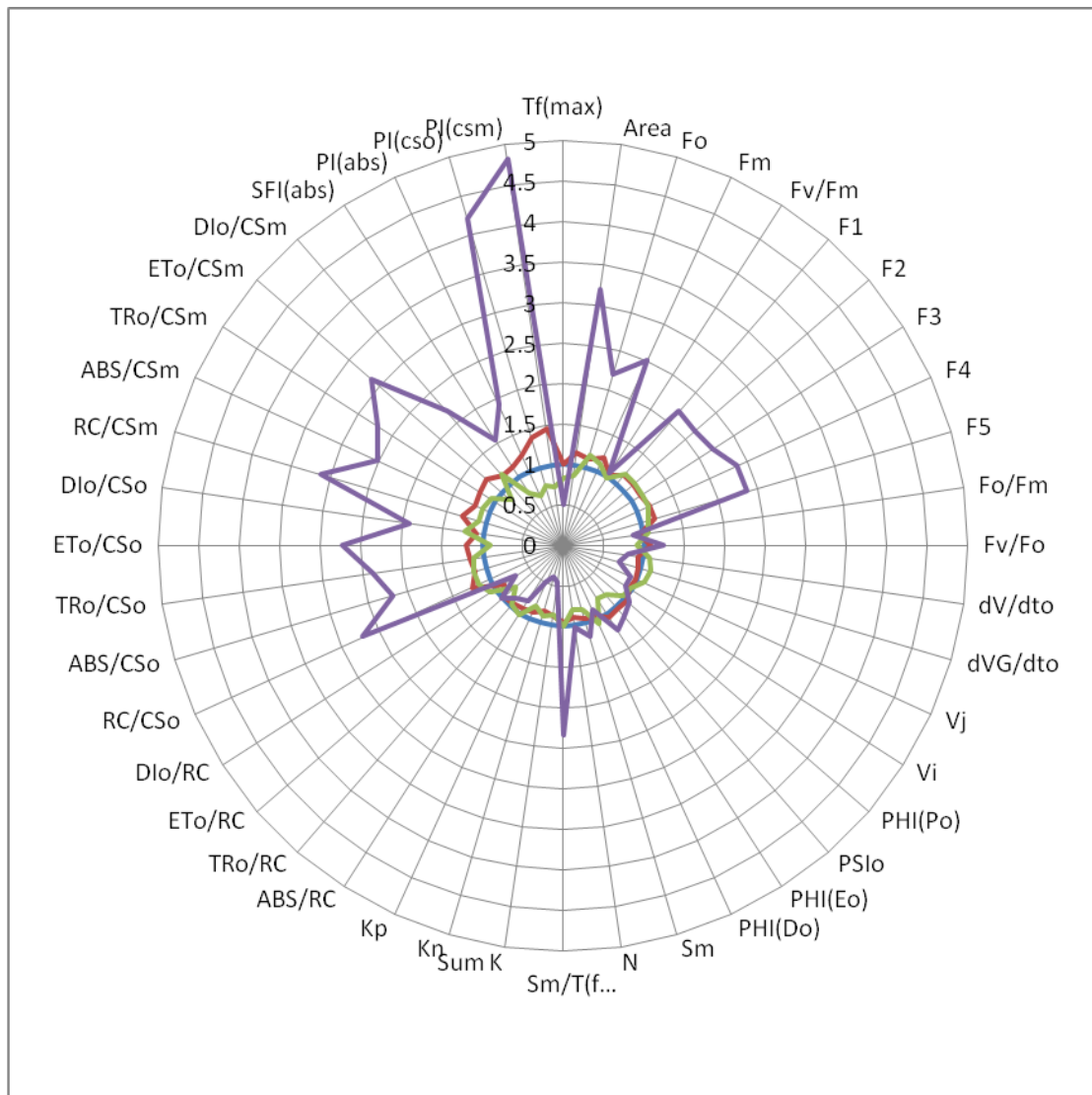
Γενικά, η εικόνα όλων των χειρισμών ως προς την φωτοσυνθετική απόδοση είναι ικανοποιητική με αρκετά υψηλές τιμές F_v/F_m (πίνακας 2) και φυσιολογικές καμπύλες επαγωγικού φθορισμού (Εικόνα 15). Οι πολύ μεγάλες αποκλίσεις που εμφανίζει ο χειρισμός προσθήκης πεπτόνης σε ορισμένες παραμέτρους του JIP-test πιθανότατα οφείλονται στην μεγάλη ποσότητα συντιθέμενων χλωροφυλλών, όπως φαίνεται και από τον λόγο RC/CS_0 (Εικόνα 16).

Πίνακας 2: Επίδραση των $FeCl_3$, Na_2EDTA και πεπτόνης στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

Χειρισμοί	Bishop	Bishop+ $FeCl_3$	Bishop+ $FeCl_3$ + Na_2EDTA	Bishop+ $FeCl_3$ + Na_2EDTA +πεπτόνη
F_v/F_m	0.675	0.698	0.658	0.716



Εικόνα 15: Καμπύλη επαγωγικού φθορισμού για χειρισμούς με θρεπτικό Bishop (μπλε), Bishop με προσθήκη $FeCl_3$ (κόκκινο), Bishop με προσθήκη $FeCl_3$ και Na_2EDTA (πράσινο), Bishop με προσθήκη $FeCl_3$, Na_2EDTA και πεπτόνης (μωβ) την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

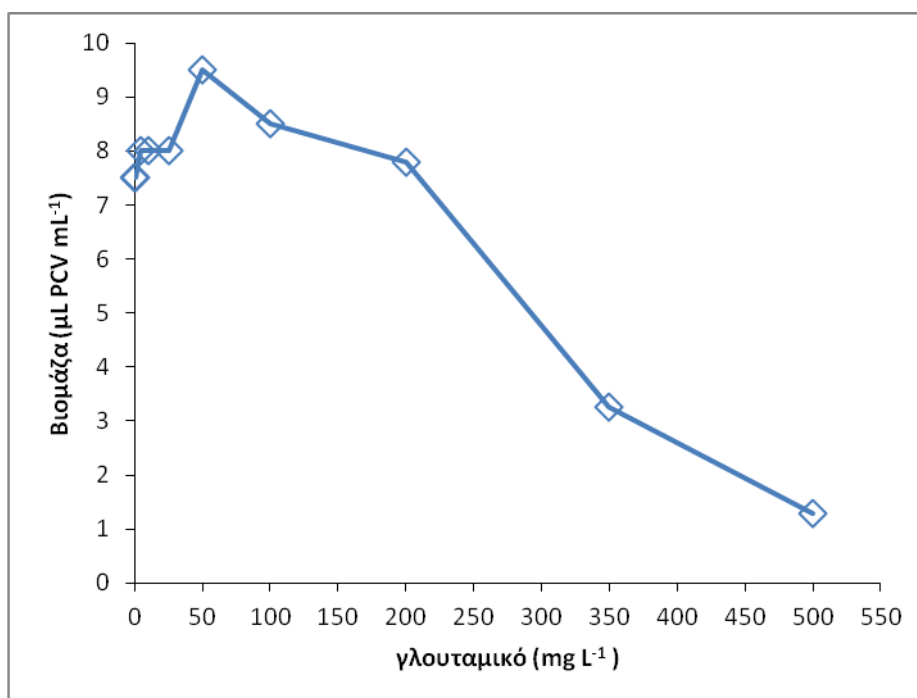


Εικόνα 16: Οι παράμετροι του JIP-test την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας για τους χειρισμούς με θρεπτικό Bishop (μπλε), Bishop με προσθήκη FeCl_3 (κόκκινο), Bishop με προσθήκη FeCl_3 και Na_2EDTA (πράσινο), Bishop με προσθήκη FeCl_3 , Na_2EDTA και πεπτόνης (μωβ).

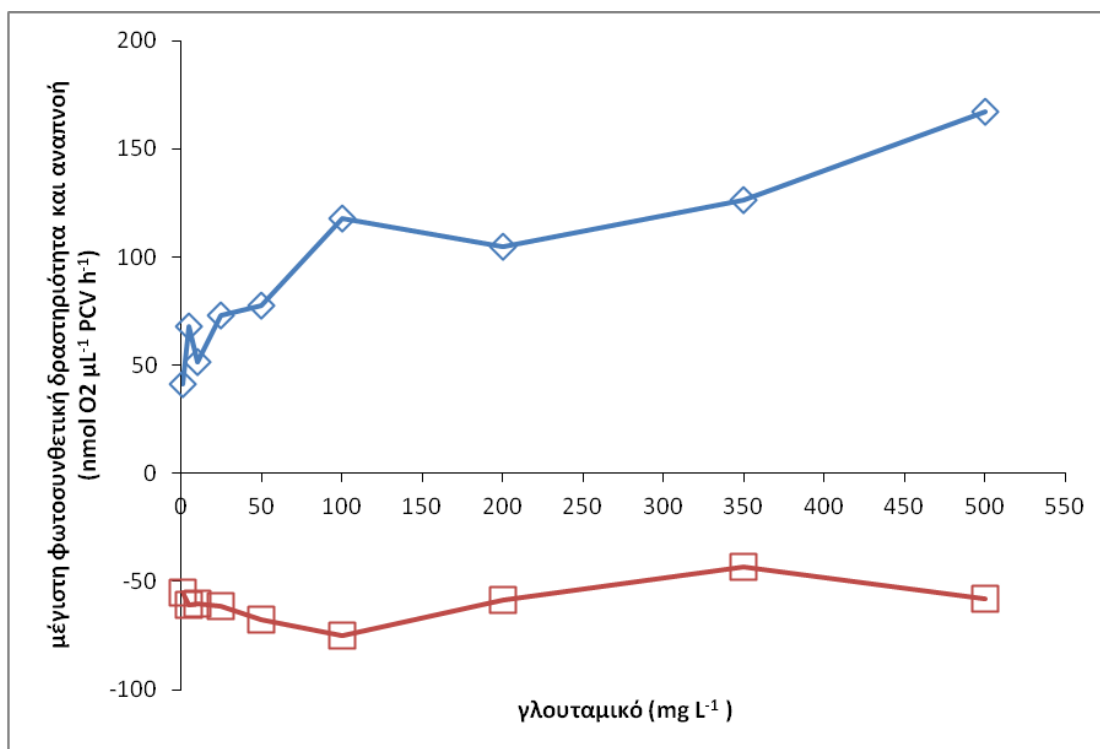
3.2.3. Αναζήτηση του συστατικού της πεπτόνης που ευθύνεται για την αύξηση της χλωροφύλλης - Επίδραση γλουταμικού οξέος

Η πεπτόνη φάνηκε από την προηγούμενη ενότητα ότι αυξάνει την φωτοσυνθετική απόδοση μέσω της αύξησης της χλωροφύλλης στα κύτταρα, που οδηγεί και στην αύξηση της βιομάζας. Το μείγμα πεπτόνης περιέχει τα περισσότερα αμινοξέα που είναι απαραίτητα στα κύτταρα και μάλιστα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή, το γλουταμικό αποτελεί το πρώτο υπόστρωμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης, ενώ συναντάται σε μεγάλη ποσότητα (15% w/w) στην πεπτόνη. Για τους παραπάνω λόγους εξετάστηκε η επίδραση του γλουταμικού.

Η επίδρασή του γλουταμικού μελετήθηκε με χορήγηση σε διαφορετικές δόσεις ώστε να εντοπιστεί η βέλτιστη για τα κύτταρα. Οι δόσεις που δοκιμάστηκαν ήταν 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 350 και 500 mg γλουταμικού ανά λίτρο καλλιέργειας. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε αλατότητα 25‰ και περιείχαν βιταμίνες B₁₂, B₁ και B₇. Όπως είναι φανερό στην εικόνα 17, συγκεντρώσεις άνω των 200 mg L⁻¹ επιδρούν ανασταλτικά στην κυτταρική ανάπτυξη ενώ μικρές συγκεντρώσεις (50 mg/L) αυξάνουν την βιομάζα της καλλιέργειας σημαντικά (περίπου 25%). Αντίθετα, όσο η ποσότητα του γλουταμικού αυξάνει (ως τα 500 mg/L) η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου γίνεται μεγαλύτερη, όπως φαίνεται στην εικόνα 18.



Εικόνα 17: Η επίδραση της συγκέντρωσης του γλουταμικού στην ανάπτυξη της *Chlorella minutissima* την τρίτη ημέρα της επώασης.

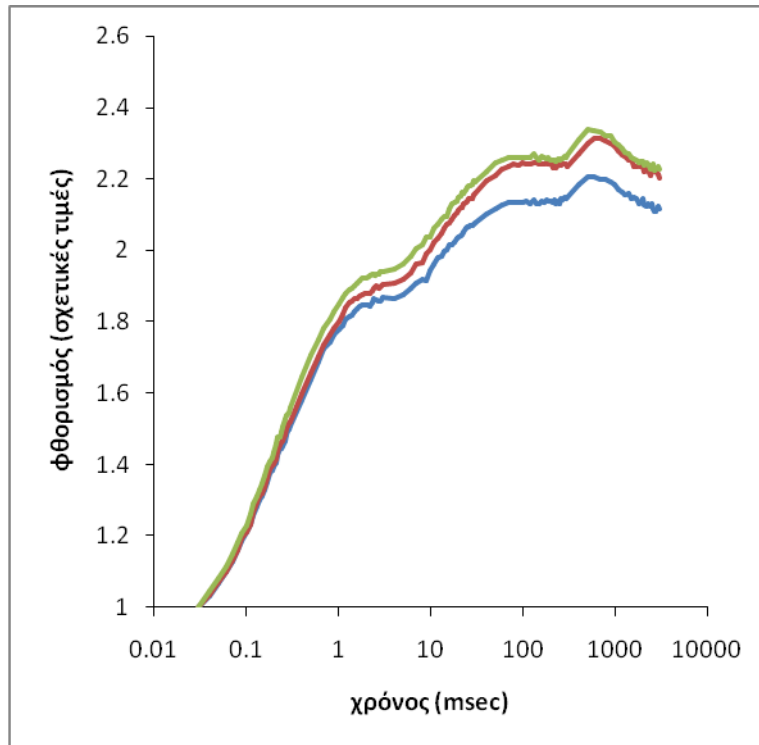


Εικόνα 18: Η επίδραση της συγκέντρωσης του γλουταμικού στην κατανάλωση (αναπνοή, κόκκινο) και έκλυση οξυγόνου (καθαρή φωτοσύνθεση, μπλε) την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.

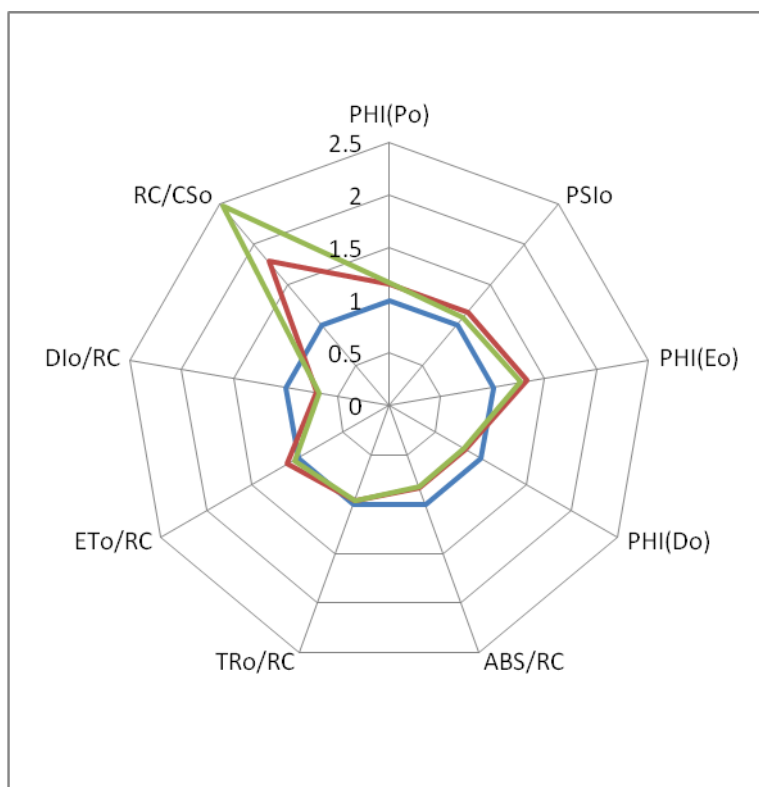
Οι πολωρογραφικές μετρήσεις βρίσκονται σε συμφωνία με τις ενδείξεις από τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού όπου φαίνεται ότι όσο περισσότερο γλουταμικό παρέχεται στα κύτταρα, τόσο αυξάνει η φωτοσυνθετική τους απόδοση (πίνακας 3). Από τις εικόνες 19 και 20 διακρίνεται η επίδραση του γλουταμικού στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό με τους δείκτες κβαντικής απόδοσης $\Phi(P_0)$, $\Phi(E_0)$, Ψ_0 , τον αριθμό ενεργών κέντρων RC/CS_0 αλλά και τις ενεργότητες TR_0/RC , ET/RC να είναι υψηλότερες στους χειρισμούς γλουταμικού και τις απώλειες ενέργειας [ως $\Phi(D_0)$ και DI_0/RC] να εμφανίζονται μειωμένες. Ενδιαφέρον προκαλεί η επίδραση των συγκρινόμενων ποσοτήτων γλουταμικού (50 και 100 mg L⁻¹) που δείχνει πανομοιότυπη διαφοροποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε σχέση με την καλλιέργεια μάρτυρα (μείωση της λειτουργικής κεραίας, μείωση της μη φωτοχημικής διάχυσης της ενέργειας), εκτός από τον λόγο RC/CS_0 , όπου φαίνεται ότι διπλασιασμός του γλουταμικού οδηγεί σε μεγαλύτερες ποσότητες χλωροφύλλης και κατ'επέκταση στην ύπαρξη περισσότερων ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης (Εικ. 20).

Πίνακας 3: Επίδραση του γλουταμικού στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την τρίτη ημέρα καλλιέργειας.

Γλουταμικό (mg/L)	0	1	5	10	25	50	100
Fv/Fm	0.567	0.589	0.589	0.609	0.620	0.644	0.657



Εικόνα 19: Καμπύλη επαγωγικού φθορισμού για τους χειρισμούς 0 (μπλε), 50 (κόκκινο) και 100 mg (πράσινο) γλουταμικού ανά λίτρο καλλιέργειας την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.

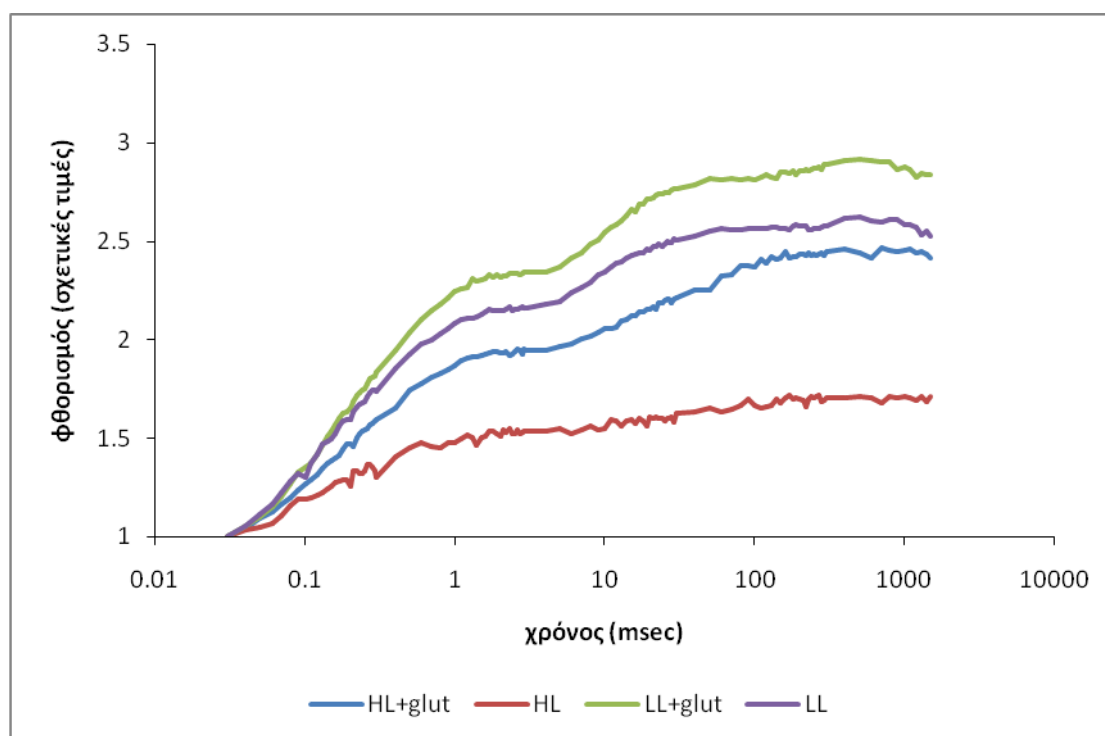


Εικόνα 20: Επιλεγμένοι παράμετροι του JIP-test για τους χειρισμούς 0 (μπλε), 50 (κόκκινο) και 100 mg (πράσινο) γλουταμικού ανά λίτρο καλλιέργειας την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.

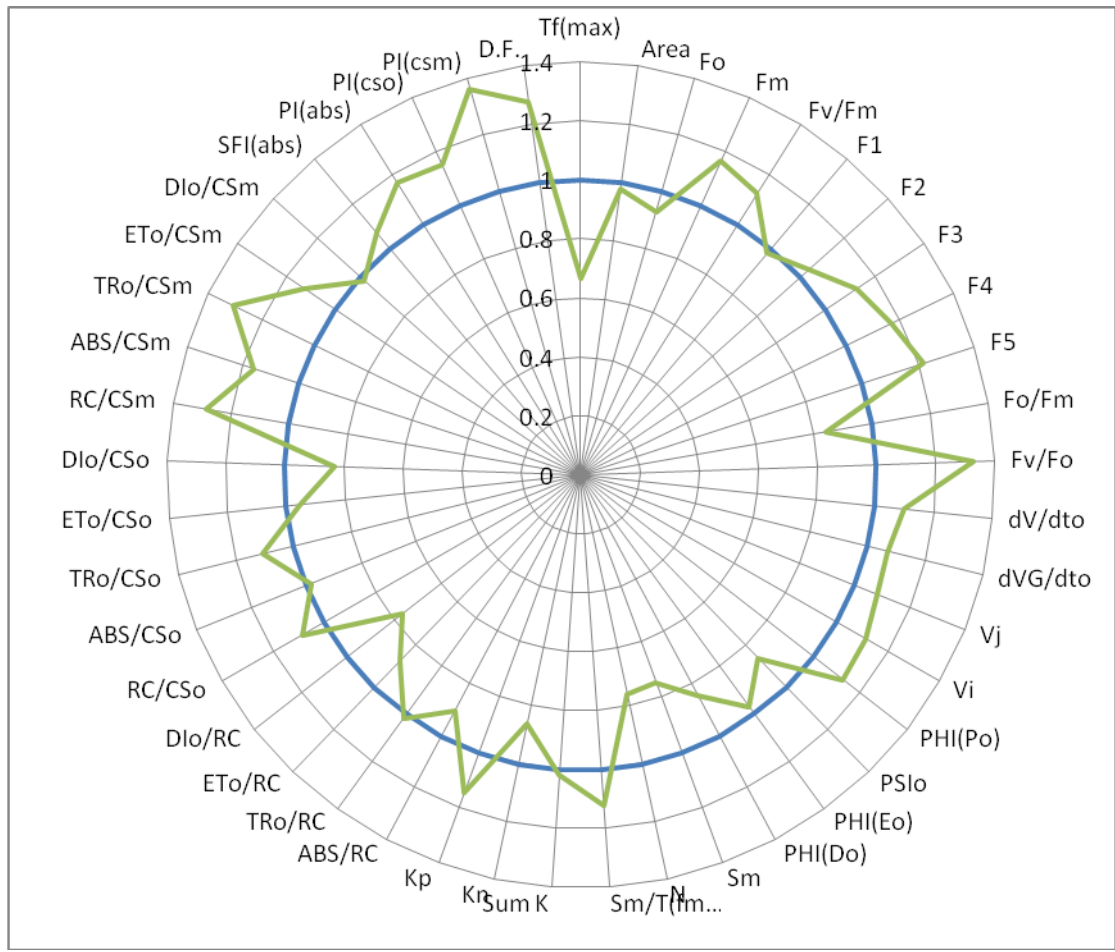
3.2.3.1. Συσχέτιση επίδρασης γλουταμικού με ένταση ακτινοβολίας

Επιπλέον ελέγχθηκε η συσχέτιση παρουσίας γλουταμικού (100mg L^{-1}) με την ένταση του φωτός, συγκεκριμένα σε υψηλή (HL: $170\mu\text{E}$) και χαμηλή (LL: $7\mu\text{E}$) ένταση φωτός. Τα πειράματα έδειξαν ότι το γλουταμικό σε συνθήκες LL δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ σε HL συμβάλλει σε αύξηση της τάξης του $\sim 10\%$.

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού δείχνουν ότι τα κύτταρα φωτοσυνθέτουν καλύτερα παρουσία γλουταμικού τόσο σε έντονο, όσο και σε χαμηλό φως, αφού συνθέτουν περισσότερη χλωροφύλλη (κύτταρα πράσινου χρώματος). Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η διαφορά αυτή εμφανίζεται πολύ μικρότερη στο χαμηλό φως, όπου τα κύτταρα δείχνουν γενικότερα να αποδίδουν καλύτερα (Εικόνα 21). Όπως φαίνεται στη εικόνα 22 ο χειρισμός LL με γλουταμικό εμφανίζει περισσότερα κέντρα αντίδρασης ανά περιοχή και για τον λόγο αυτό εκμεταλλεύεται καλύτερα την απορροφώμενη ενέργεια [PHI(P_0), PI(abs), PI (C_{s0}), PI(C_{sm})] συγκριτικά με τον HL χειρισμό.



Εικόνα 21: Καμπύλη επαγωγικού φθορισμού για τους χειρισμούς σε έντονο φως HL ($170\mu\text{E}$) και χαμηλό φως LL ($7\mu\text{E}$) παρουσία (100mg/L) και απουσία γλουταμικού οξέος την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.

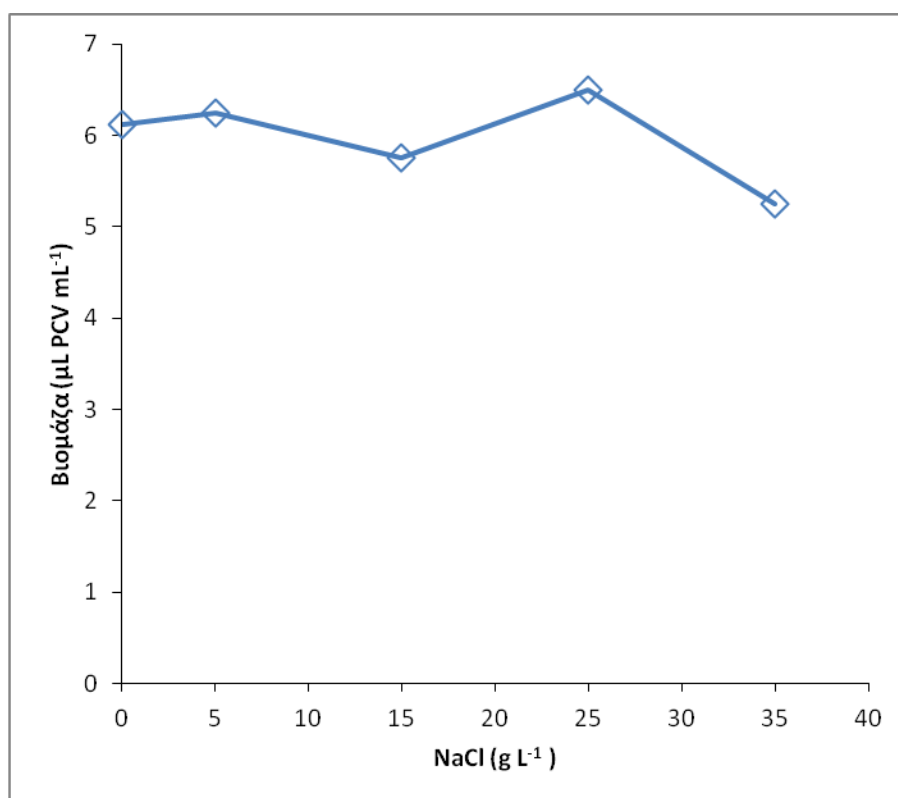


Εικόνα 22: Παράμετροι του JIP-test για τους χειρισμούς με γλουταμικό οξύ 100mg/L σε έντονο φως HL-170μE (μπλε) και χαμηλό φως LL 7μE (πράσινο) την τρίτη ημέρα καλλιέργειας.

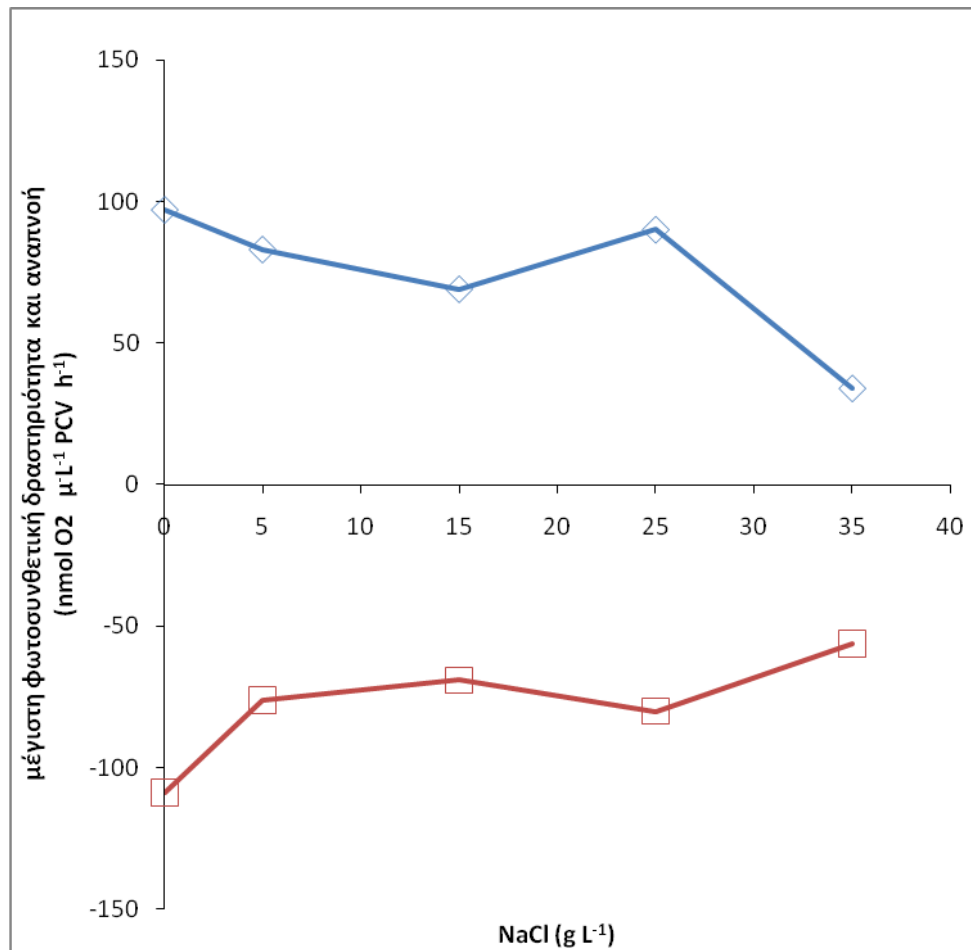
3.2.4. Επίδραση αλατότητας

Σύμφωνα με τους Alyabyen et al. (2007) η καταπόνηση αυξημένης αλατότητας μπορεί να έχει γενικευμένες επιδράσεις στα κύτταρα των μικροφυκών: αυξημένο ρυθμό καταβολισμού βιοπολυμερών και λιπιδίων, αλλαγή στον ρυθμό των διεργασιών που παράγουν ενέργεια και διατάραξη της ιοντικής ομοιόστασης και της διαπερατότητας μεμβρανών. Για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων λοιπόν είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός των ορίων ανοχής στην αλατότητα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη με εύρος χειρισμών αλατότητας (g NaCl L^{-1} καλλιέργειας): 0.025, 5, 15, 25, 35. Το θρεπτικό μέσο περιείχε μείγμα βιταμινών B₁₂, B₁ και B₇ και 100mg L^{-1} γλουταμικό.

Με το παρόν πείραμα παρουσιάζεται η ευρύαλη φύση του υπό μελέτη χλωροφύκου, αφού εμφανίζεται ανθεκτικό σε ένα εντυπωσιακό εύρος (κατά τρεις τάξεις μεγέθους) αν και σε αλατότητες άνω των 25‰ η ανάπτυξη (Εικόνα 23) και φωτοσύνθεση (Εικόνα 24) αναστέλλονται σημαντικά.



Εικόνα 23: Η επίδραση της αλατότητας στα επίπεδα βιομάζας την δεύτερη ημέρα της καλλιέργειας.

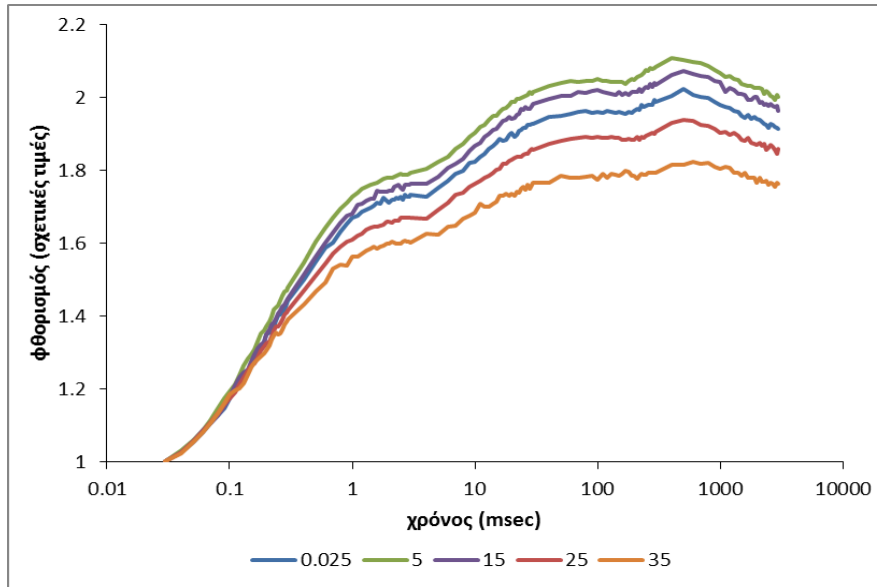


Εικόνα 24: Η επίδραση της αλατότητας στην κατανάλωση (αναπνοή, κόκκινο) και έκλυση οξυγόνου (καθαρή φωτοσύνθεση, μπλε) την τέταρτη ημέρα της καλλιέργειας.

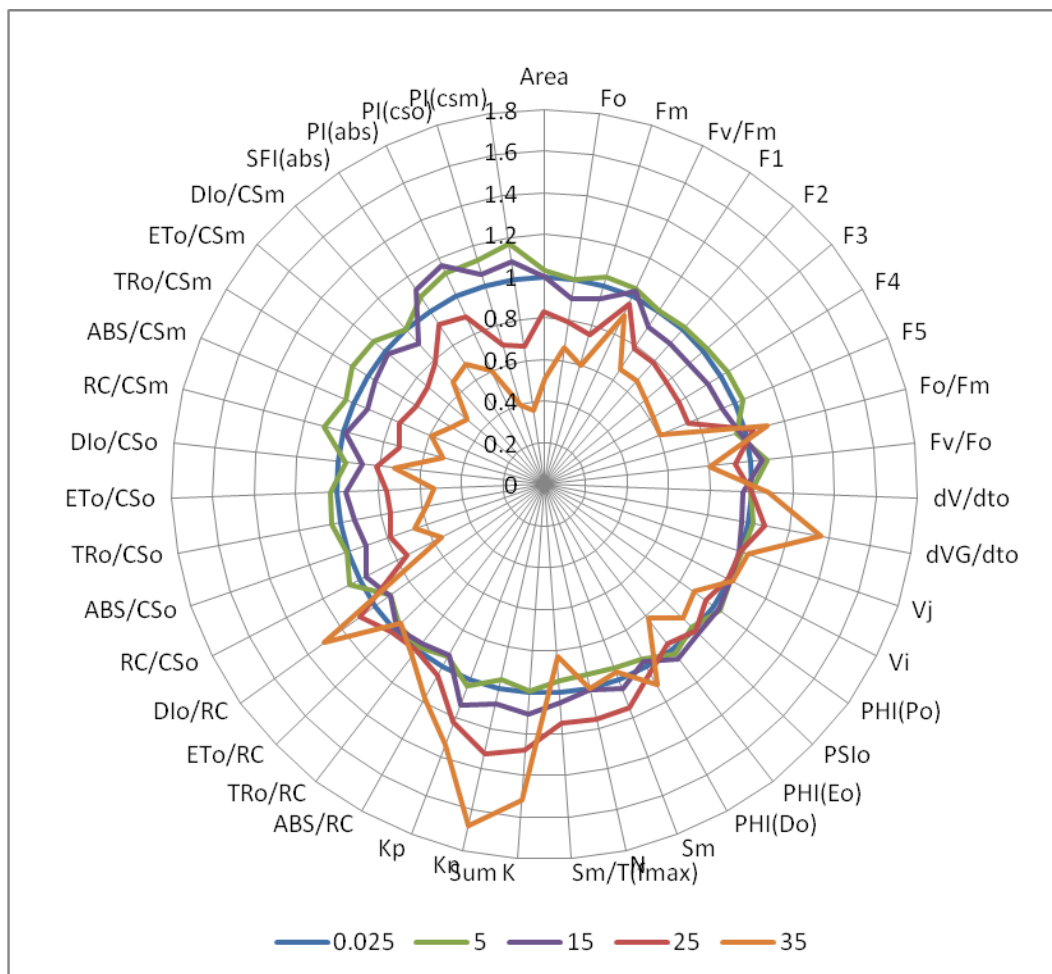
Τα δεδομένα του επαγωγικού φθορισμού δείχνουν μια βελτίωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης καθώς η αλατότητα αυξάνεται έως 15%, ενώ σε υψηλότερες αλατότητες ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δείχνει να λειτουργεί λιγότερο αποδοτικά. Αυτό φαίνεται αρχικά από την καμπύλη επαγωγικού φθορισμού (Εικ.25) αλλά και από παραμέτρους του JIP-test όπως το F_v/F_m (πίνακας 4), οι δείκτες κβαντικής απόδοσης [$\Phi(P_0)$, $\Phi(E_0)$, Ψ_0], οι ενεργότητες ανά κέντρο αντίδρασης [ABS/RC , TR_0/RC , ET/RC], τα ενεργά κέντρα αντίδρασης (RC/CS_0) και οι ευαίσθητοι δείκτες απόδοσης [$PI(abs)$, $PI(CS_0)$ και $PI(CS_m)$].

Πίνακας 4: Επίδραση της αλατότητας στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

NaCl (g/L)	0.025	5	15	25	35
Fv/Fm	0.525	0.547	0.540	0.504	0.470



Εικόνα 25: Καμπύλη φθορισμού για εύρος αλατότητας ($0.025 - 35 \text{ gr NaCl L}^{-1}$) την δεύτερη ημέρα της καλλιέργειας.

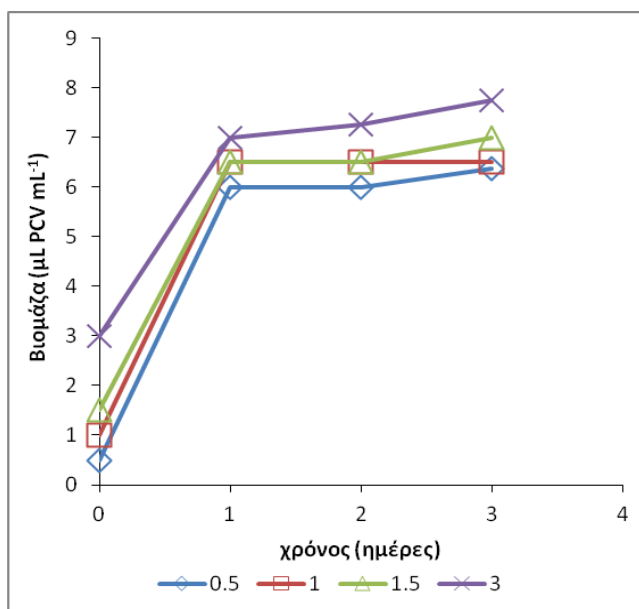


Εικόνα 26: Παράμετροι του JIP-test για εύρος αλατότητας ($0.025 - 35 \text{ gr NaCl L}^{-1}$) την δεύτερη ημέρα της καλλιέργειας.

3.2.5. Συμβολή αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων στην αύξηση της καλλιέργειας

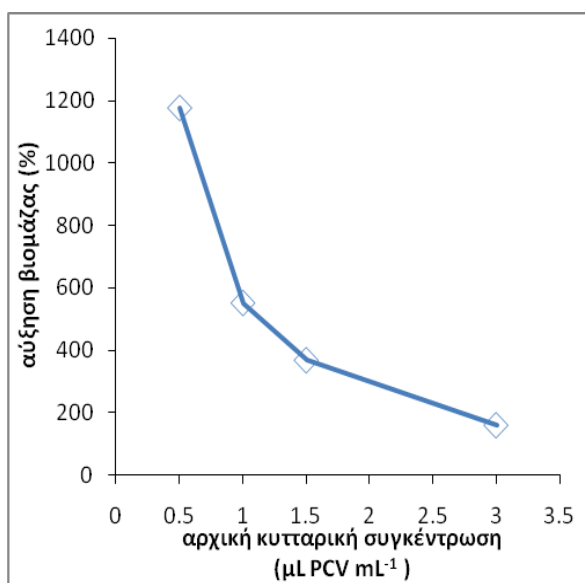
Έχει παρατηρηθεί ότι σε υγρές κυτταροκαλλιέργειες συχνά υπάρχει ένα κατώφλι ελάχιστης κυτταρικής πυκνότητας ώστε να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Για να ελέγξουμε το αν η αρχική κυτταρική συγκέντρωση εμβολίου (inoculum) που χρησιμοποιούμε ($0.5 \mu\text{L PCV mL}^{-1}$) είναι η βέλτιστη, πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα, όπου κάθε καλλιέργεια ξεκινάει με διαφορετική αρχική κυτταρική συγκέντρωση. Το θρεπτικό μέσο περιείχε μείγμα βιταμινών B_{12} , B_1 και B_7 και 100 mg L^{-1} γλουταμικό.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 28 η επί τοις εκατό αύξηση των κυττάρων ως την τρίτη ημέρα μειώνεται αισθητά όσο η αρχική κυτταρική συγκέντρωση εμβολίου αυξάνεται. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στα περιορισμένα διαθέσιμα θρεπτικά αλλά και στο φως που αναλογεί ανά κύτταρο.



Εικόνα 27: Επίπεδα βιομάζας σε διάστημα 3 ημερών για χειρισμούς αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης PCV 0.5, 1, 1.5 και 3 $\mu\text{L/mL}$.

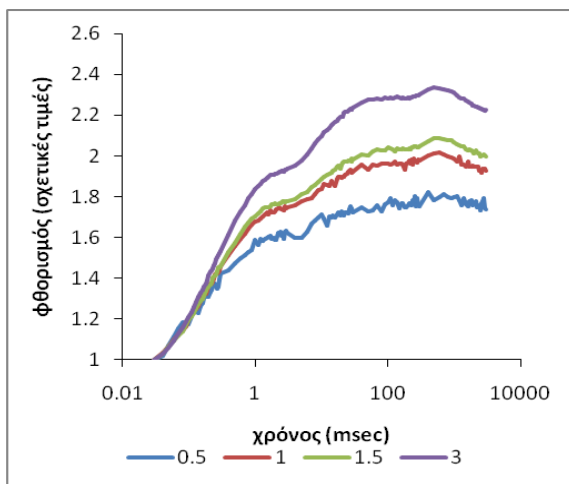
Εικόνα 28: Επίδραση της αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης του εμβολίου στην επί τοις εκατό αύξηση βιομάζας την τρίτη ημέρα της επώασης.



Από την καμπύλη επαγωγικού φθορισμού (Εικ.29) αλλά και την τιμή Fv/Fm (πίνακας 5) φαίνεται η αύξηση της αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης να επιδρά θετικά στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα σχετίζεται περισσότερο με τον αλληλοσκιασμό των κυττάρων όσο αυξάνει η πυκνότητα της καλλιέργειας που μειώνει την διαθέσιμη ακτινοβολία ανά κύτταρο, παρά με κάποια θεμελιώδη διαφοροποίηση του μηχανισμού. Αυτό πιθανότατα οδηγεί τα κύτταρα των πυκνότερων καλλιεργειών σε αυξημένη σύνθεση χλωροφυλλών και έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη αξιοποίηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, όπως φαίνεται και στην εικόνα 30.

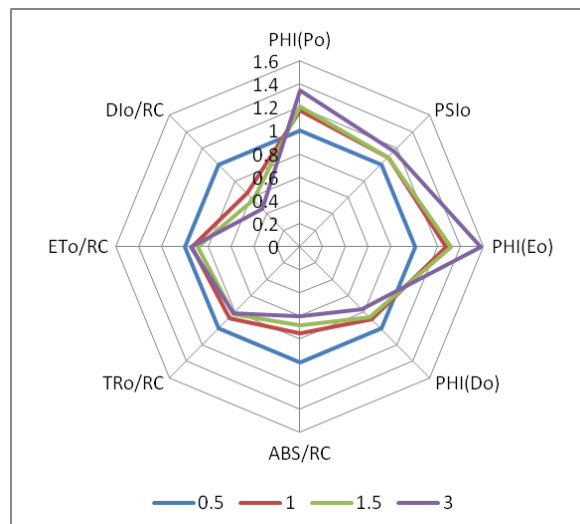
Πίνακας 5: Επίδραση της αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (ως $\mu\text{L PCV mL}^{-1}$ καλλιέργειας) στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση την τρίτη ημέρα καλλιέργειας.

PCVo	0.5	1	1.5	3
Fv/Fm	0.448	0.525	0.540	0.597



Εικόνα 29: Καμπύλη φθορισμού για δείγματα διαφορετικής αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (ως $\mu\text{L PCV mL}^{-1}$) την τρίτη ημέρα καλλιέργειας.

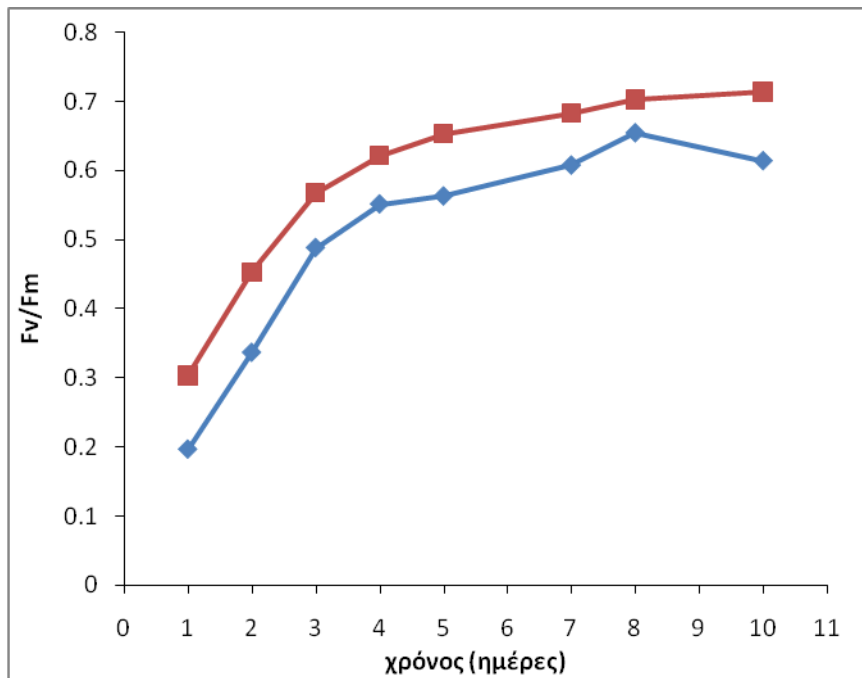
Εικόνα 30: Επιλεγμένοι παράμετροι του JIP-test για δείγματα διαφορετικής αρχικής κυτταρικής συγκέντρωσης (ως $\mu\text{L PCV mL}^{-1}$) την τρίτη ημέρα καλλιέργειας.



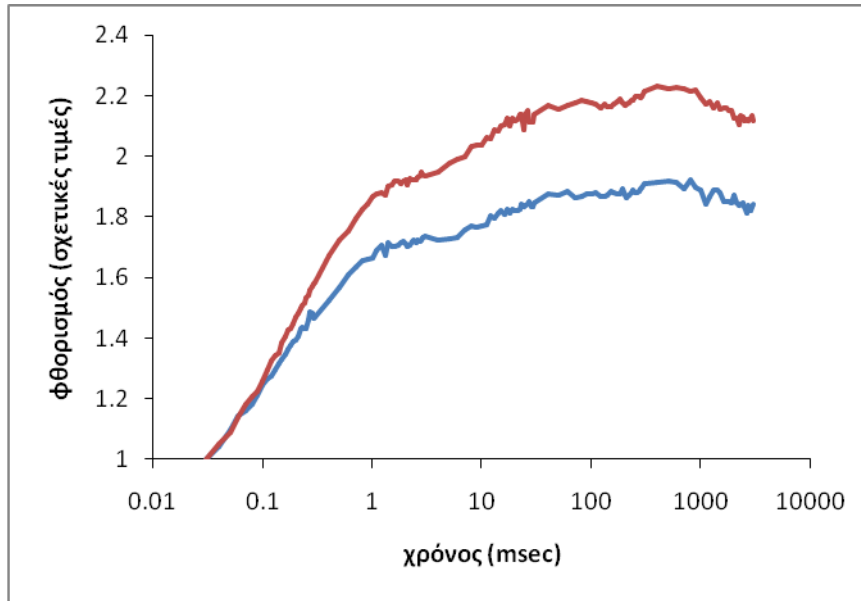
3.2.6. Επίδραση θερμοκρασίας

Σύμφωνα με τους Shugarman & Traut (1967) η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης επηρεάζεται έντονα από την θερμοκρασία, με αύξηση της θερμοκρασίας να συνεπάγεται αύξηση των παραγόμενων χλωροφυλλών. Τονίζουν όμως ότι η επίδραση αυτή ισχύει σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, ενώ εάν σε αντίστοιχα υψηλή θερμοκρασία ο φωτισμός είναι χαμηλός μπορεί ακόμα και να νεκρωθούν τα κύτταρα. Για να ελεγχθεί εάν η επιλεγμένη για τα πειράματα θερμοκρασία (30°C) ευνοεί την βιοσυνθετική διαδικασία, μελετήθηκαν παράλληλα δύο καλλιέργειες σε χαμηλή L(22°C) και υψηλή θερμοκρασία H(30°C). Το θρεπτικό μέσο περιείχε μείγμα βιταμινών B₁₂, B₁ και B₇ και 100 mg L⁻¹ γλουταμικό.

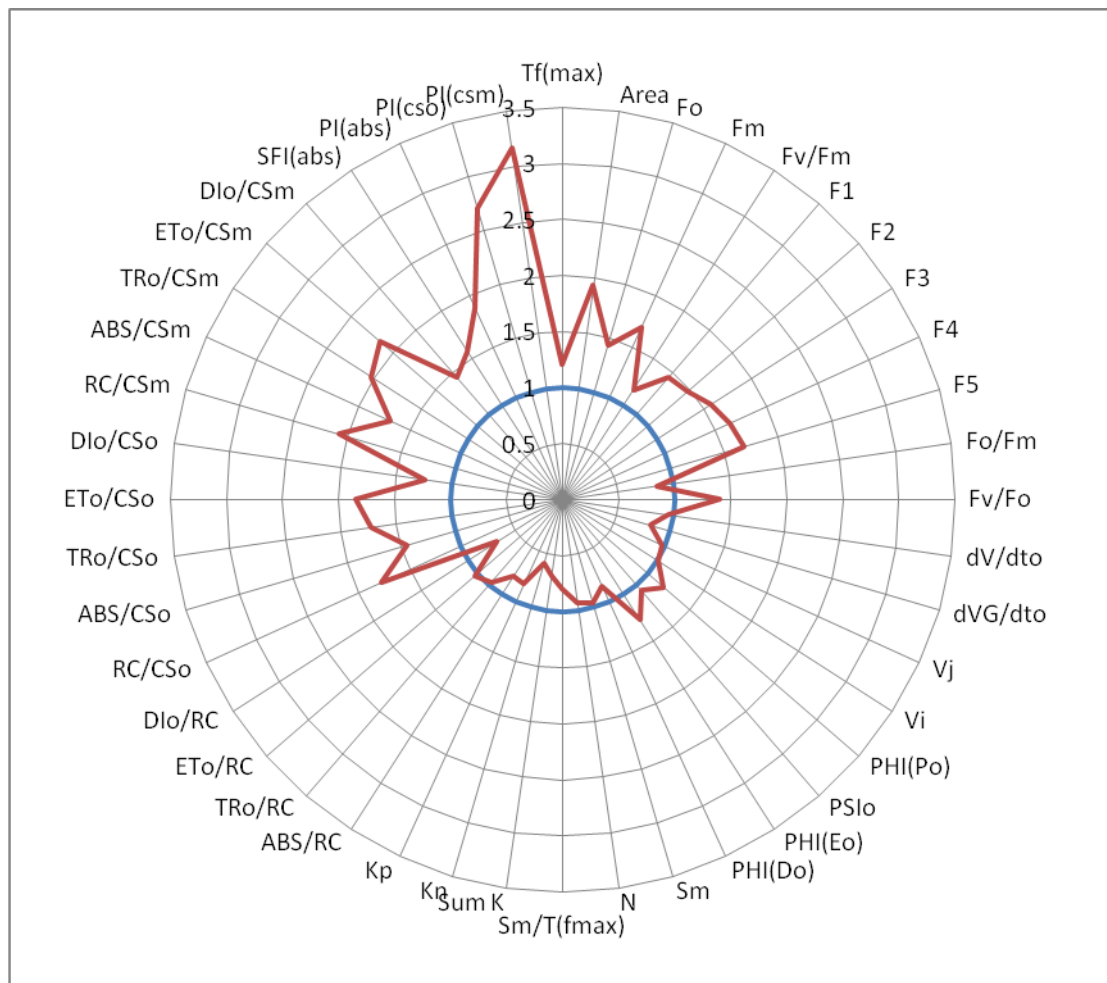
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται εξίσου καλά στους 22°C όσο και στους 30°C, αλλά φωτοσυνθέτουν αποδοτικότερα στους 30°C όπως φαίνεται από την καμπύλη επαγωγικού φθορισμού (Εικ.32) και το JIP-test (Εικόνα 33). Αυτό είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα των Shugarman & Traut (1967).



Εικόνα 31: Φωτοσυνθετική απόδοση (ως Fv/Fm) για χειρισμούς χαμηλής 22°C (μπλε) και υψηλής θερμοκρασίας 30°C (κόκκινο) σε διάστημα 10 ημερών.



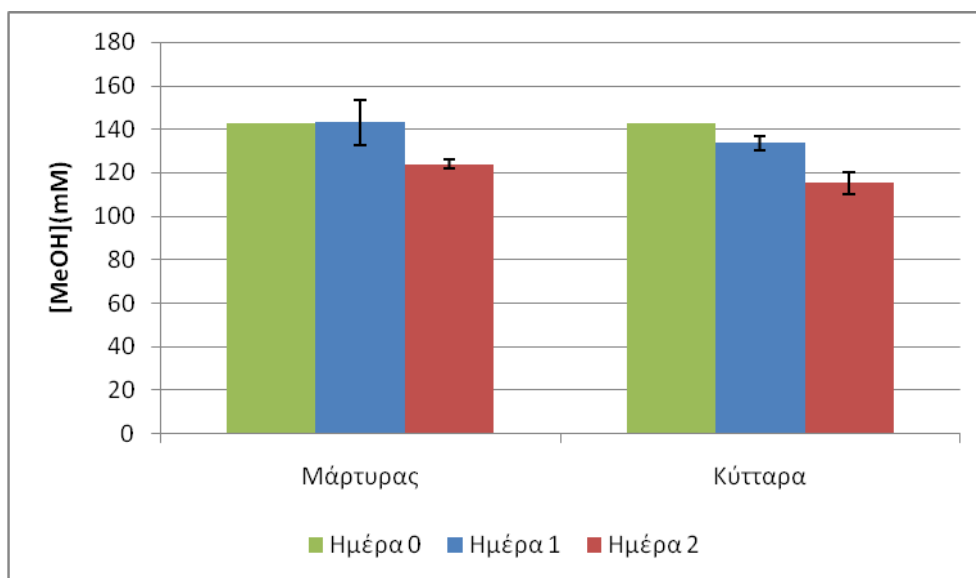
Εικόνα 32: Καμπύλη φθορισμού για χειρισμούς χαμηλής 22°C (μπλε) και υψηλής θερμοκρασίας 30°C (κόκκινο) την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.



Εικόνα 33: Παράμετροι του JIP-test για χειρισμούς χαμηλής 22°C (μπλε) και υψηλής θερμοκρασίας 30°C (κόκκινο) την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.

3.3.Χρήση μεθανόλης για μια εναλλακτική αξενική μικτότροφη ανάπτυξη του χλωροφύκου *Chlorella minutissima*

Επειδή η άμεση ποσοτικοποίηση της μεθανόλης που μεταβολίζει το κύτταρο είναι δύσκολη και προϋποθέτει χρήση ραδιενεργά σημασμένων μορίων ή ακριβών αναλωσίμων, προτιμήθηκε ο έμμεσος προσδιορισμός της. Οι δύο κύριοι λόγοι μείωσης της μεθανόλης από το θρεπτικό μέσον είναι η εξάτμιση και η κατανάλωση από τα κύτταρα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη για τον προσδιορισμό της απώλειας μεθανόλης από τις καλλιέργειες υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (θερμοκρασίας, ακτινοβολίας, αερισμού). Επίσης, πραγματοποιήθηκε πείραμα με χορήγηση 0.5% (v/v) MeOH σε καλλιέργεια μάρτυρα (μόνο θρεπτικό) και σε καλλιέργεια με κύτταρα. Στην εικόνα 34 φαίνονται οι ποσότητες μεθανόλης που προσδιορίστηκαν στις καλλιέργειες, ενώ στην εικόνα φαίνεται το ποσοστό της μεθανόλης που καταναλώθηκε από τα κύτταρα συγκριτικά με την συγκέντρωση στην καλλιέργεια μάρτυρα. Υπολογίστηκε ότι κάθε μέρα η απώλεια μεθανόλης λόγω κατανάλωσης από τα κύτταρα αγγίζει το 7%.

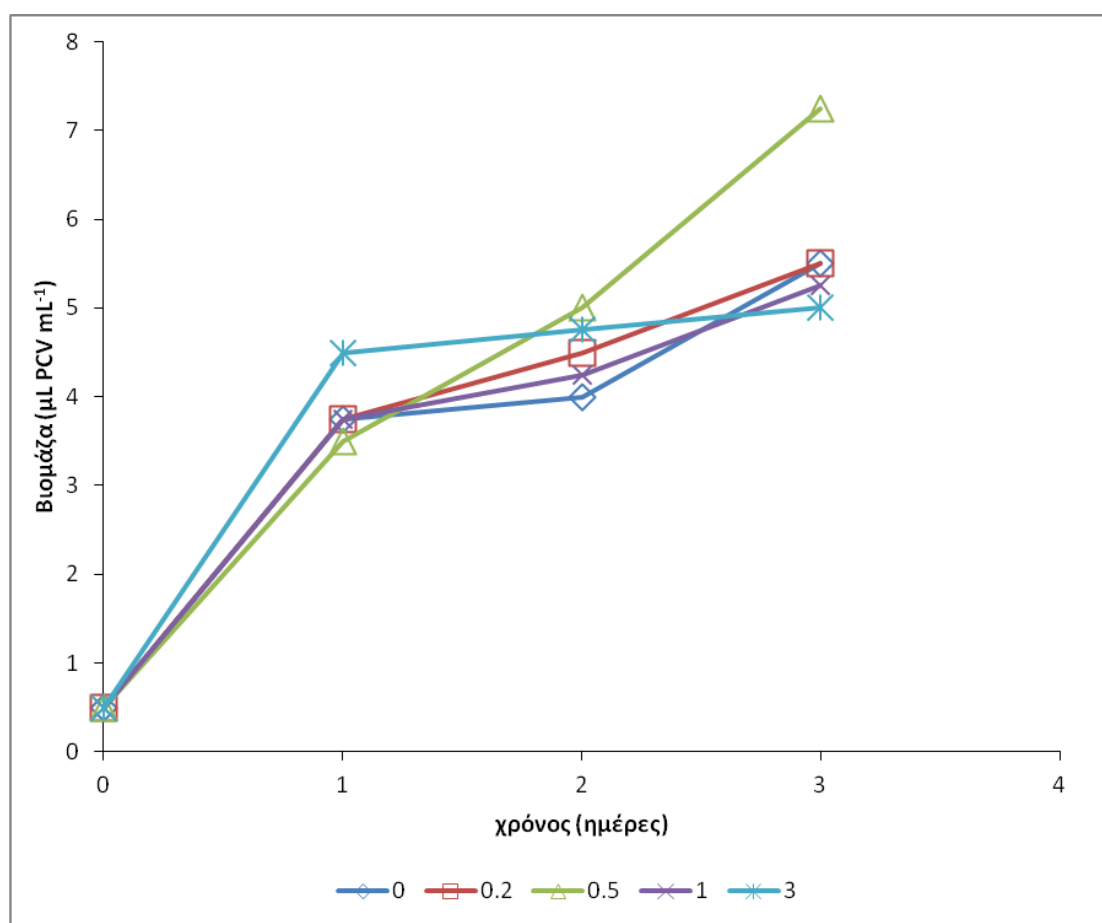


Εικόνα 34: Συγκέντρωση μεθανόλης σε καλλιέργειες με και χωρίς κύτταρα για επώαση διάρκειας δύο ημερών. Την ημέρα 0 πραγματοποιήθηκε χορήγηση 0.5% (v/v) μεθανόλης και στους δύο χειρισμούς.

3.3.1. Επίδραση μεθανόλης σε αυτότροφο θρεπτικό Bishop

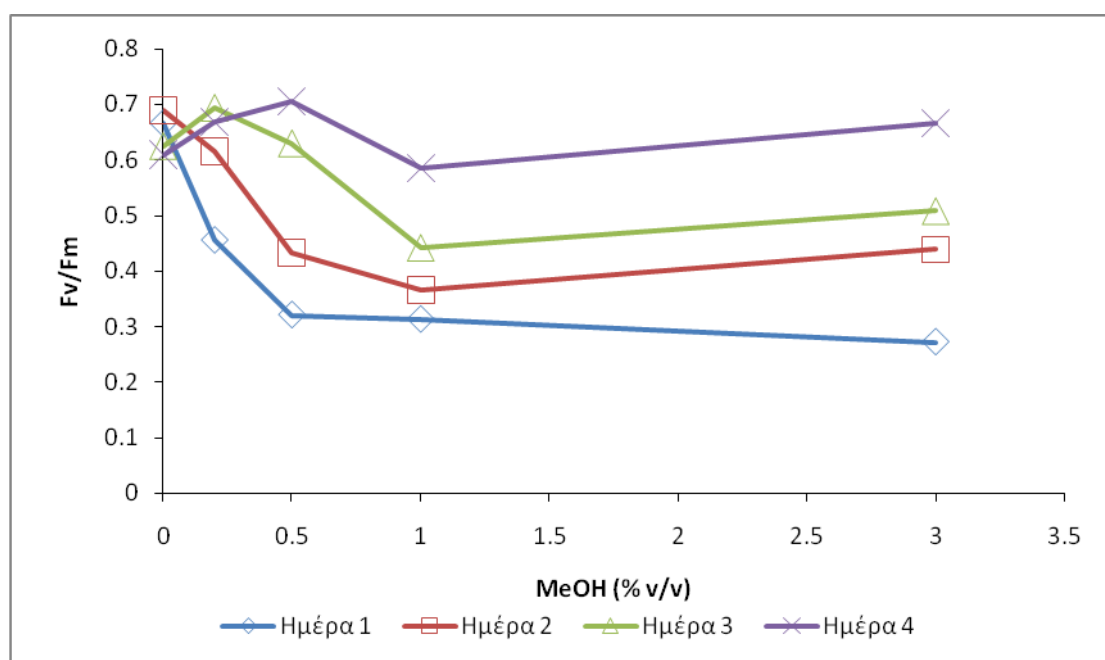
Το πρώτο dose course μεθανόλης που πραγματοποιήθηκε έγινε σε θρεπτικό Bishop χωρίς βιταμίνες (B_1, B_{12}, B_7) και γλουταμικό για να μην υπάρχει καθόλου οργανική ύλη. Τα κύτταρα προήλθαν από μητρική καλλιέργεια πέντε ημερών ώστε να έχει εξασφαλιστεί η εξάντληση αποθεμάτων σακχάρων και αμύλου. Οι ποσότητες μεθανόλης που χορηγήθηκαν ήταν 0.2, 0.5, 1 και 3% (v/v) και η χορήγηση έγινε σε μια δόση κατά τον εμβολιασμό (ημέρα 0).

Η επίδραση της μεθανόλης στην επαύξηση της βιομάζας φάνηκε ουσιαστικά μόνο στον χειρισμό με 0.5%. Η εν λόγω συγκέντρωση της μεθανόλης επάγει μέσα σε τρεις μέρες την αύξηση της βιομάζας κατά 30% παραπάνω συγκριτικά με τον μάρτυρα (Εικ.35). Αυτό συμφωνεί με δεδομένα από αντίστοιχα πειράματα με το συγγενικό χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* (Theodoridou et al., 2002), αν και η επαγωγή αύξησης βιομάζας στον *Scenedesmus* ήταν πολύ υψηλότερη.



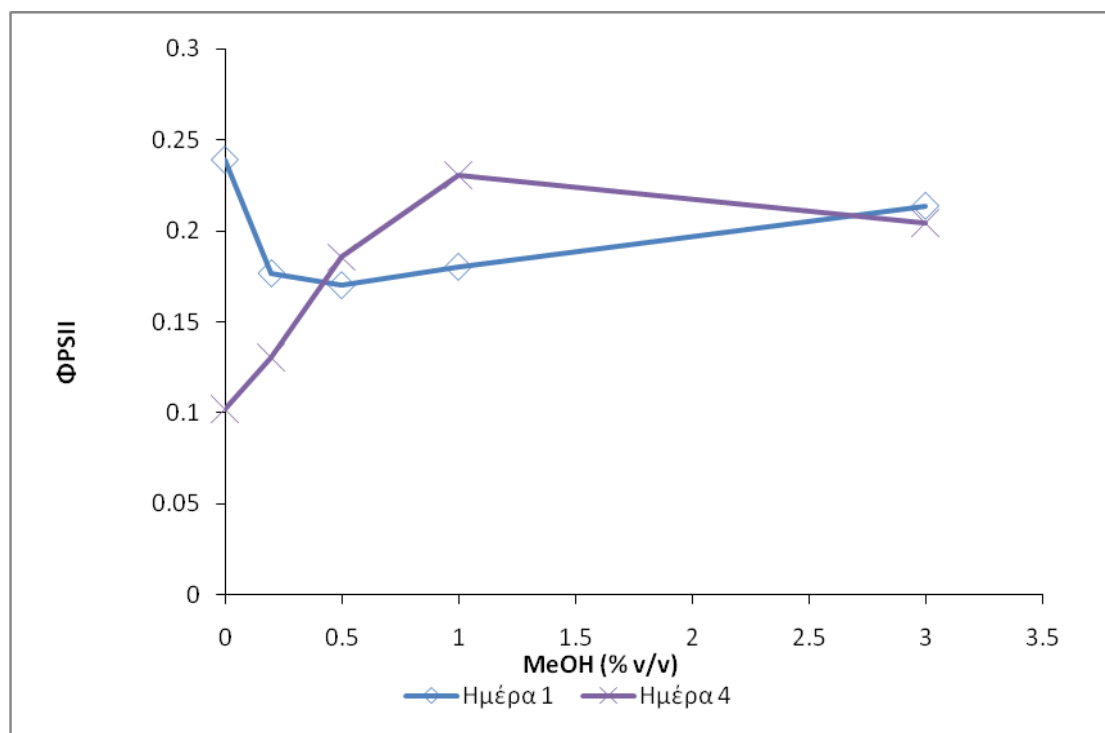
Εικόνα 35: Επίπεδα βιομάζας σε διάστημα τριών ημερών υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθανόλης (% v/v) για διάστημα τριών ημερών, απουσία βιταμινών και γλουταμικού οξέως.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι Theodoridou et al. (2002) δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στην φωτοσυνθετική απόδοση του *S. obliquus* με τη χορήγηση μεθανόλης (μετά από 20 και 40 ώρες επώασης). Αντίθετα, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός της *C. minutissima* φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητος στην τοξική επίδραση της μεθανόλης παρόλο που οι δόσεις είναι ίδιες και η κυτταρική πυκνότητα συγκρίσιμη. Τις δύο πρώτες μέρες της επώασης η μεθανόλη σε όλες τις δόσεις που δοκιμάστηκαν δείχνει να καταπονεί τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό (μείωση παράγοντα Fv/Fm). Την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας που οι ποσότητες διαθέσιμης μεθανόλης έχουν μειωθεί κυρίως λόγω εξάτμισης (βλ. εικόνα 34), η χαμηλότερη δόση (0.2% v/v) αρχίζει να επιδρά θετικά στην φωτοσυνθετική απόδοση, ενώ την τέταρτη ημέρα ο χειρισμός με 0.5% v/v μεθανόλη παρουσιάζει την υψηλότερη απόδοση (Εικ.36).



Εικόνα 36: Φωτοσυνθετική απόδοση (ως Fv/Fm) υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθανόλης για διάστημα τεσσάρων ημερών.

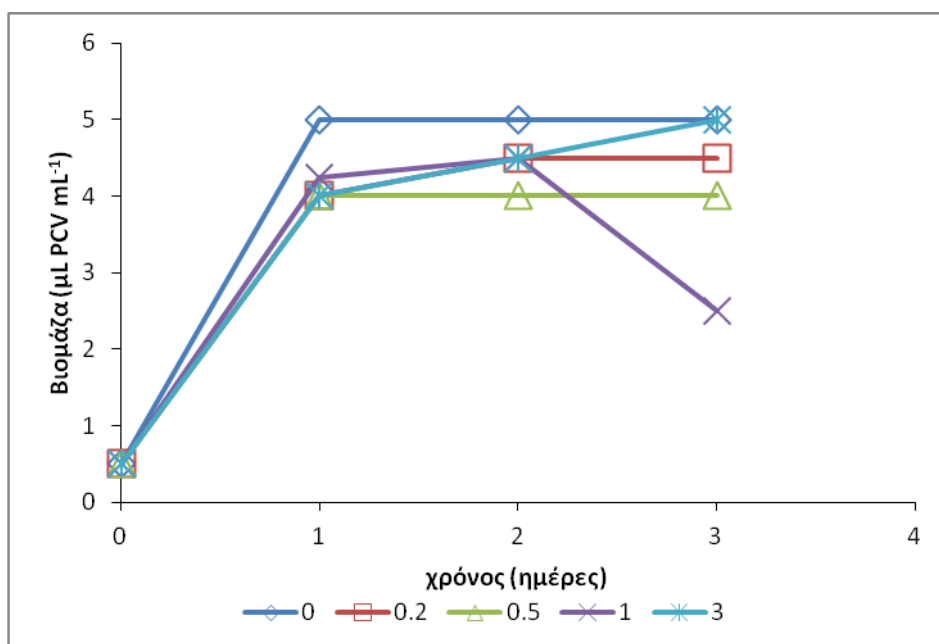
Με βάση τα αποτελέσματα από τον παράγοντα F_v'/F_m' (ΦPSII) η μεθανόλη παρεμποδίζει την γραμμική ροή ηλεκτρονίων και την φωτοσυνθετική λειτουργία την πρώτη μέρα κατά περίπου 30%, ενώ την τέταρτη το φύκος έχει προσαρμοστεί στη μεθανόλη και εμφανίζει έως και 130% καλύτερη απόδοση στα $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ σε σχέση με το μάρτυρα (Εικ. 37).



Εικόνα 37: Κβαντική απόδοση του φωτοσυστήματος II (ΦPSII) όπως προκύπτει από μετρήσεις φθορισμού αφού το σύστημα έχει φτάσει σε σταθερή κατάσταση.

3.3.2. Επίδραση μεθανόλης σε θρεπτικό Bishop με προσθήκη βιταμινών και γλουταμικού

Το δεύτερο dose course μεθανόλης πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό Bishop με προσθήκη βιταμινών B₁,B₁₂,B₇ και 100 mg L⁻¹ γλουταμικού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 38 η μεθανόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων. Το γεγονός αυτό αποδίδεται πιθανόν στην ύπαρξη του γλουταμικού οξέος που λειτουργεί ως οργανική πηγή ενέργειας.



Εικόνα 38: Επίπεδα βιομάζας σε διάστημα τριών ημερών υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθανόλης (% v/v), παρουσία βιταμινών και γλουταμικού οξέως.

4.Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω πειραματικών σειρών συνοψίζονται στα παρακάτω συμπεράσματα που αφορούν το χλωροφύκος *Chlorella minutissima* (UTEX 2341):

- Το αυτότροφο θρεπτικό F2P δεν ευνοεί την ανάπτυξη, ενώ το Bishop υπερέχει ασύγκριτα.
- Η προσθήκη βιταμινών B₁₂, B₁ και B₇ στο αυτότροφο θρεπτικό Bishop βελτιώνει την ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα.
- Προσθήκη γλουταμικού οξέος (50-100 mg/L) στο θρεπτικό Bishop σε υψηλή ένταση φωτός (170μE) βελτιώνει αισθητά την ανάπτυξη και κυρίως την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.
- Το χλωροφύκος αναπτύσσεται και φωτοσυνθέτει ικανοποιητικά σε μεγάλο εύρος αλατότητας (0-25‰). Συγκεντρώσεις NaCl κοντά στο 35‰ δείχνουν να το καταπονούν.
- Σε θερμοκρασία 30°C τα κύτταρα αναπτύσσουν αποδοτικότερο φωτοσυνθετικό μηχανισμό απ'ότι σε χαμηλότερη θερμοκρασία 22°C.
- Η επίδραση της μεθανόλης στην αύξηση βιομάζας της *Chlorella minutissima* είναι εμφανής σε αυτότροφο θρεπτικό απουσία άλλης οργανικής ύλης. Αντίθετα, παρουσία γλουταμικού οξέος και βιταμινών δεν παρατηρείται μετρήσιμη διαφοροποίηση.

Βιβλιογραφία

- Alyabyev A.Ju., Loseva N.L., Gordon L.Kh., Andreyeva I.N., Rachimova G.G., Tribunskih V.I., Ponomareva A.A., Kemp R.B. (2007) “The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells” *Thermochimica Acta* **458**, 65–70
- Beale S. (1970) “The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Chlorella*” *Plant Physiology* **45**, 504-506
- Beale S., Appleman D. (1971) “Chlorophyll synthesis in *Chlorella*: Regulation by degree of light limitation and growth” *Plant Physiology* **47**, 230-235
- Bishop N.L., Senger H. (1971) “Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*”, Pietro S (ed.), pp 130–143
- Bock C., Krienitz L., Proschold T. (2011) “Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species” *Fottea* **11(2)**, 293–312
- Cadoret J., Garnier M., Saint-Jean. (2012) “Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology” in G.Piganeau (ed.) *Advances in Botanical Research* Vol. **64**, pp 285-341
- Cheirsilp B., Torpee S. (2012) “Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation” *Bioresource Technology* **110**, 510–516
- Choi W., Oh S., Seo Y., Kim G., Kang D., Lee S., Jung K., Cho J., Ahn J., Choi G., Lee H. (2011) “Effects of Methanol on Cell Growth and Lipid Production from Mixotrophic Cultivation of *Chlorella* sp.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **16**, 946-955

- Croft M.T., Warren M.J., Smith A.G. (2006) “Algae Need Their Vitamins” *Eukaryotic cell* Vol.5(8), 1175-1183
- Dempsey G.P., Lawrence D., Cassie V. (1980) “The ultrastructure of *Chlorella minutissima* Fott et Novakova (Chlorophyceae, Chlorococcales)” *Phycologia* **19**, 13-19
- Gladu P.K, Patterson G.W., Wikfors G.H., Smith B.C. (1995) “Sterol , fatty acid and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae)” *Journal of Phycology* **31**, 774-777
- Gouveia L., Veloso V., Reis A., Fernandes H., Novais J., Empis J. (1996) “Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*” *Bioresource Technology* **57**, 157-163
- Guikema J.A., Sherman L.A. (1983) “Organization and Function of Chlorophyll in Membranes of Cyanobacteria during Iron Starvation” *Plant Physiology* **73**, 250-256
- Harisson P.J., Bergess J.A. (2004) “Marine culture media” in R. A. Andersen (ed.) *Algal Culturing Techniques*, pp 21-33
- Huss .A.R., Frank C., Hartmann E.C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B.M., Wenzeler P., Kessler E. (1999) “Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta)” *Journal of Phycology* **35**, 587-498
- Kotzabasis K., Hatziathanasiou A., Bengoa-Ruigomez M.V., Kentouri M., Divanach P. (1999) “Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: Role of the concentration and frequence of administration” *Journal of Biotechnology* **70**, 357–362

- Kessler E., Huss V.A.R. (1992) “Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* strains (Chlorophyceae) of the culture collection of the University of Texas” *Journal of Phycology* **28**, 550-553
- Lewin J., Chen C. (1971) “Available Iron: A Limiting Factor for Marine Phytoplankton” *Limnology and Oceanography* Vol. **16(4)**, 670-675
- Li Z., Yuan H., Yang J., Li B. (2011) “Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341” *Bioresource Technology* **102**, 9128–9134
- Luo W., Proschold. T., Bock C, Krienitz L. (2010) “Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)” *Plant Biology* **12**, 545–553
- Navakoudis E., Ioannidis N.E., Dörnemann D., Kotzabasis K. (2007) “Changes in the LHCII-mediated energy utilization and dissipation adjust the methanol-induced biomass increase” *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**, 948–955
- Nonomura A.M., Benson A.A. (1992) “The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol” *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. **89**, 9794-9798
- Paul M., Pellny T., Goddijn O. (2001) “Enhancing photosynthesis with sugar signals” *Trends in Plant Science* Vol. **6(5)**, 197-200
- Reigosa Roger M.J., Weiss O. (2001) “Fluorescence techniques” in M.J. Reigosa Roger (ed.) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, pp 155-172

- Sandmann G. (1985) “Consequences of iron deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae” *Photosynthesis Research* **6**, 261-271
- Shugarman P.M., Traut T.W. (1967) “The effect of temperature on chlorophyll synthesis in Chlorella” NASA collection Technical Report ID 19720065503 (<http://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19720065503>)
- Sorokin C., Myers J. (1957) “The course of respiration during the cell cycle of Chlorella cells” *Journal of General Physiology* Vol.**40** No.**4**, 579-592
- Tamiya H., Iwamura T., Shibata K., Hase E., Nihei I T.(1953) “Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of Chlorella” *Biochimica et Biophysica Acta* Vol.**12**, 23-40
- Theodoridou A., Dornemann D., Kotzabasis K. (2002) “Light-dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol” *Biochimica et Biophysica Acta* **1573**, 189-198
- Von Wettstein D., Gough S., Kannangara C.G. (1995) “Chlorophyll biosynthesis” *The Plant Cell* **7**, 1039-1057
- Wood B.J.B., Grimson P.H.K., German J.B., Turner M. (1999) “Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms” *Journal of Biotechnology* **70**, 175–183
- Wood P.J., Siddiqui I.R. (1971) “Determination of Methanol and Its Application to Measurement of Pectin Ester Content and Pectin Methyl Esterase Activity” *Analytical Biochemistry* **39**, 418-428
- Weinstein J.D., Beale S.I. (1985) “Enzymatic Conversion of Glutamate to b-Aminolevulinate in Soluble Extracts of the Unicellular Green Alga, Chlorella vulgaris” *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol.**237** No.**2**, 454-464

- Ιωαννίδης Ν.Ε. (2006) «Συγκριτική μελέτη του ρόλου των πολυαμινών στη φωτοανεξάρτητη και φωτοεξαρτώμενη ανάπτυξη και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού», Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Κόλλια Α. (2004) «Ο ρόλος του φωτοσυστήματος ΙΙ στον φωτοελεγχόμενο μεταβολισμό της μεθανόλης», Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης