

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΘΕΙΟΥ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Chlorobaculum tepidum*

ΛΥΡΑΤΖΑΚΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη του πράσινου θειοβακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*. Το *Chlorobaculum tepidum* είναι ένα gram αρνητικό, υποχρεωτικά αναερόβιο βακτήριο που αναπτύσσεται παρουσία θειούχων και θειοθειικών ενώσεων με την διαδικασία της αναερόβιας φωτοσύνθεσης. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως δότες ηλεκτρονίων και οξειδώνονται σε θειικά, με ενδιάμεσο μεταβολίτη το στοιχειακό θείο, που αρχικά παράγεται και αποθηκεύεται εξωκυττάρια για να χρησιμοποιηθεί μόλις εξαντληθούν οι υπόλοιπες πηγές θείου. Για την μελέτη της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές μέθοδοι με σκοπό την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της βακτηριοχλωροφύλλης c, του στοιχειακού θείου και των θειικών ιόντων. Όσον αφορά τα σφαιρίδια στοιχειακού θείου, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης τους. Στην συνέχεια μελετήθηκε η μορφολογία τους και η καθαρότητα τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία και φασματομετρία μάζας. Τέλος, έγινε προσπάθεια μελέτης του εκκρινόμενου πρωτεόματος και των πρωτεϊνών των σφαιριδίων του στοιχειακού θείου με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης (SDS-PAGE) με την χρήση διαφορετικών πρωτόκολλων απομόνωσης.

Λέξεις κλειδιά: *Chlorobaculum tepidum*, φωτοσύνθεση, πράσινα θειούχα βακτήρια, μεταβολισμός θείου, ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρονική μικροσκοπία, φασματομετρία μάζας, πρωτεομική.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Η φωτοσύνθεση	5
1.2 Τα βακτήρια (προκαριώτες)	5
1.3 Πράσινα θειούχα βακτήρια (GSB)	6
1.4 <i>Chlorobaculum tepidum</i> (<i>Cba. tepidum</i>)	6
1.5 Η φωτοσύνθεση στο <i>Chlorobaculum tepidum</i>	8
1.6 Μεταβολισμός του Θείου	10
1.7 Στόχος εργασίας	12
2 Υλικά και Μέθοδοι	12
2.1 Υλικά.....	12
2.2 Μέθοδοι.....	15
2.2.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i>	15
2.2.2 Επεξεργασία καλλιεργιών για την μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i>	17
2.2.3 Απομόνωση εκκρινόμενου στοιχειακού θείου	18
2.2.4 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας LDI-TOF και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης	18
2.2.5 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης.....	18
2.2.6 Απομόνωση του εκκρινόμενου πρωτεόματος	19
2.2.7 Πρωτεϊνική συμπίκνωση.....	19
2.2.8 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών	19
2.3 Αναλυτικές μέθοδοι	20
2.3.1 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis)	20
2.3.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	22
2.3.3 SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	24
2.3.4 Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF	26
2.3.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	27
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	28
3.1 Ανάπτυξη του <i>Chlorobaculum tepidum</i>	28
3.1.2 Καμπύλες ανάπτυξης.....	30
3.2 Μελέτη των σφαιριδίων στοιχειακού θείου	34

3.2.1 Μελέτη στοιχειακού θείου με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και με στοιχειακή ανάλυση (EDS).....	34
3.2.2 Μελέτη των σφαιριδίων στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF	38
3.2.3 Μελέτη του εκκρινόμενου πρωτεόματος και των πρωτεϊνών που βρίσκονται πάνω στο στοιχειακό θείο με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	40
4 Συμπεράσματα-Προοπτικές	48
4.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου.....	48
4.2 Μελέτη του απομονωμένου στοιχειακού θείου	49
4.3 Μελέτη του εκκρινόμενου πρωτεόματος.....	50
4.4 Μελλοντικοί στόχοι- Προοπτικές	50
5 Βιβλιογραφία	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	53

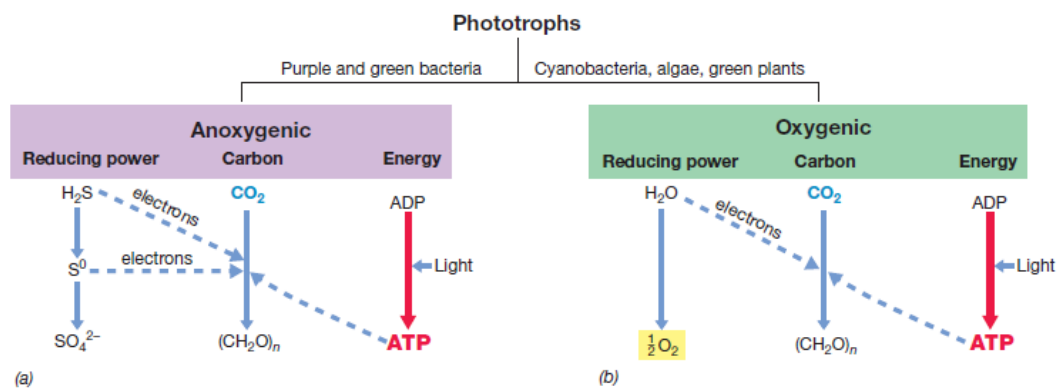
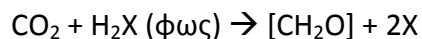
1. Εισαγωγή

1.1 Η φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση χρησιμοποιείται από τα φυτά και φωτοσυνθετικά βακτήρια για τη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. Η ενέργεια που παράγεται αποθηκεύεται σε μορφή υδατανθράκων. Οι οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν ονομάζονται φωτοαυτότροφοι. Η ζωή στη γη, εκτός ορισμένων εξαιρέσεων εξαρτάται από τη φωτοσύνθεση. Ακόμα και οργανισμοί που δεν φωτοσυνθέτουν, εξαρτώνται από αυτή έμμεσα, είτε από προϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκειά της για ενέργεια, είτε από παραπροϊόντα της όπως το οξυγόνο¹.

Η οξυγονική φωτοσύνθεση πραγματοποιείται από τα φυτά, από διάφορα κυανοβακτήρια και φύκη. Ονομάζεται έτσι διότι, ένα παραπροϊόν της είναι το μοριακό οξυγόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με την οξείδωση του νερού. Μια άλλη μορφή φωτοσύνθεσης είναι η ανοξυγονική, που δεν περιλαμβάνει την παραγωγή μοριακού οξυγόνου. Σε αυτή χρησιμοποιούνται σαν δότες ηλεκτρονίων άλλα μόρια εκτός του νερού όπως το υδρόθειο. Η ανοξυγονική φωτοσύνθεση επιτυγχάνεται σε αναερόβιες συνθήκες².

Η γενική εξίσωση της φωτοσύνθεσης είναι :



Εικόνα 1.1 Ανοξυγονική και οξυγονική φωτοσύνθεση.

1.2 Τα βακτήρια (προκαριώτες)

Τα βακτήρια συνήθως είναι σφαιρικά, ραβδόσχημα ή σπειροειδή κύτταρα μήκους λίγων μικρομέτρων και λόγω του μεγέθους τους είναι δυνατή η απεικόνισή τους με οπτικό μικροσκόπιο. Έχουν απλή δομή, δεν περιέχουν οργανίδια ούτε πυρήνα. Συνήθως φέρουν ένα αδρό προστατευτικό περίβλημα, το κυτταρικό τοίχωμα. Κάτω από αυτό βρίσκεται η

κυτταρική μεμβράνη, που περικλείει το κυτταρόπλασμα στο οποίο περιέχεται το DNA, RNA και πρωτεΐνες.

Οι προκαριώτες είναι η πιο ετερογενής ομάδα κυττάρων όσον αφορά την χημική τους οργάνωση. Οι περισσότεροι διαβιούν ως μονοκύτταροι οργανισμοί. Όμως ορισμένοι σχηματίζουν αλυσίδες, συμπλέγματα ή άλλες πολυκύτταρες δομές. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες rRNA προέκυψαν τρεις διαφορετικές φυλογενετικές σειρές κυττάρων. Οι σειρές αυτές επονομαζόμενες και ως 'κλάδοι', χωρίζονται σε Βακτήρια, Αρχαία (προκαρυωτικά κύτταρα) και σε Ευκάρυα (ευκαρυωτικά κύτταρα). Ο κλάδος των Βακτηρίων αποτελείται από πολλές διαφορετικές φυλές. Κάποιες από αυτές είναι τα πράσινα θειούχα βακτήρια, τα πράσινα μη θειούχα βακτήρια, τα κυανοβακτήρια κ.α., με την μεγαλύτερη από αυτές τα πρωτεοβακτήρια³.

1.3 Πράσινα θειούχα βακτήρια (GSB)

Τα θειούχα βακτήρια αναπτύσσονται, είτε σε πλακτονικές ή βενθικές μορφές σε υδρόβιο, ανοξυγονικό περιβάλλον. Είναι υποχρεωτικά αναερόβια και φωτοαυτότροφα. Διαχωρίζονται σε πράσινα θειούχα βακτήρια (GSB) και τα μωβ θειούχα βακτήρια (PSB), και μελετούνται, πάνω από 100 χρόνια. Τα GSB, που οφείλουν το όνομα τους στο χρώμα τους από τις χρωστικές: βακτηριοχλωροφύλλη c, d και e, και αποτελούν την οικογένεια Chlorobiaceae.

Για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, χρησιμοποιούν κέντρο αντίδρασης τύπου I, καθώς και μόρια βακτηριοχλωροφύλλης a,c,d,e, και καροτενοειδή. Η βακτηριοχλωροφύλλη βρίσκεται σε εξειδικευμένα οργανίδια, τα οποία καλούνται χλωροσώματα. Τα βακτήρια αυτά οξειδώνουν διάφορες μορφές του θείου όπως θειούχα, θειοθειικά άλατα και στοιχειακό θείο καθώς και υδρογόνο ή σιδηρο (σπανιότερα). Οι προαναφερόμενες ουσίες χρησιμεύουν ως δότες ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση.

Επίσης, πραγματοποιούν την καθήλωση του άνθρακα μέσω του αντίθετου κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. Χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ώστε να παραχθούν διάφορες ενώσεις του άνθρακα, αντί του κύκλου του Calvin^{4,5}.

1.4 *Chlorobaculum tepidum* (*Cba. tepidum*)

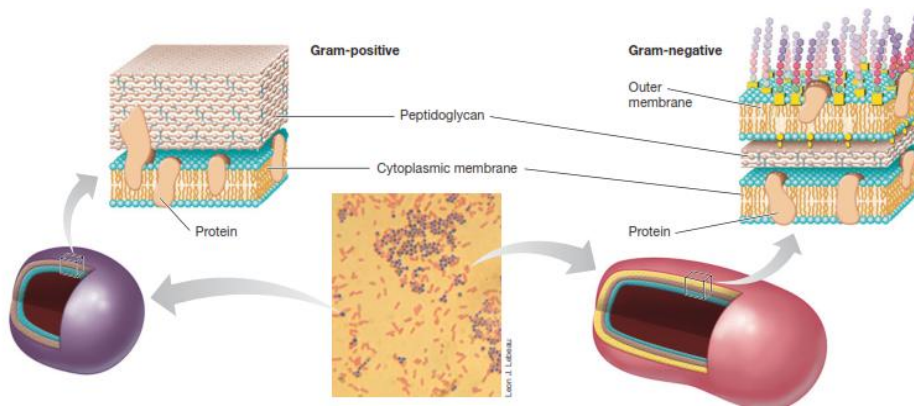
Το *Chlorobaculum tepidum* είναι ένα υποχρεωτικά αναερόβιο θερμοφίλο βακτήριο. Απομονώθηκε από θερμές πηγές στη Νέα Ζηλανδία. Το περιβάλλον που αναπτύσσεται περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις θειούχων ενώσεων και έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 47-48° C. Προκειται για ένα Gram αρνητικό βακτήριο της οικογένειας *Chlorobiaceae* (πίνακας 1.1), τα κύτταρα του οποίου είναι μη κινητικά και έχουν ραβδοειδή μορφή. Το κύτταρο του είναι μεγαλύτερα σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη *Chlorobaculum*, και είναι το μόνο θερμοφίλο⁶.

Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση *Chlorobaculum tepidum*

Βασίλειο	Βακτήρια
Διαίρεση	<i>Chlorobi</i>
Κλάση	<i>Chlorobia</i>
Τάξη	<i>Chlorobiales</i>
Οικογένεια	<i>Chlorobiaceae</i>
Γένος	<i>Chlorobaculum</i>
Είδος	<i>Chlorobaculum tepidum</i>

Το γονιδίωμα του *Chlorobaculum tepidum* είναι το πρώτο που αποκωδικοποιήθηκε από την οικογένεια των Chlorobiaceae. Το πλήρες γονιδίωμα του *Cba. tepidum* αποκωδικοποιήθηκε το 2002 και βρέθηκε ότι είναι ένα απλό χρωμόσωμα με 2,154,946 ζεύγη βάσεων⁷. Από τη σύγκριση με άλλα γονιδιώματα, αποδείχθηκε η ύπαρξη γονιδίων συντηρημένα μεταξύ των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Από τη φυλλογονιδιακή ανάλυση προέκυψαν πιθανοί διπλασιασμοί γονιδίων που σχετίζονται με βιοσυνθετικά μονοπάτια της φωτοσύνθεσης του θείου και του αζώτου.

Η χρώση κατά Gram είναι μια μέθοδος χρώσης που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία. Με βάση την αντίδρασή τους στη χρώση αυτή τα βακτήρια μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες : τα Gram-positive και τα Gram-negative. Συγκεκριμένα, τα Gram-positive βακτήρια εμφανίζονται μωβ-βιολετί και Gram-negative βακτήρια εμφανίζονται ροζ. Η διαφορά χρώματος οφείλεται στη διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-positive και Gram-negative κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-negative είναι πιο πολύπλοκο. Και οι δύο τύποι κυτταρικών τοιχωμάτων περιέχουν μια στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης, που είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικά. Η διαφορά των Gram-positive και Gram-negative βακτηρίων, όσον αφορά στο μόριο της πεπτιδογλυκάνης είναι ότι στα πρώτα εμφανίζεται σε ποσοστό 90%, στο τοίχωμά τους, ενώ στα δεύτερα σε ποσοστό 10%. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι το τοίχωμα των Gram-negative βακτηρίων αποτελείται κατά κύριο λόγο από την εξωτερική μεμβράνη, όπου πρόκειται για μια δεύτερη λιπιδική διπλοστοιβάδα η οποία δεν αποτελείται αποκλειστικά από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες, όπως η κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά και από διάφορους πολυσακχαρίτες (**εικόνα 1.1**)³.



Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση Gram-positive(αριστερά) και Gram-negative(δεξιά).

Το *Chlorobaculum tepidum* ως ένα Gram-negative βακτήριο, διαθέτει εκτός της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μια επιπλέον μεμβράνη την εξωτερική. Ανάμεσα σε αυτές τις μεμβράνες βρίσκεται ο περιπλασματικός χώρος. Στο περίπλασμα εδράζεται μια στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης ισχυρά προσδεμένη με την εξωτερική μεμβράνη με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεμβρανικών λιποπρωτεϊνών και των λιπιδίων⁸.

Το *Chlorobaculum tepidum* όπως και τα περισσότερα πράσινα φωτοσυνθετικά βακτήρια διαθέτει χλωροσώματα. Το χλωροσώμα μορφολογικά πρόκειται για ένα ελλειψοειδές οργανίδιο, μήκους 100-200nm, το οποίο περιβάλλεται από μια λιπιδική μονοστοιβάδα που περιέχει μόρια βακτηριοχλωροφύλλης (BChl) και καροτενοειδή και τοπολογικά συναντάται προσδεμένο στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των πράσινων φωτοσυνθετικών βακτηρίων. Τα χλωροσώματα αποτελούν τις φωτοσυνθετικές κεραίες των βακτηρίων αυτών, που συλλέγουν την ενέργεια από το φως, διοχετεύοντάς το στο κέντρο της αντίδρασης που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα χλωροσώματα απέχουν από την κυτταροπλασματική μεμβράνη μια μέση απόσταση 7nm κάτι που φανερώνει την ύπαρξη της FMO ως συνδετικής πρωτεΐνης⁹. Η FMO είναι ένα τριμερές, του οποίου κάθε μονομερές περιλαμβάνει επτά μόρια BChl a. Τέλος κάθε κύτταρο *Chlorobaculum tepidum* διαθέτει 200-250 χλωροσώματα, όπου το καθένα περιέχει περίπου 200000 μόρια BChl c. Επίσης το 3% των συνολικών BChl στα χλωροσώματα του *Chlorobaculum tepidum* είναι BChl a, δηλαδή περίπου 6000 μόρια BChl a περιέχονται σε ένα χλωροσώμα του βακτηρίου αυτού.

1.5 Η φωτοσύνθεση στο *Chlorobaculum tepidum*

Η φωτοσύνθεση στο *Chlorobaculum tepidum* από την φωτοσυνθετική του κεραία δηλαδή τα χλωροσώματα. Η ενέργεια από τα χλωροσώματα μεταφέρεται στην πρωτεΐνη FMO, που περιέχει Bchl_a, η οποία εμφανίζει μέγιστο απορρόφηση στα 808nm. Το κέντρο αντίδρασης του βακτηρίου είναι ένα σύμπλεγμα πέντε υπομονάδων: των PscA, PscB, PscC, PscD και της πρωτεΐνης FMO¹⁰.

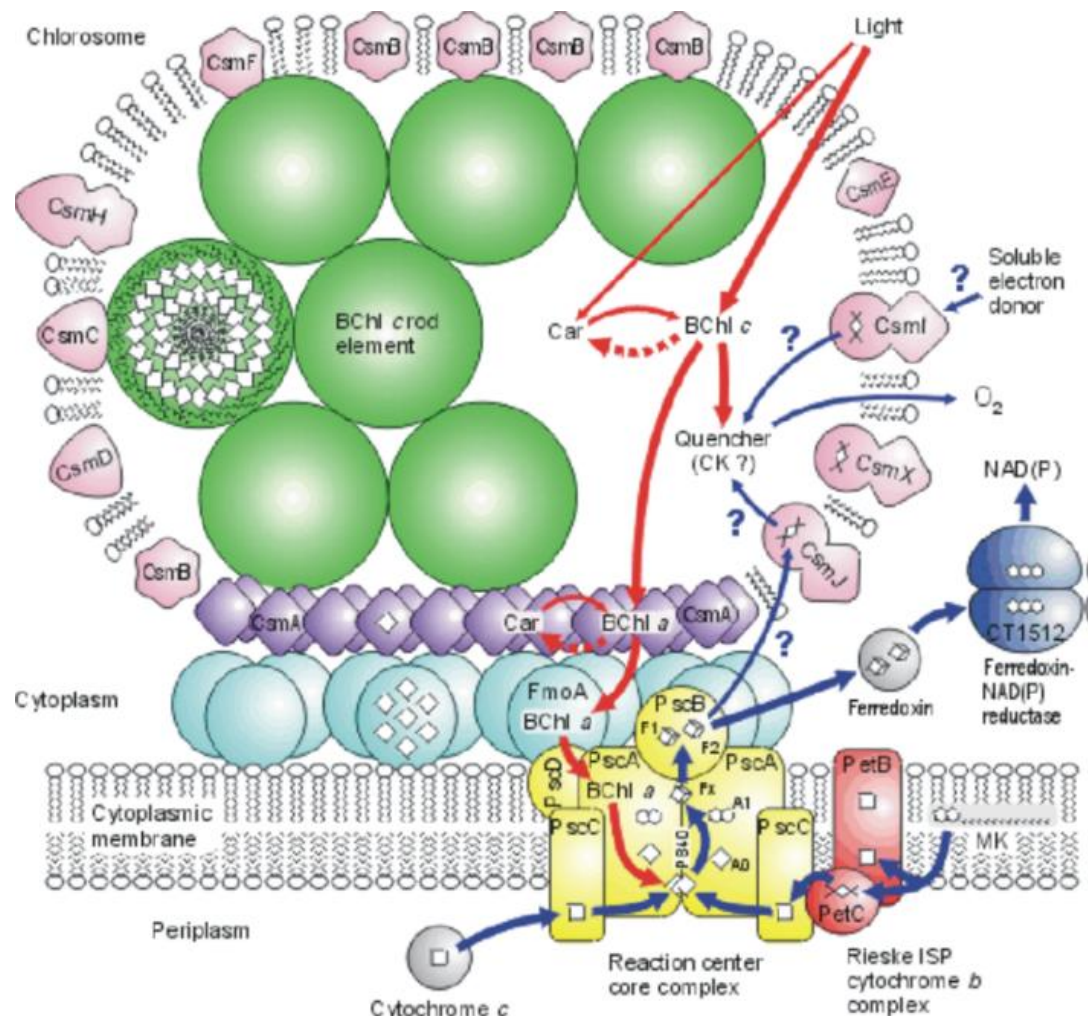
Ο πυρήνας του κέντρου αντίδρασης είναι ένα ομοδιμερές τύπου I, δηλαδή αποτελείται από δύο αντίγραφα της PscA υπομονάδας και προσδένει τον κύριο

ηλεκτρονιοδότη P840, ο οποίος είναι ένα ζεύγος μορίων BChl *a*, τον κύριο ηλεκτρονιοδέκτη A₀ ο οποίος είναι ένα μονομερές Chl *a*, καθώς και το σύμπλεγμα 4Fe-4S, το οποίο συμβολίζεται Fx¹¹.

Η υπομονάδα PscB προσδένει τα δύο συμπλέγματα 4Fe-4S, επωνομαζόμενα ως FA και FB, τα οποία αποτελούν τους τελικούς ηλεκτρονιοδέκτες, και συνδέεται με τη βακτηριακή φερρεδοξίνη.

Το φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης συμπληρώνεται με δύο υπομονάδες του κυτοχρώματος c551, τις PscC. Το κυτόχρωμα αυτό μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο ειδικό ζεύγος P480. Τέλος το ενεργό κέντρο συμπληρώνεται με την υπομονάδα PscD, απαραίτητη για τη μεταφορά ενέργειας από τα χλωροσώματα μέσω της FMO, ο ακριβής της ρόλος δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα^{10,12}.

Έτσι τα πράσινα θειούχα βακτήρια έχουν την δυνατότητα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια μέσω της μεμβράνης από το περιπλασματικό κυτόχρωμα c σε μία φερρεδοξίνη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η φερρεδοξίνη είναι μια πρωτεΐνη Fe-S χαμηλού δυναμικού, που ανάγει τα μόρια NAD⁺ με μια αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή της φερρεδοξίνη-NAD⁺¹³.



Εικόνα 1.3 Μοντέλο της σύνδεσης των χλωροσωμάτων με το κέντρο αντίδρασης και την πρωτεΐνη FMO. Τα κόκκινα βέλη παριστάνουν τη μεταφορά ενέργειας και τα μπλε την μεταφορά των ηλεκτρονίων¹¹.

1.6 Μεταβολισμός του Θείου

Τα πράσινα θειούχα βακτήρια χρησιμοποιούν ενώσεις του θείου δότες ηλεκτρονίων. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Chlorobaculum tepidum* χρησιμοποιεί θειούχα (S^{2-}), θειοθειικά ($S_2O_3^{2-}$) άλατα και στοιχειακό θείο (S^0) ως ηλεκτρονιοδότες. Λόγω της πληθώρας των ενζύμων, που συμμετέχουν στην διαδικασία του μεταβολισμού των ενώσεων του θείου, η μελέτη της καθίσταται δύσκολη. Ένα προτεινόμενο μοντέλο της διαδικασίας αυτής παρουσιάζεται στην **εικόνα 1.4**^{14, 15}.

Στο μοντέλο αυτό περιλαμβάνει τα προτεινόμενα μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων και παρατηρήθηκαν τα θειούχα να οξειδώνονται σε ενώσεις στοιχειακού θείου ως ενδιάμεσο. Οι ενώσεις αυτές βγαίνουν εκτός κυττάρου και δημιουργούν σφαιρίδια στοιχειακού θείου. Τα σφαιρίδια αυτά διατηρούνται, όσο εξακολουθεί να είναι διαθέσιμη η ανηγμένη πηγή θείου από την οποία έχουν προκύψει. Όταν αυτή εξαντληθεί, τότε τα σφαιρίδια οξειδώνονται πλήρως σε θειικά ιόντα. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστοί οι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργούνται και διασπώνται τα σφαιρίδια αυτά. Όσον αφορά την δομή των σφαιριδίων πιστεύεται ότι αποτελούνται από αλυσίδες πολυσουλφιδίων (θειαιθέρων), μηδενικού φορτίου, που τερματίζονται με οργανικά κατάλοιπα^{16,17}.

Τα πράσινα θειούχα βακτήρια περιέχουν γονίδια *dsr*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένα σύστημα αναγωγής θειώδων αλάτων (dissimilatory sulfite reductase system), που είναι ομόλογο με αυτό, των βακτηρίων, που ανάγουν θειικά άλατα, με την διαφορά ότι το σύστημα αυτό λειτουργεί προς την αντίθετη κατεύθυνση. Στο *Chlorobaculum tepidum*, τα *dsr* γονίδια χωρίζονται σε δύο ομάδες, και συγκεκριμένα στις *dsrNCABL6TMKJOP89* (CT2251–2238) και *dsrCABLEFH* (CT0851–0857), έτσι ώστε το γονίδιο *dsrCABL* να διπλασιάζεται. Έχει αποδειχθεί ότι στο συγκεκριμένο βακτήριο, το σύστημα *dsr* είναι απαραίτητο για την οξείδωση των σφαιριδίων του θείου^{7,18}.

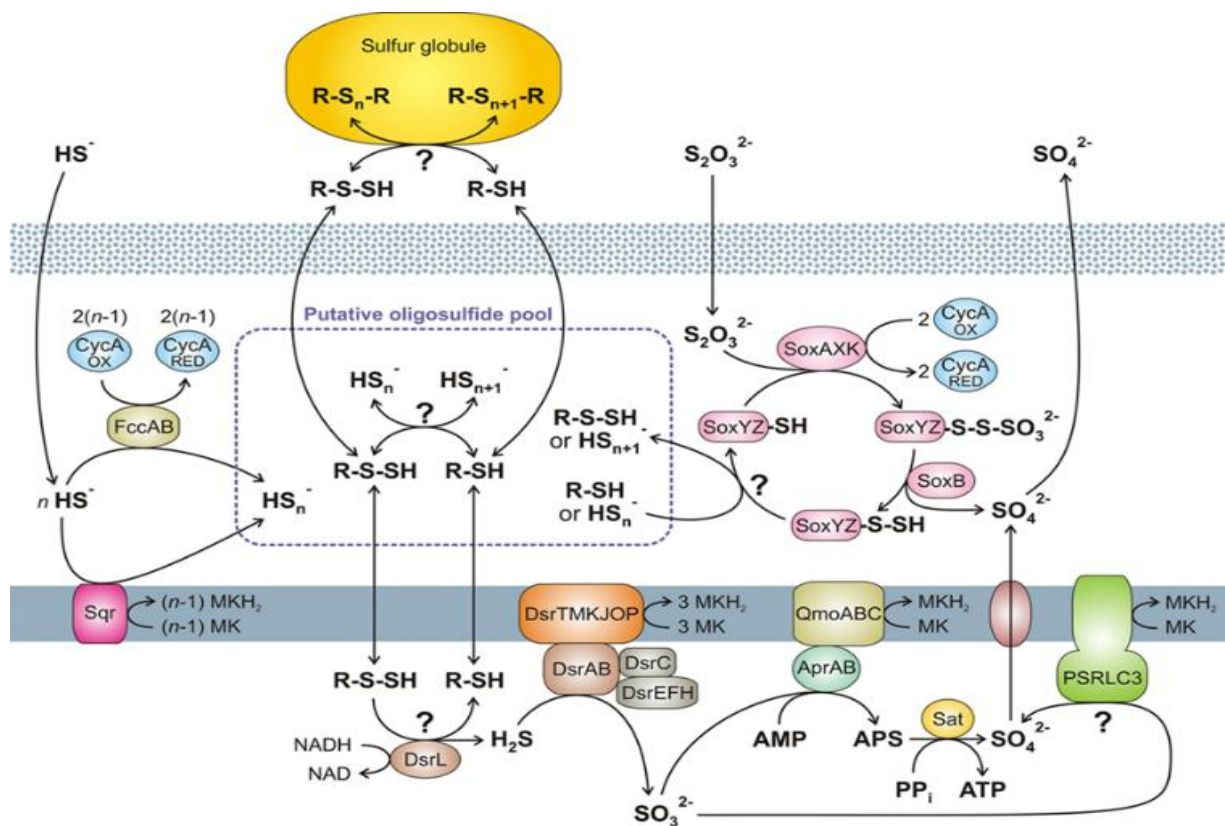
Οι πρωτεΐνες *Drs* που παίρνουν μέρος στην οξείδωση των σφαιριδίων στοιχειακού θείου είναι: *siroheme-containing sulfite reductase DrsAB*, το διαμεμβρανικό σύμπλοκο μεταφοράς ηλεκτρονίων *DrsMKJOP* και οι *drsW/CT2238*, *drsV/CT2239*, *drsT/CT2245*, *drsU/2246*¹⁹.

Προτεινόμενα ένζυμα, που συμμετέχουν στην οξείδωση των θειούχων ενώσεων στο *Chlorobaculum tepidum* είναι η οξειδοαναγωγή της κινόνης (quinone oxidoreductase-SQR) και το φλαβοκυτόχρωμα *c* (Fcc). Το φλαβοκυτόχρωμα *c-553* καταλύει τη μεταφορά $2 e^-$ απ' το H_2S στο *cyt c*, σε

μικρομοριακές συγκεντρώσεις, με το στοιχειακό θείο ως προϊόν οξείδωσης. Τα μεμβρανικά-συνδεδεμένα ομόλογα της SQR, CT0117 και CT1087 καταλύουν την οξείδωση των θειούχων αλάτων μέσα στο κύτταρο²⁰.

Η οξείδωση των θειοθειικών γίνεται απ' το σύστημα οξείδωσης θείου (sulfur-oxidation system) Sox. Στο προτεινόμενο μονοπάτι, η χαρακτηριστική ομάδα σουλφονίων του $S_2O_3^{2-}$ οξειδώνεται σε θειικό και εξέρχεται εκτός του κυττάρου, ενώ η χαρακτηριστική ομάδα σουλφονίων απελευθερώνεται στην υποθετική περιοχή των πρόδρομων ενώσεων του στοιχειακού θείου (putative oligosulfide pool), και έπειτα είτε τοποθετείται στα σφαιρίδια του στοιχειακού θείου, είτε οξειδώνεται σε θειώδες SO_3^{2-} απ' το σύστημα *dsr*²¹.

Παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί τα ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση του θείου μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ο τρόπος που εξέρχονται τα πολυσουλφίδια από το κύτταρο, ούτε το πώς εισέρχονται σε αυτό.



Εικόνα 1.4 Μοντέλο μεταβολικού μονοπατιού του θείου

1.7 Στόχος εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι μέσω της πρωτεομική ανάλυσης, να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό του βιογενούς θείου. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού του εκκρινόμενου πρωτεόματος και των πρωτεϊνών που βρίσκονται πάνω στα σφαιρίδια θείου. Αυτό είναι ένα ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα διότι, το πρωτέομα ενός οργανισμού είναι δυναμικό. Αντιδρώντα σε ερεθίσματα οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, να αλλάξουν τοπολογία και να αλλάξουν επίπεδα σύνθεσης και αποικοδόμησης²².

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Fluka και Merck. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο (dH₂O). Επίσης για την παρασκευή ορισμένων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε υπερκάρθαρο νερό (nanopure H₂O).

Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (low range biorad)

- Phosphorilase b 97400 Da
- Serum albumin 66200 Da
- Ovalbumin 45000 Da
- Carbonic anhydrase 31000 Da
- Trypsin inhibitor 21500 Da
- Lysozyme 14400 Da

Ρυθμιστικό διάλυμα TT (ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης)

Σε διάλυμα 1M Trizma Base αναμινύονται:

- 20 mM Tricine
- 1 mM Benzamidine

- 1 mM 6-amino-caproic acid Ακολουθεί ρύθμιση pH=7,5.

Διαλύματα παρασκευής πηκτών 1D SDS-PAGE

AB-mix buffer

- 48% (w/v) Acrylamide
- 1,5% (w/v) Bis-acrylamide

Gel buffer (3x)

- 3M Trizma Base
- 0,3% (w/v) SDS
- pH=8,4 (ρύθμιση με HCl)

Πηκτή επιστοιβάξης (100ml) (4%)

- AB-mix 8 ml
- Gel-buffer 25 ml
- Nanopure έως τα 100ml
- APS 750μl
- TEMED 75μl

Πηκτή διαχωρισμού (300ml) (10%)

- Glycerol 30 gr
- AB-mix 60 ml
- Gel-buffer 99 ml
- APS 1,5 ml
- TEMED 150 μl

Anode buffer

- 1M Trizma Base
- pH=8,9 (ρύθμιση με HCl)

Cathode buffer

- 1M Trizma Base
- 1M Tricine Base
- 1,0% (w/v) SDS
- pH=8,25 (με H₂SO₄)

Sample buffer

- 12% (w/v) SDS
- 10% (w/v) Glycerol
- 6% (w/v) Mercaptoethanol
- 0,05% (w/v) Coomassie Blue G250
- 150mM Tris-HCl, pH=7.0

Διάλυμα χρώσης πηκτών (Blue Silver)

- 0,12% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
- 10% (w/v) Ammonium sulfate
- 10% (v/v) Phosphoric acid
- 20% (w/v) Methanol

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτών

- 5% (v/v) Methanol
- 7% (v/v) Acetic acid

Sample buffer 4x

- Glycerol 40%
- SDS 8%
- Bromophenol blue 0,04%
- Tris- HCl 240mM pH=6,8
- beta Mercaptoethanol 5%

Lysis Buffer

- 240mM Tris- HCl pH 8,5
- 8M Urea
- NaCl 1M

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου περιλαμβάνει τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Οι ποσότητες που αναγράφονται αντιστοιχούν σε καλλιέργεια 1lt.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
KH_2PO_4	0.50gr
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0.50gr
NH_4Cl	0.40gr
NaCl	0.40gr
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.20gr
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.050gr
EDTA	0.0125gr

NaHCO ₃	2.0gr
Μείγμα Ιχνοστοιχείων	1ml
Βιταμίνη B ₁₂ (20mg/lit)	2ml

Πίνακας 2.1. Αντιδραστήρια που απαιτούνται για καλλιέργεια 1 Lt του *Chlorobaculum tepidum*

Αναλυτικότερα, για την δημιουργία του μείγματος ιχνοστοιχείων, οι ποσότητες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα διαλύονται σε 1lt απιονισμένου νερού.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
EDTA	0.67gr
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0.2gr
CoCl ₂ x 6H ₂ O	19mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	19mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	15mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	10mg
VSO ₄ x 2H ₂ O	3mg
NiCl ₂ x 6H ₂ O	2.5mg
CuCl ₂ x 2H ₂ O	1.7mg
H ₃ BO ₃	0.6mg
NaWO ₄ x 2H ₂ O	0,2mg
Na ₂ HSeO ₃	0.2mg
NaOH	έως pH = 8

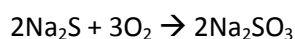
Πίνακας 2.2. Αντιδραστήρια που απαιτούνται για 1lt μείγματος ιχνοστοιχείων

Για την δημιουργία 1lt καλλιέργειας οι παραπάνω ενώσεις του πίνακα 2.1 διαλύονται σε 1lt απιονισμένου νερού και το διάλυμα αναδεύεται συνεχώς, έως ότου να μην υπάρχουν αδιάλυτα στερεά υπολείμματα. Ως πηγές θείου χρησιμοποιούνται: 7,7mM Na₂S και 8mM Na₂S₂O₃ x 5H₂O.

Στη συνέχεια 800ml του διαλύματος αυτού, μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας του 1lt, και ακολουθεί αποστείρωση για 20 min στους 120°C. Έπειτα, αφού το διάλυμα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται στο στόμιο της φιάλης parafilm και πραγματοποιείται απαέρωση μέσω διαβίβασης αερίου CO₂ για 40 min. Η χρήση του parafilm γίνεται με σκοπό την αποφυγή εισχώρησης ατμοσφαιρικού οξυγόνου μετά την απαέρωση, καθώς όταν αυτή πραγματοποιηθεί η φιάλη σφραγίζεται με ειδικό καπάκι. Οι διαδικασίες που ακολουθούν μετά τη σφράγιση της φιάλης, πραγματοποιούνται με τη χρήση αποστειρωμένων συριγγών.

Στις περιπτώσεις όπου η επιθυμητή συνθήκη ανάπτυξης περιλαμβάνει το αντιδραστήριο Na₂S, τότε η προσθήκη του στο διάλυμα γίνεται σε αυτό το σημείο, σε συγκέντρωση 7,7mM, με προσαρμογή πορώδους φίλτρου 0,2μm (GE HealthCare, Life Sciences, Whatman™, Disposable filter Device, 0,2μm polyethersulfone membrane) στη σύριγγα. Συνεχίζοντας, γίνεται ρύθμιση του pH σε 6.9 με τη χρήση αποστειρωμένου διαλύματος 10% H₂SO₄ και διαλύματος KOH 4M.

Τέλος γίνεται προσθήκη 20ml βακτηρίων (προκαλλιέργεια) και η καλλιέργεια τοποθετείται στο σκοτάδι overnight, έτσι ώστε το περισσευούμενο οξυγόνο να καταναλωθεί απ' το H₂S, όπως προκύπτει από την παρακάτω αντίδραση.



Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 47-49°C, υπό πλήρη φωτισμό για μία περίπου μέρα.⁶ Η πλήρης ανάπτυξη των βακτηρίων διαπιστώνεται από την αλλαγή του χρώματος του περιεχομένου της φιάλης από ανοικτό πράσινο σε σκούρο πράσινο. Η φιάλη απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και φυλάσσεται στους 4°C. Η συλογή των κυττάρων γίνεται με φυγόκεντρωση στις 6000g για 20min και φυλάσσονται στους -20°C για περεταίρω επεξεργασία.

2.2.2 Επεξεργασία καλλιεργιών για την μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*

Αρχικά 1 ml καλλιέργειας φυγοκεντρείται στα 13000 g για 15 min. Το υπερκείμενο που προκύπτει συλλέγεται με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση του με ιοντική χρωματογραφία. Το ίζημα που περιέχει βακτηριακά κύτταρα και στοιχειακό θείο, εκχυλίζεται με 1 ml μεθανόλης 99,9%²³ και πραγματοποιείται μια δεύτερη φυγοκέντρωση στα 13000 g για 15 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται με σκοπό την περεταίρω ανάλυσή του με φασματοφωτομετρία απορρόφησης ορατού – υπεριώδους (UV-Vis).

2.2.3 Απομόνωση εκκρινόμενου στοιχειακού θείου

Η καλλιέργεια του βακτηρίου φυγοκεντρείται σε 6000g για 20 min. Αποτέλεσμα αυτής της φυγοκέντρησης είναι η κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων αλλά και του στοιχειακού θείου που έχει παραχθεί. Το υπερκείμενο διάλυμα που προκύπτει αποτελείται από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και τους μεταβολίτες του βακτηρίου.

Σε 1ml του υπερκείμενου ομογενοποιούνται τα κύτταρα και το θείο με τη χρήση ενός πινέλου. Στη συνέχεια επιστοιβάζονται σε διάλυμα ζάχαρης 2M (10-15 ml) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4000g για 10min. Τα σφαιρίδια του θείου δημιουργούν ιζημα ενώ τα κύτταρα μένουν στο υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές. Ακολουθεί μια πλύση με TT Buffer για 5min στις 13000g, το υπερκείμενο απορρίπτεται¹⁸.

Τέλος το απομονωμένο στερεό, συλλέγεται με nanopure water και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να μελετηθεί με SEM και LDI-TOF. Για την πρωτεϊνική ανάλυση το στερεό συλλέγεται με TT Buffer ή με Urea Lysis buffer και φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

2.2.4 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας LDI-TOF και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Για τη μελέτη του απομονωμένου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας LDI-TOF, κόκκοι δείγματος διαλυτοποιούνται σε μεθανόλη ή σε ακετονυτρίλιο. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται πάνω στην ειδική θέση του στόχου. Για τη μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης κόκκοι δείγματος τοποθετούνται σε μια ταινία άνθρακα, η οποία εισάγεται στο μικροσκόπιο: JEOL-JSM-6390 LV. Οι εικόνες καταγράφηκαν στα 20KV.

2.2.5 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης

Από το απομονωμένο διάλυμα σφαιριδίων θείου και TT Buffer ύστερα από επανεώρηση των σφαιριδίων τοποθετούνται σε καθαρό erpendorf 100-500μl δείγματος. Ακολουθεί διαδικασία εκχύλισης των πρωτεϊνών από το θείο, που περιλαμβάνονται τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού (δοκιμάστηκαν: sample buffer 2x, 4x, sample buffer mercaptoethanol free και lysis Buffer, χωρίς chaps)
2. Ανάδευση για 10min

3. Θέρμανση μέχρι βρασμού, προσοχή στην μερκαπτοεθανόλη που είναι πτητική.
4. Φυγοκέντρηση στις 13000g για 10sec
5. Υπερηχοί για 10min

Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές και τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

2.2.6 Απομόνωση του εκκρινόμενου πρωτεόματος

Η καλλιέργεια του βακτηρίου φυγοκεντρείται σε 6000g για 20 min. Το υπερκείμενο στο οποίο βρίσκεται όλο το εκκρινόμενο πρωτέομα συλλέγεται. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση στα 15000g για 45min για να διαχωριστούν οι μεμβράνες που τυχόν βρίσκονται σε αυτό. Το δείγμα συμπυκνώνεται με λυοφυλοποίηση, είτε με κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με τριχλωροοξικό οξύς 100% (TCA).

2.2.7 Πρωτεϊνική συμπύκνωση

Τα πρωτεϊνικά δείγματα του εκκρινόμενου πρωτεόματος είχαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Συνεπώς οι πρωτεϊνικές λωρίδες στο gel ήταν αραιές και πολλές φορές δεν ήταν ορατές με την χρώση Coomassie. Για αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολο του TCA. Στο κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται υποδεκαπλάσιος όγκος TCA και το διάλυμα παραμένει στους 4° C για 12-16h. Την επόμενη μέρα, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13000g για 10min. Έπειτα προστίθεται κρύα ακετόνη ίσης συγκέντρωσης με αυτή του πρωτεϊνικού δείγματος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 13000g για 10min. Η διαδικασία πλύσης με ακετόνη πραγματοποιείται δύο φορές. Το pellet αφήνεται να στεγνώσει για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθεται ο ελάχιστος δυνατός όγκος sample buffer.

2.2.8 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

Η πρωτεόλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου θρυψίνη η οποία είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που έχει την ικανότητα να διασπά το C-τερματικό των πεπτιδικών δεσμών των αμινοξέων αργινίνης και λυσίνης. Η διαδικασία της πρωτεόλυσης ακολουθεί τα εξής στάδια:

- Τα στίγματα των πρωτεϊνών αποκόπτονται από τις πηκτές σε μικρά κομμάτια (1x1cm)
- Ακολουθεί αποχρωματισμός με ACN (50% v/v) και ABS (Ammonium bisulfate) (50mM), με τρεις πλύσεις εναλλάξ διάρκειας 15min η καθεμία.

- Η αναγωγή των αφυδατωμένων πηκτών πραγματοποιείται με 10 mM DTT (1,4-dithiothreitol) σε διάλυμα 50 mM ABS και ακολουθεί επώαση για 45min στους 56°C.
- Η αλκυλίωση γίνεται με 55 mM ιωδοακεταμίδιο σε διάλυμα 50mM ABS για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
- Στη συνέχεια τα κομμάτια της πηκτής πλένονται με 50 mM ABS και με 50% ACN, επαναλαμβάνοντας ουσιαστικά τη διαδικασία που ακολουθείται και στο αποχρωματισμό.
- Πριν την προσθήκη της θρυψίνης πραγματοποιείται αφυδάτωση των κομματιών της πηκτής με 100% ACN για 15min.
- Στα αφυδατωμένα κομμάτια της πηκτής προστίθενται 25-30 μl του ρυθμιστικού διαλύματος της πρωτεόλυσης το οποίο περιέχει 20 μg θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου και αφήνονται για 30-90min σε πάγο.
- Κατόπιν επώζονται για 14-16 ώρες στους 37°C.
- Την επόμενη μέρα τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής ανακτώνται με διαδοχικά βήματα ένωσης των υπερκειμένων που προκύπτουν από δύο διαδοχικές επώσεις διάρκειας 30min, αρχικά σε διάλυμα 50% ACN/0,1% TFA και έπειτα σε διάλυμα 100% ACN.
- Το συνολικό διάλυμα που προκύπτει ξηραίνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια που σχηματίζονται τοποθετούνται στους -20°C μέχρι την τοποθέτησή τους στον στόχο^{24,25}.

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι

2.3.1 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis)

Αρχή της μεθόδου αποτελεί ο νόμος του Beer-Lambert. Με βάση αυτόν, μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων ενώσεων. Ο νόμος αυτός προϋποθέτει:

- Η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
- Μοναδικό φαινόμενο η απορρόφηση
- Ομοιόμορφος όγκος του διαλύματος
- Κάθε σωματίδιο να απορροφά ανεξάρτητα και να μην αλληλεπιδρά με τα άλλα σωματίδια του διαλύματος

Αν ισχύουν τα παραπάνω τότε η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

Όπου:

P_0 , η ακτινοβολούμενη ισχύς

P , η διερχόμενη ακτινοβολία

A , η απορρόφηση $\log(P_0/P)$

T , η διαπερατότητα (P/P_0)

b , το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας

c , η συγκέντρωση της ουσίας που απορροφάει

ϵ , η γραμμομοριακή απορροφητικότητα

Η εξίσωση αυτή αποτελεί τη μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer.

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων ήταν διπλής δέσμης (Perkin Elmer Lambda 20). Η διαφορά των φασματοφωτόμετρων διπλής δέσμης και των φασματοφωτόμετρων μονής δέσμης είναι ότι στα πρώτα, η ακτινοβολία διέρχεται μέσω του δείγματος και του αναφορικού (λευκού), κατευθυνόμενο από ένα περιστρεφόμενο κάτοπτρο. Όταν η ακτινοβολία διέρχεται μέσω του δείγματος, ο ανιχνευτής μετρά την ένταση της διερχόμενης ακτινοβολίας P . Όταν το περιστροφικό κάτοπτρο κατευθύνει την ακτινοβολία προς την κυψελίδα αναφοράς, ο ανιχνευτής μετράει την διερχόμενη ακτινοβολία P_0 . Έτσι συγκρίνεται συνεχώς η P και η P_0 ακτινοβολία με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται συνεχής και αυτόματη διόρθωση για μεταβολές στην ένταση της πηγής ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται, και την απόκριση του ανιχνευτή ως προς το χρόνο και το μήκος κύματος²⁶.

Πηγή ακτινοβολίας για την περιοχή του υπεριώδους (190-400 nm) αποτέλεσε μια λυχνία δευτερίου, ενώ για την περιοχή του ορατού (400-800 nm) μια λυχνία βολφραμίου. Οι λυχνίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν με μεταξύ τους εναλλαγή, με βάση το μήκος κύματος που χρησιμοποιούταν κάθε φορά.

Για εργασία στην περιοχή του υπεριώδους, απαιτούνται κυψελίδες από χαλαζία ή τηγμένη πυριτία, ενώ για την περιοχή του ορατού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πλαστικές κυψελίδες ή απλή πυριτική ύαλος. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία²⁷.

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Βακτηριοχλωροφύλλης C και του στοιχειακού θείου (μεταβολικό ενδιάμεσο που παράγεται από τον οργανισμό). Έτσι μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου.

Τα δείγματα, των οποίων η πορεία επεξεργασίας περιγράφηκε σε παραπάνω ενότητα(2.2.2), τοποθετούνται σε κυψελίδα χαλαζία και μετράται η απορρόφηση αυτών στα εξής μήκη κύματος: 669nm, 295nm. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία Stanier, R. Y.; et al

για το ρυθμό της ανάπτυξης του βακτηρίου, μετράται η απορρόφηση της βακτηριοχλωροφύλλης c στα 669nm, ενώ η απορρόφηση του θείου που παράγεται σαν μεταβολικό ενδιάμεσο από τον οργανισμό μετράται στα 265nm.

Τέλος ποσοτικοποιήθηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση με την μέθοδο Bradford. Για την κατασκευή την πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη πρωτεΐνη η BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού). Αρχικά λαμβάνονται εις διπλούν 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 μl BSA και αραιώνονται μέχρι τα 100μl με κατάλληλο ρυθμιστικό. Το τυφλό θα περιέχει μόνο 100μl ρυθμιστικού. Σε αυτά προστίθεται 900μl αντιδραστηρίου Bradford και ύστερα από ισχυρή ανάδευση (vortex) τα διαλύματα αφήνονται σε ηρεμία για 5min και έπειτα μετράται η απορρόφηση στα 595nm²⁸.

2.3.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Ο διαχωρισμός των μορίων με αυτή τη μέθοδο βασίζεται στην ανταλλαγή ιόντων μεταξύ μιας φορτισμένης στατικής φάσης και μιας υγρής κινητής φάσης αντίθετου φορτίου. Στην χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής μία στήλη γεμίζεται με μία ουσία, γνωστή ως ρητίνη, η οποία αποτελεί την στατική φάση. Αυτή η ρητίνη περιέχει φορτισμένες, λειτουργικές ομάδες οι οποίες έχουν είτε αρνητικό ή θετικό φορτίο. Οι ρητίνες αυτές μπορούν να χαρακτηριστούν είτε ως ισχυρές είτε ως ασθενείς, ανάλογα με την ιοντική ισχύ της λειτουργικής ομάδας που περιέχουν.

Μια ανιοντοανταλλακτική στήλη περιλαμβάνει μία ρητίνη που περιέχει θετικώς φορτισμένες λειτουργικές ομάδες. Αυτές οι ομάδες αλληλεπιδρούν με μόρια της κινητής φάσης που έχουν αντίθετο φορτίο. Ως εκ τούτου μια ανιοντοανταλλακτική στήλη αλληλεπιδρά με αρνητικά φορτισμένα μόρια.

Αυτό που συμβαίνει σε μια ανιοντοανταλλακτική στήλη είναι ότι αφού το δείγμα διαβιβαστεί μέσω της στήλης, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα του δείγματος αλληλεπιδρούν με τις θετικώς φορτισμένες λειτουργικές ομάδες της ρητίνης, με αποτέλεσμα έτσι να κατακρατούνται από την στήλη. Τα ουδέτερα ή θετικά φορτισμένα μόρια διαπερνούν τη στήλη με γρηγορότερο ρυθμό, καθώς αυτά δεν αλληλεπιδρούν με τις θετικώς φορτισμένες ομάδες της ρητίνης, και έτσι δεν κατακρατούνται από την στήλη. Σε αυτό το σημείο ο διαχωρισμός έχει έχει επιτευχθεί, και το μόνο που απαιτείται είναι να εκλουσθούν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια που βρίσκονται στην ρητίνη. Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης ή με αυξημένη ιοντική ισχύ ή pH.

Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται ανίχνευση και μέτρηση της συγκέντρωσης τωνθειικών ιόντων (SO_4^{2-}) της υγρής καλλιέργεια του θειοβακτηρίου *Chlorobaculum tepidum* και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ανιοντική χρωματογραφία.

Στην ανιοντική χρωματογραφία, η επιφάνεια της στατικής φάσης είναι θετικά φορτισμένη και αναπτύσσει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα του αναλύτη. Τα $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ και $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ χρησιμοποιούνται σαν ισχυρός και σαν ασθενής ανιοανταλλάκτης αντίστοιχα.

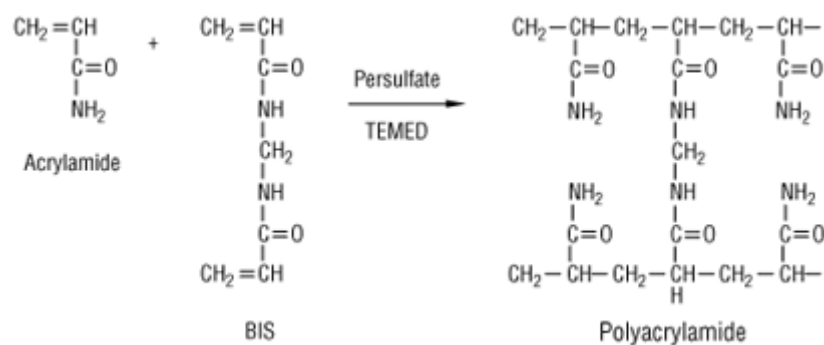
Το σύστημα της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα και χαρακτηριστικά:

- Κινητή φάση: χρησιμοποιούνται άλατα Na ασθενών οξέων αφού ο καταστολέας τα μετατρέπει σε ουδέτερα ελεύθερα οξέα. Η πιο συνηθισμένη κινητή φάση για το διαχωρισμό ανιόντων είναι το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων.
- Στατική φάση: η στατική φάση που βρίσκεται μέσα στη στήλη διαχωρισμού, αποτελείται απ' το υλικό πλήρωσής της, και συνήθως είναι ρητίνες ιονανταλλαγής. Οι ρητίνες ιονανταλλαγής αποτελούνται από ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα, τις δραστικές ιονανταλλακτικές ομάδες (functional groups) και τα αντισταθμιστικά ιόντα αντιθέτου φορτίου προς τις ιονανταλλακτικές ομάδες (counter ions) που κινούνται ελεύθερα μέσα στον ιονανταλλάκτη. Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιούνται πολυμερή τα οποία σχηματίζονται με τον συμπολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου το συμολυμερές αυτό είναι σταθερό σε pH= 0-14, επιτρέποντας τη μετατροπή μη ιοντικών ενώσεων σε ιοντικές έτσι ώστε να μπορούν να αναλυθούν με ιοντική χρωματογραφία. Σαν δραστική ομάδα στην ανιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιείται το τεταρτοταγές αμμώνιο $-N^+(R)_3$.
- Αντλία: οι αντλίες μπορεί να είναι μονού ή διπλού εμβόλου, ισοκρατικές ή βαθμιδωτές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η αντλία Dionex GP50 gradient pump.
- Ανιχνευτής: χρησιμοποιείται αγωγιμομετρικός ανιχνευτής της εταιρείας Dionex CD20, ο οποίος αποκρίνεται στη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου ιόντος, ενώ η περιοχή γραμμικότητάς του καλύπτει 5 τάξεις μεγέθους συγκεντρώσεων γι' αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτική ανάλυση.
- Στήλη: η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex AS4A-SC 4mm.
- Προστήλη: η προστήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex AG4A-SC 4mm.
- Καταστολέας: ο καταστολέας που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex ASRS ULTRA II 4mm
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Marathon Autosampler
- Διάλυμα έκλουσης: χρησιμοποιήθηκε μίγμα όξινου ανθρακικού νατρίου/ανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3/Na_2CO_3$) 20M, μαζί με νερό σε αναλογία 50% απ' το καθένα.
- Ροή: 1,5 ml/min

Πριν ξεκινήσει η ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιείται διαβίβαση He στο διάλυμα έκλουσης και γίνεται απαέρωση του συστήματος, και στη συνέχεια αφού σταματήσει η διαβίβαση He, απομονώνεται το σύστημα και αφήνεται να τρέχει ο εκλουτής, χωρίς να περνάει από τη στήλη, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, δεν πρέπει να υπάρχουν καθόλου φυσαλίδες, γιατί θα προκαλέσουν φραγή ή άλλη φθορά στο όλο σύστημα ²⁹.

2.3.3 SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Στην ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE), η πηκτή παρασκευάζεται από τον χημικό πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμιδίου και *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Αντίδραση σχηματισμού πολυακρυλαμιδίου.

Από την **εικόνα 2.1** γίνεται φανερό ότι ο ρόλος του *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου εντοπίζεται στο σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων ακρυλαμιδίου, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο το πορώδες της πηκτής. Τα μονομερή ακρυλαμιδίου και *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου δεν πολυμερίζονται από μόνα τους ο πολυμερισμός επάγεται από την παρουσία ελευθέρων ριζών στο διάλυμα. Στην πράξη για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών που απαιτούνται για τον πολυμερισμό, χρησιμοποιούνται χημικές ή φωτοχημικές πηγές παραγωγής τους. Στη χημική μέθοδο, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από το υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, APS), παρουσία του αντιδραστηρίου τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνης (TEMED) ο ρόλος της οποίας έγκειται στη σταθεροποίηση των ελεύθερων ριζών.

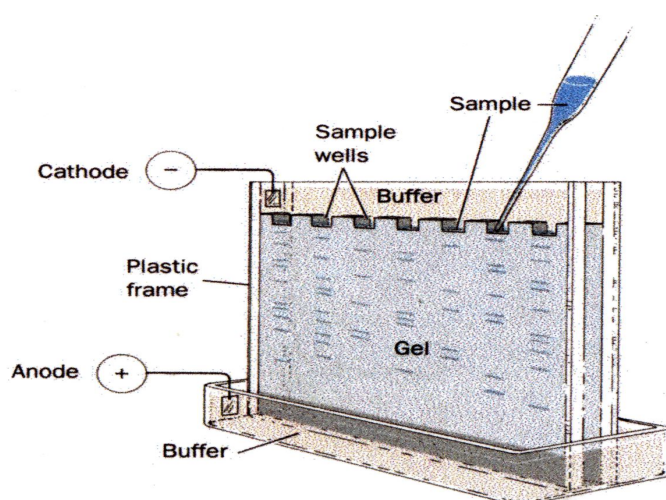
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE): Στα συστήματα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου παρουσία του δωδεκανοθειικού νατρίου (sodium dodecyl sulphate, SDS), ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τη μοριακή τους μάζα και όχι το φορτίο. Το SDS είναι ένα ισχυρό, αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό (αμφιφιλική ένωση) η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά με τα πρωτεϊνικά μόρια σε αναλογία 1,4 gr SDS / gr πρωτεΐνης (περίπου ένα μόριο SDS για κάθε δύο αμινοξέα). Η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα να χάνουν τη φυσική δομή τους και να αποκτούν ραβδόμορφο σχήμα. Επιπλέον, το ισχυρό αρνητικό φορτίο των μορίων SDS καλύπτει το φυσικό φορτίο της πρωτεΐνης, έτσι ώστε τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS τείνουν να έχουν σταθερό λόγο φορτίου προς μάζα. Συνεπώς, κατά την

ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή που περιέχει SDS, ο διαχωρισμός γίνεται μόνο με βάση τη μοριακή μάζα εξαιτίας του φαινόμενου μοριακής διήθησης κατά την κίνηση μέσα από τους πόρους της πηκτής. Πριν από την ηλεκτροφόρηση, τα πρωτεϊνικά δείγματα θερμαίνονται στους 100°C παρουσία SDS και μίας θειόλης, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη. Ο ρόλος της β-μερκαπτοαιθανόλης είναι η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης. Αποτέλεσμα της παραπάνω κατεργασίας είναι η αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων, έτσι ώστε κατά την ηλεκτροφόρηση να διαχωρίζονται οι μεμονωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σε πολλές περιπτώσεις απαρτίζουν ένα πρωτεϊνικό μόριο. Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται μετά από χρώση τους με κατάλληλα αντιδραστήρια. Συνήθως χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 η οποία βάφει τις ζώνες των πρωτεϊνών κυανές, ή εναλλακτικά διάλυμα νιτρικού αργύρου παρουσία αναγωγικών ενώσεων και φορμαλδεΐδης ή γλουταραλδεΐδης, οπότε οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματίζονται καστανόμαυρες. (Alphalyse protocols)

Για την χρώση αργύρου πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

- Κατεργασία της πηκτής σε διάλυμα 40% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ και 50% νερό για 1h.
- Πλύσεις με νερό για 30 min(ή και overnight) για να απομακρυνθεί όλο το οξικό οξύ και να αυξηθεί η ευαισθησία της χρώσης.
- Κατεργασία της πηκτής με διάλυμα 0,02% θειοθειικό νάτριο για 1 min. Αν αφεθεί παραπάνω μειώνει την απόδοση ανάκτησης των πεπτιδίων.
- 3^{εις} πλύσεις με νερό για 20 sec η κάθε μία.
- Κατεργασία της πηκτής με διάλυμα 0,1% νιτρικού αργύρου και 0,025% φορμαλδεΐδη για 20min (η χρώση είναι πιο αποτελεσματική αν το διάλυμα αυτό είναι κρύο).
- 3^{εις} πλύσεις με νερό για 20 sec η κάθε μία.
- Η εμφάνιση γίνεται με ένα διάλυμα 3% ανθρακικό νάτριο και 0,05% φορμαλδεΐδη.
- Αλλαγή διαλύματος εμφάνισης μόλις η πηκτή γίνει κίτρινη και τερματίζεται η χρώση μόλις εμφανιστούν ευδιάκριτες λωρίδες πηκτής.
- Ο τερματισμός γίνεται με διάλυμα 5% οξικό οξύ για 5 min.
- Η αποθήκευση της πηκτής γίνεται στους 4°C σε 1% οξικό οξύ.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική (SDS) πηκτή πολυακρυλαμιδίου βρίσκει εφαρμογή στον κατά προσέγγιση (απόκλιση μέχρι 10%) προσδιορισμό της μοριακής μάζας των πολυπεπτιδίων. Ο προσδιορισμός στηρίζεται στο γεγονός ότι η σχετική κινητικότητα ενός πολυπεπτιδίου σχετίζεται γραμμικά με το δεκαδικό λογάριθμο της μοριακής μάζας του. Στη συνήθη πρακτική, η μοριακή μάζα αγνώστων πολυπεπτιδικών αλυσίδων προσδιορίζεται με την παράλληλη ηλεκτροφόρηση ενός μίγματος πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας (δείκτης μοριακών μαζών)²⁷.



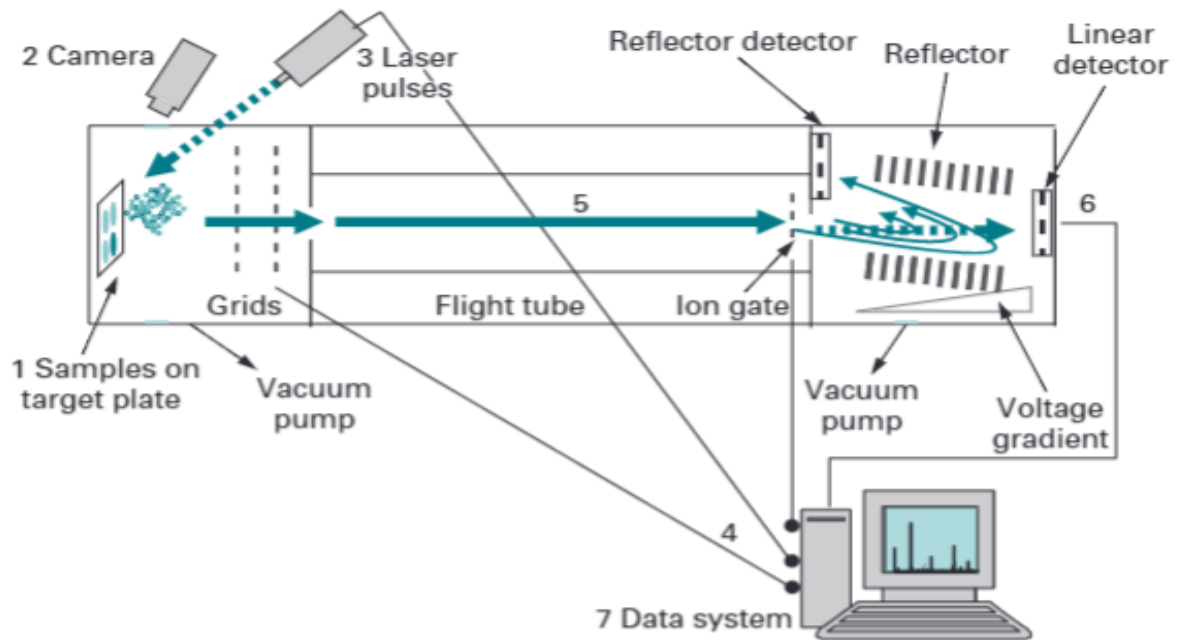
Εικόνα 2.2 σχηματική απεικόνιση SDS-PAGE.

2.3.4 Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

Είναι μια τεχνική ιοντισμού που επιτρέπει την συλλογή πληροφοριών ως προς το μοριακό βάρος πολικών βιοπολυμερών (π.χ. πεπτίδια) των οποίων οι μοριακές μάζες είναι μεγαλύτερες των 200000 Da μέσω ιοντισμού και ατμοποίησης αποφεύγοντας την αποικοδόμησή τους. Στην τεχνική αυτή μικρή συγκέντρωση αναλύτη διασπαρμένου ομοιόμορφα σε στερεά ή υγρή μήτρα. Σκοπός της χρήσης της μήτρας είναι :

- Η αποφυγή της αποικοδόμησης του πολυμερούς απορροφώντας την ενέργεια της ακτίνας του λέιζερ
- Η απορρόφηση στο μήκος κύματος που ο αναλύτης δεν απορροφά σημαντικά
- Η ελαχιστοποίηση διαμοριακών αλληλεπιδράσεων πέραν αυτών της μήτρας- αναλύτη
- Η συμμετοχή στη δημιουργία ιόντων είτε σαν μέσο πρωτονίωσης(ανιχνευτής κατιόντων), είτε σαν μέσο αποπρωτονίωσης (ανιχνευτής ανιόντων)

- Η ανίχνευση συγκεντρώσεων αναλύτη, της τάξης του picomole και μικρότερων



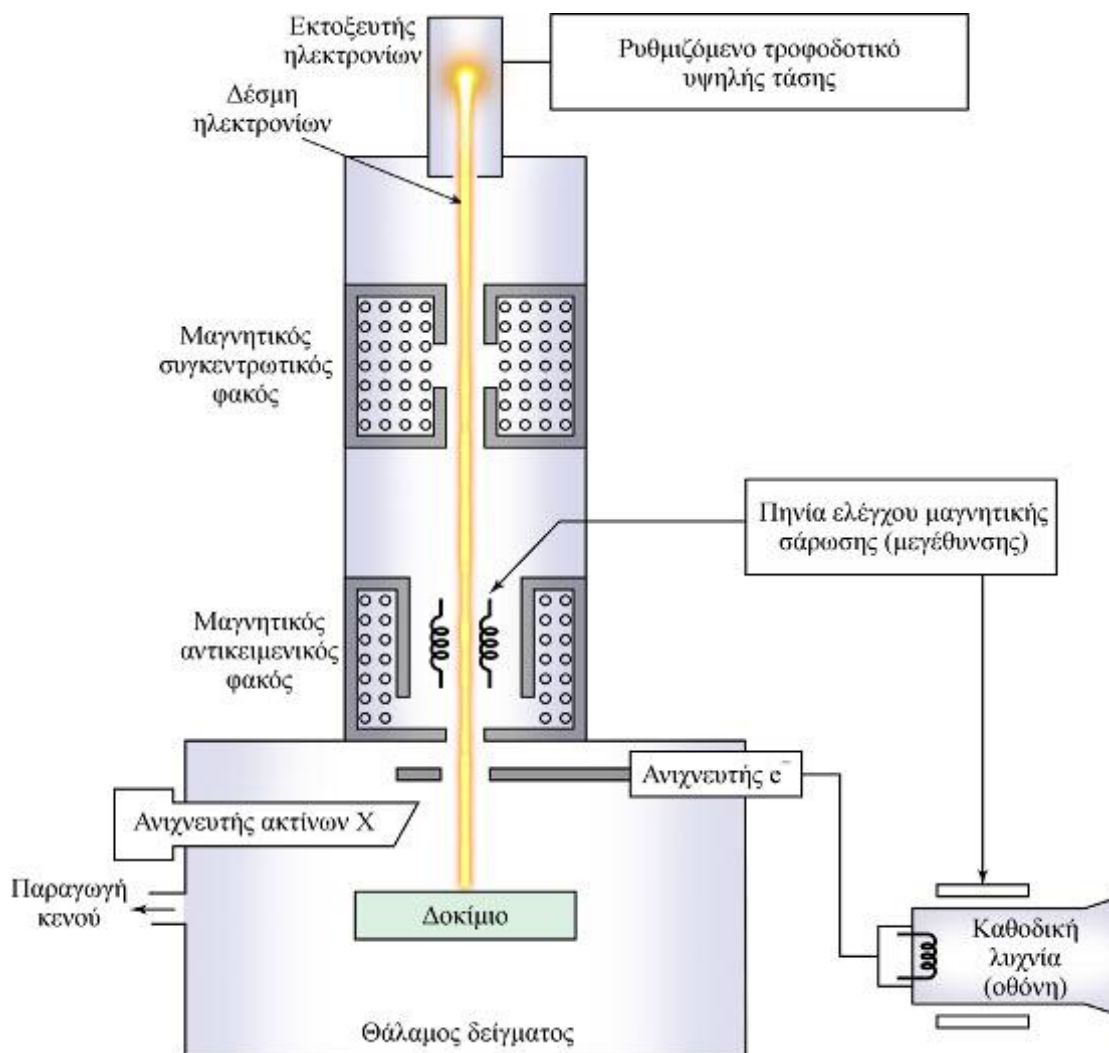
Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση MALDI-TOF²⁶

2.3.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, εκμεταλλεύομενη την ιδιότητα των ηλεκτρονίων να οπισθοσκεδάζονται από ένα σώμα ή όταν διέρχονται από αυτό, παρέχει είδωλα εξωτερικής μορφολογίας όμοια με αυτά που «βλέπει» το ανθρώπινο μάτι. Η ελάχιστη λεπτομέρεια που μπορεί να διακριθεί με οπτικό μικροσκόπιο, είναι περίπου 200nm, λόγω της κυματικής φύσης του ορατού φωτός και του ελάχιστου μήκους κύματός του. Αντίθετα, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εκμεταλλεύεται την κυματική φύση των ηλεκτρονίων σε μήκη κύματος πολύ μικρότερα. Κύριος τρόπος απεικόνισης με SEM είναι η ανίχνευση των δευτερογενών ηλεκτρονίων των ατόμων που διεγείρονται από το δείγμα. Η συλλογή των σημάτων των δευτερογενών ηλεκτρονίων, που εξαρτώνται από τη γωνία πρόσπτωσης της ακτίνας και από την τοπογραφία του δείγματος, μέσω ανιχνευτών δημιουργείτε το είδωλο του δείγματος.

Επιπλέον με το μικροσκόπιο σάρωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί και στοιχειακή ανάλυση (EDS, electron dispersive X ray spectroscopy). Με την ανάλυση αυτή μπορεί να μετρηθεί η χαρακτηριστική ακτινοβολία που εκπέμπεται όταν ένα ηλεκτρόνιο από την εξωτερική στοιβάδα καλύπτει μια «οπή» που έχει δημιουργηθεί από ένα ηλεκτρόνιο

εσωτερικής στοιβάδας το οποίο έχει διεγερθεί. Η ακτινοβολία είναι χαρακτηριστική για κάθε στοιχείο²⁷.



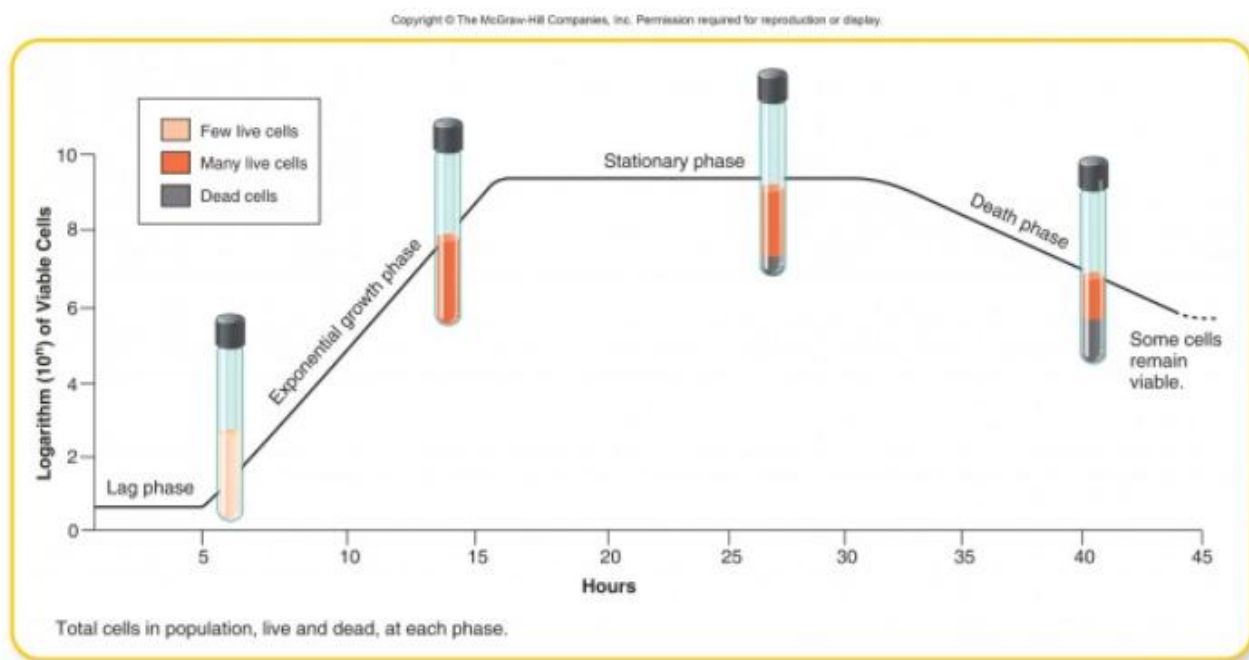
Εικόνα 2.4 Σχηματική απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης²⁷.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Ανάπτυξη του *Chlorobaculum teridum*

Στην παρούσα μελέτη το *Chlorobaculum teridum* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό που ως πηγή θείου χρησιμοποιούνταν και τα θειοθειικά και τα θειούχα άλατα (βλ. § 2.2.1). Κάθε καλλιέργεια περνά από τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: λανθάνουσα, εκθετική (λογαριθμική), στατική, και θανάτου (Εικόνα 3.1). Αρχικά στη λανθάνουσα φάση, τα βακτήρια από την αρχική καλλιέργεια προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες. Ακολουθεί η εκθετική φάση, κατά την οποία τα βακτήρια διαιρούνται με εκθετικούς ρυθμούς εφόσον βρίσκονται σε

κατάλληλες συνθήκες pH, θερμοκρασίας κ.ο.κ. (βλ. § 2.2.1). Στην συνέχεια εισέρχονται στην στατική φάση όπου ο αριθμός των βακτηρίων παραμένει σταθερός, λόγω εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού. Αυτό δεν σημαίνει ότι δεν παράγονται ποτέ νέα κύτταρα. Σε αυτό σημείο ο πληθυσμός σταθεροποιείται, δηλαδή ο αριθμός των νέων κυττάρων είναι ίσος με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν. Τέλος κατά τη φάση θανάτου ο αριθμός των βακτηρίων μειώνεται.



Εικόνα 3.1 Γενική καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων.

Ο χρόνος που διαρκεί κάθε φάση διαφέρει από καλλιέργεια σε καλλιέργεια. Ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν τους χρόνους αυτούς είναι: η ένταση του φωτισμού, η παλαιότητα της αρχικής καλλιέργειας και η πηγή θείου. Οι φάσεις ανάπτυξης του *Chlorobaculum teridum* διακρίνονται από την αλλαγή του χρώματος της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2**, διακρίνεται καλλιέργεια του βακτηρίου στην λανθάνουσα φάση, στην λογαριθμική φάση και στην φάση στασιμότητας.

Η αλλαγή του χρώματος, ανάλογα με την φάση στην οποία βρίσκεται κάθε καλλιέργεια, οφείλεται στη βακτηριοχλωροφύλλη, που περιέχουν τα κύτταρα της κάθε καλλιέργειας. Αρχικά η συγκέντρωση των κυττάρων, συνεπώς και της βακτηριοχλωροφύλλης, είναι χαμηλή έτσι, το χρώμα είναι ανοιχτό. Με το πέρασμα του χρόνου, η καλλιέργεια παίρνει ένα κίτρινο χρώμα και αυξάνεται η θολερότητά της. Αυτό οφείλεται, στην παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης στοιχειακού θείου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο οργανισμός παράγει εξωκυττάρια σφαιρίδια στοιχειακού θείου τα οποία έχουν κίτρινο χρώμα. Παρότι παράλληλα αυξάνεται και η ποσότητα των κυττάρων και της βακτηριοχλωροφύλλης, το κίτρινο χρώμα είναι πιο έντονο. Στην φάση στασιμότητας

παρατηρείται ένα σκούρο πράσινο χρώμα το οποίο μαρτυρά τον μέγιστο αριθμό κυττάρων στην καλλιέργεια. Με προσεκτική παρατήρηση, σε αυτή τη φάση, διακρίνεται ακόμα μια μικρή ποσότητα στερεού θείου η οποία έχει κίτρινο χρώμα. Ωστόσο η ποσότητα του θείου είναι μειωμένη σε σχέση με την προηγούμενη φάση ανάπτυξης και αυτό συμβαίνει, διότι το βακτήριο εισάγει στο εσωτερικό του το θείο το οποίο έχει παράξει, για να το χρησιμοποιήσει ως δότη ηλεκτρονίων.

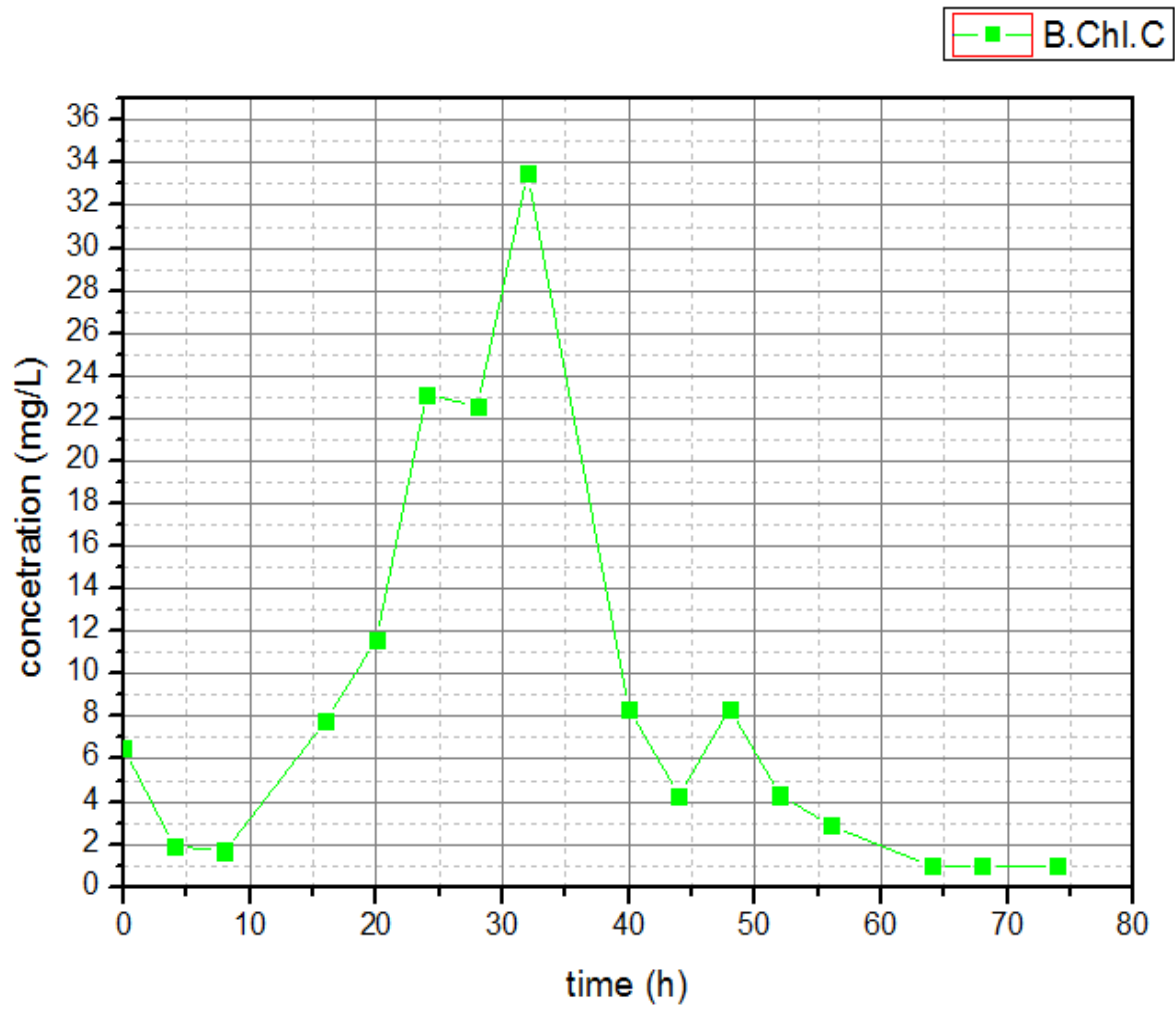
Τέλος αν οι καλλιέργεια αφεθεί για αρκετές μέρες (άνω των δέκα) το χρώμα της μετατρέπεται σε καφέ, γεγονός το οποίο δείχνει ότι το βακτήριο έχει μπει στη φάση θανάτου.



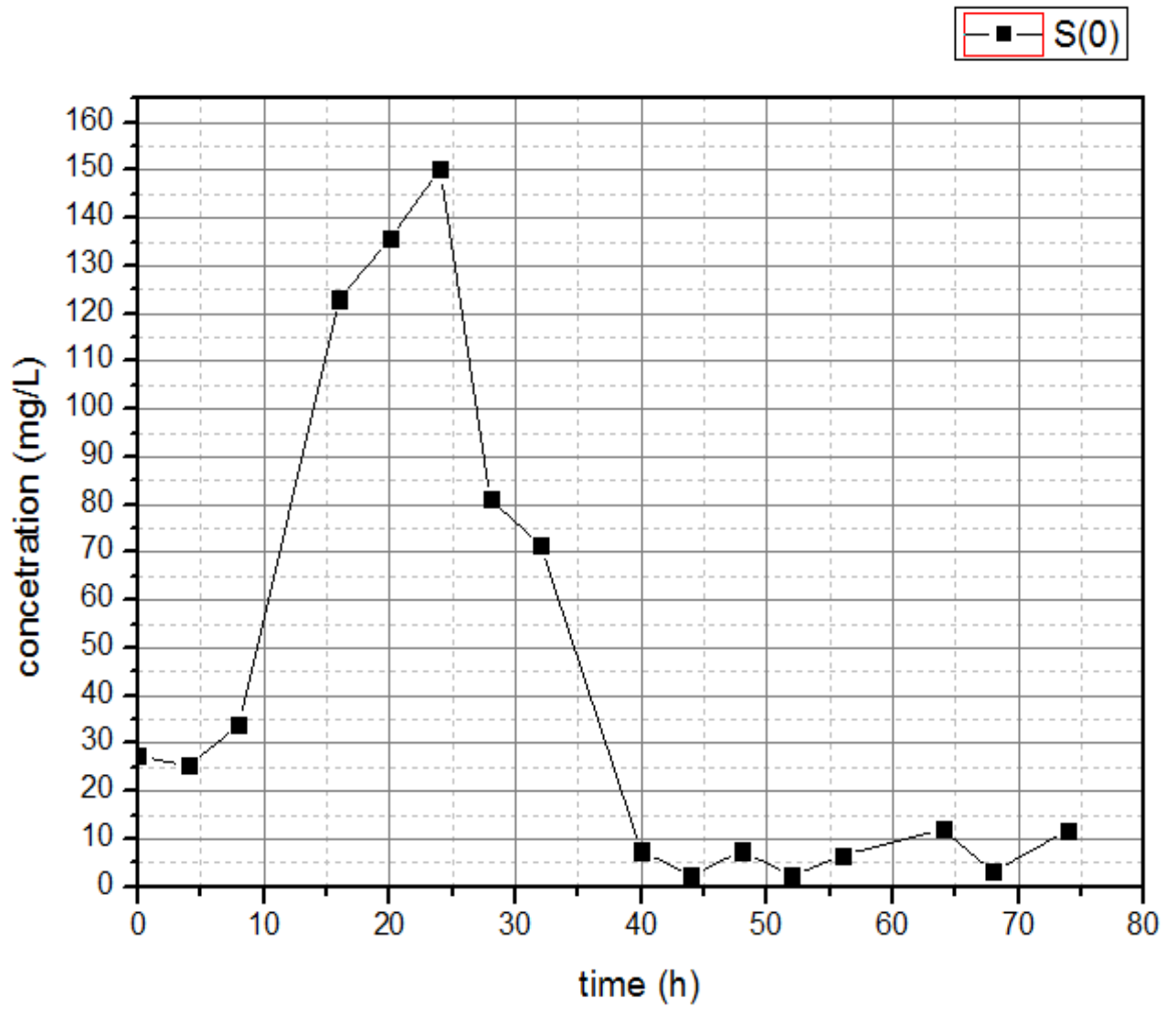
Εικόνα 3.2 Καλλιέργεια του βακτηρίου στην λανθάνουσα φάση, στην λογαριθμική φάση και στην φάση στασιμότητας (από τα αριστερά προς τα δεξιά).

3.1.2 Καμπύλες ανάπτυξης

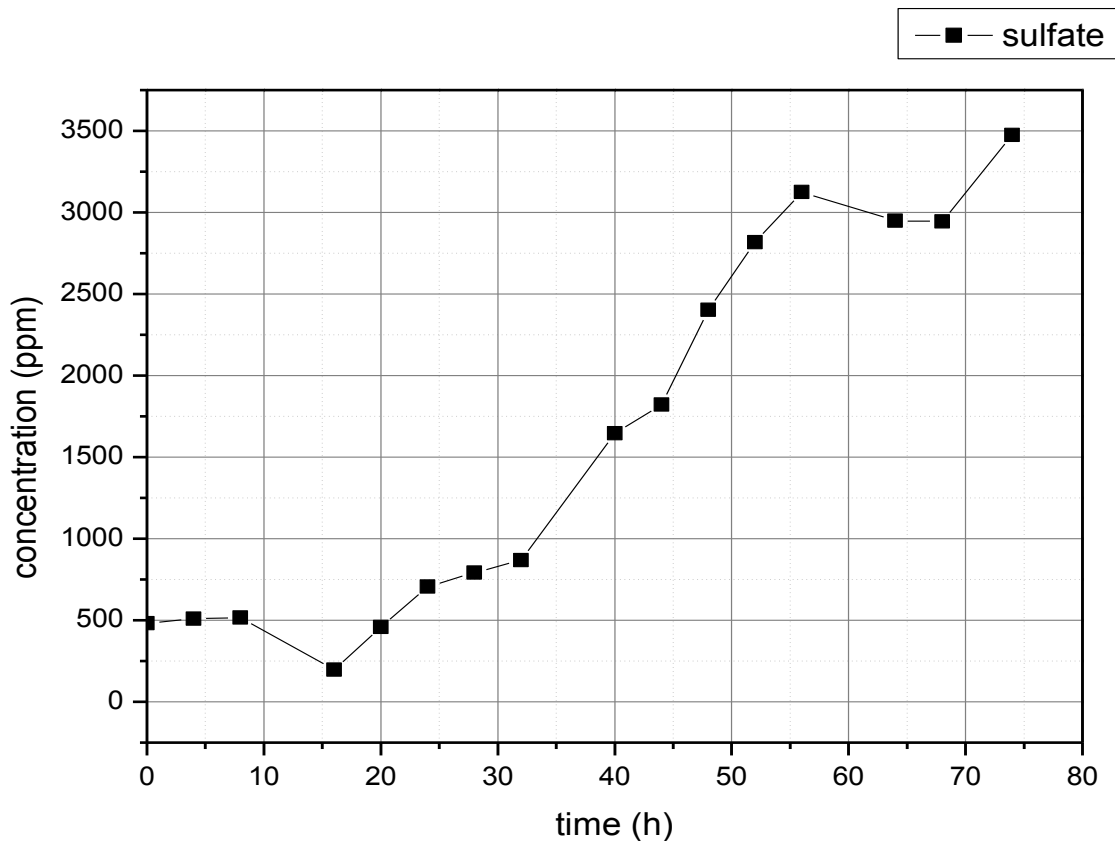
Οι καμπύλες ανάπτυξης βοηθούν στην κατανόηση της ανάπτυξης και του μεταβολισμού του *Chlorobaculum tepidum*. Σε αυτές παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης της βακτηριοχλωροφύλλης c του στοιχειακούθείου και των θειικών ιόντων (SO_4^{2-}) σε συνάρτηση με το χρόνο. Η συγκέντρωση της Bchl c δεν είναι αντιπροσωπευτική της συγκέντρωσης των κυττάρων αλλά παρουσιάζει μια αναλογική σχέση με το ρυθμό ανάπτυξης και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στην περιοχή του ορατού. Όσο για τους μεταβολίτες, το στοιχειακό θείο προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στο υπεριώδες και τα θειικά με ιοντική χρωματογραφία. Οι πειραματικές μεθοδοι και τεχνικές αναλυθηκαν στην ενότητα 2. Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ανάπτυξης.



Εικόνα 3.3 Συγκέντρωση βακτηριοχλωροφύλλης c σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 3.4 Συγκέντρωση στοιχειακού θείου σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 3.5 Συγκέντρωση θειικών ιόντων (SO_4^{-2}) σε συνάρτηση με το χρόνο.

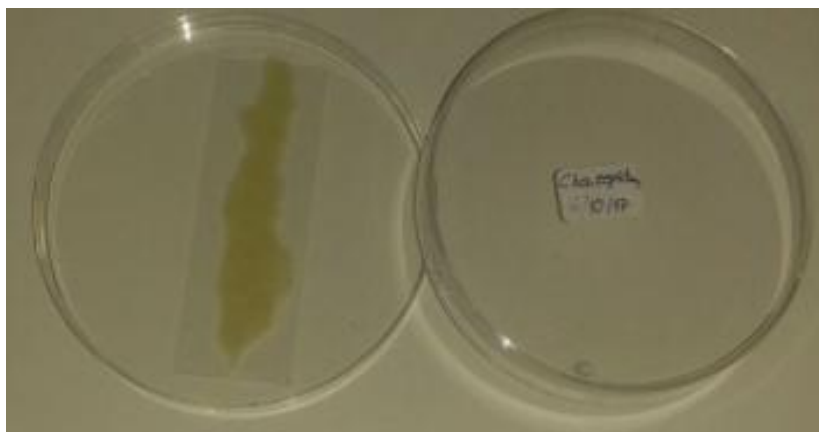
Από τα παραπάνω γραφήματα μπορούμε να ορίσουμε το εύρος της κάθε φάσης. Αρχικά παρατηρούμε ότι το μέγιστο της ανάπτυξης παρατηρείται στις 24-30h. Παρατηρώντας τις **εικόνες 3.3** και **3.4** προκύπτει ότι το μέγιστο της συγκέντρωσης του θείου επιτυγχάνεται νωρίτερα από αυτό της βακτηριοχλωροφύλλης c. Στην συνέχεια παρουσιάζεται σταδιακή μείωση μέχρι τις 48-50h για τη βακτηριοχλωροφύλλη c και 40h για το στοιχειακό θείο. Αυτό οφείλεται στο ότι το βακτήριο στην αρχή παράγει το στοιχειακό θείο ως παραπροϊόν της οξείδωσης των θειούχων και των θειοθειικών και στη συνέχεια το ξαναχρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων.

Συνεπώς για να μελετηθεί ο οργανισμός στην στατική φάση τα κύτταρα και το θείο πρέπει να απομονώνονται στις 48-50h. Ενώ για να μελετηθεί στην εκθετική φάση πρέπει να απομονωθεί στο μέγιστο του θείου (24h) και στο μέγιστο της βακτηριοχλωροφύλλης(30h).

Τέλος από τις καμπύλες των θειικών ιόντων **εικόνα 3.5**, φαίνεται ότι φτάνουν στο μέγιστο αρκετά αργότερα από την βακτηριοχλωροφύλλη c και το στοιχειακό θείο(σημείο μέγιστης ανάπτυξης). Τα θειικά είναι το τελικό προϊόν οξείδωσης των θειοθειικών και του στοιχειακού θείου.

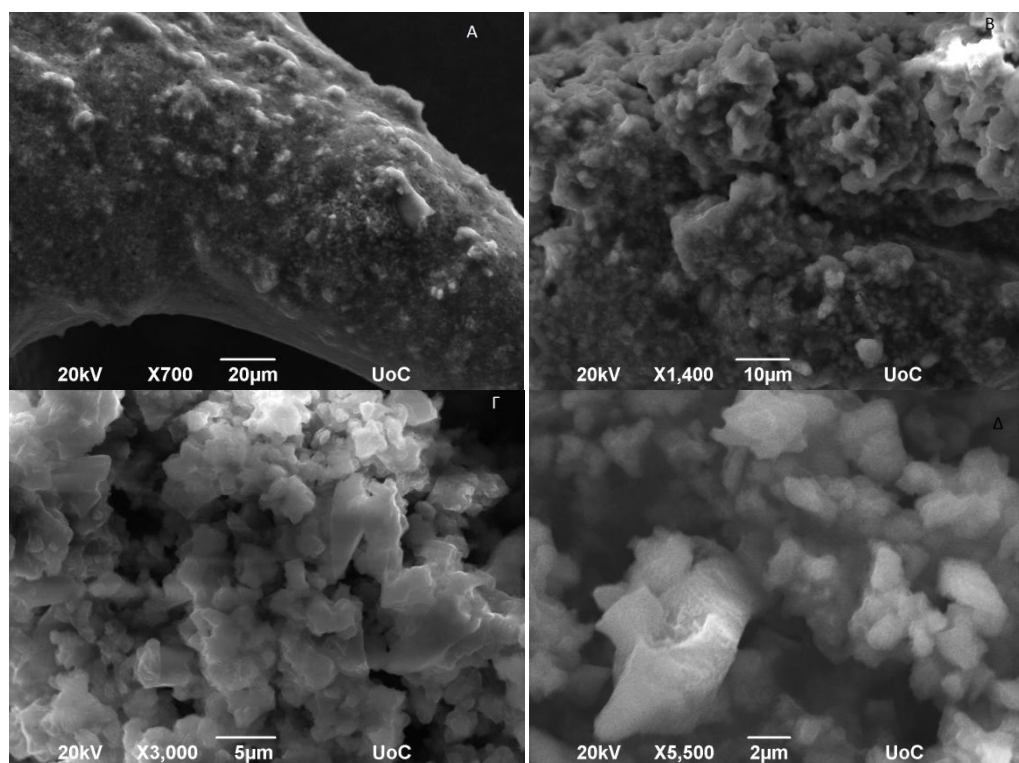
3.2 Μελέτη των σφαιριδίων στοιχειακού θείου

Το στοιχειακό θείο που απομονώθηκε μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), στοιχειακή ανάλυση (EDS), φασματομετρία μάζας MALDI-TOF και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (βλ. §2.2.3,4,5).

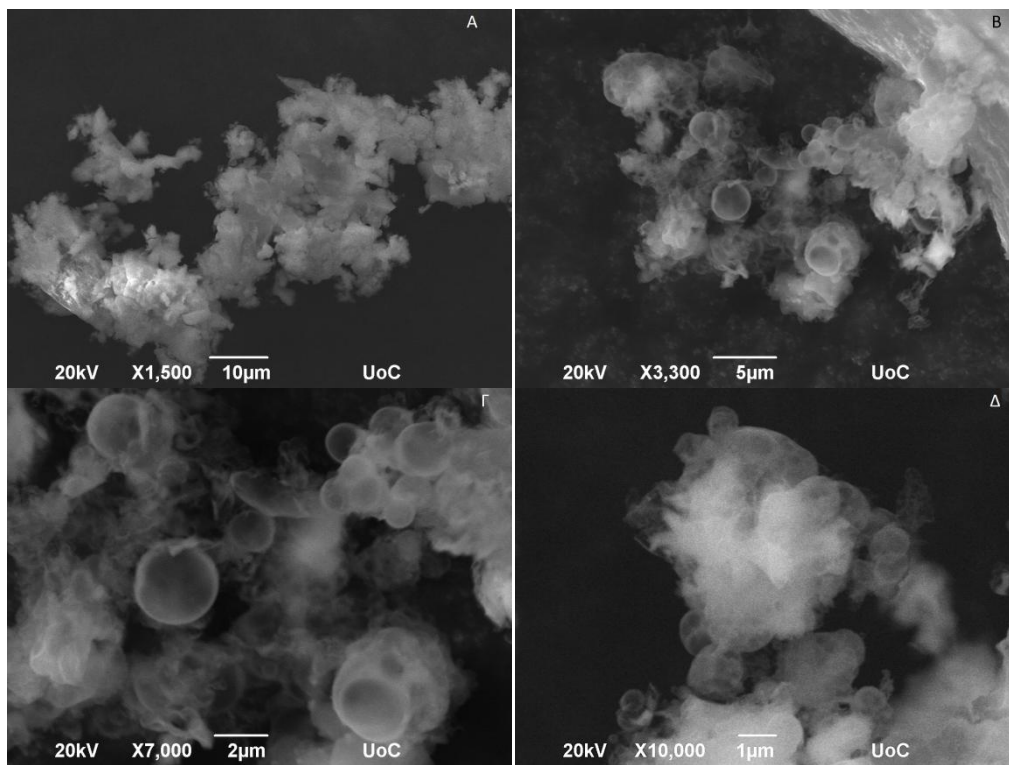


Εικόνα 3.6 Απομονομένο στοιχειακό θείο που ξεραίνεται για περαιτέρω μελέτη.

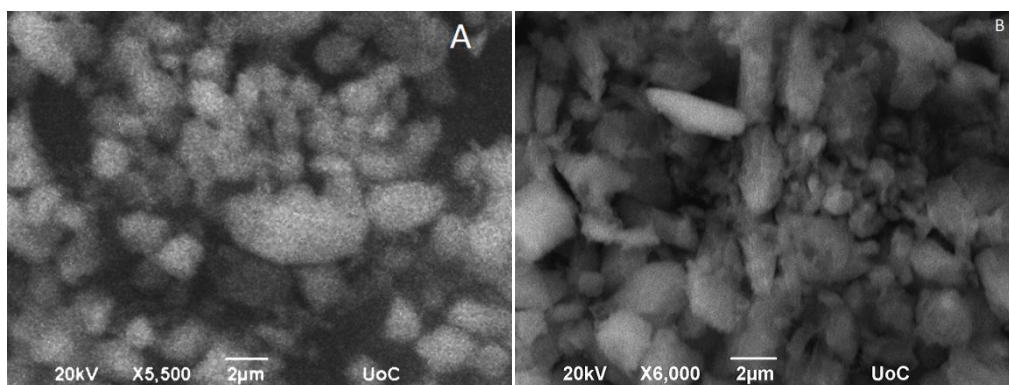
3.2.1 Μελέτη στοιχειακού θείου με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και με στοιχειακή ανάλυση (EDS)



Εικόνα 3.6 Εικόνα SEM του στοιχειακού θείου που απομονώθηκε στην στατική φάση.



Εικόνα 3.7 Εικόνες SEM στοιχειακού θείου στην εκθετική φάση.

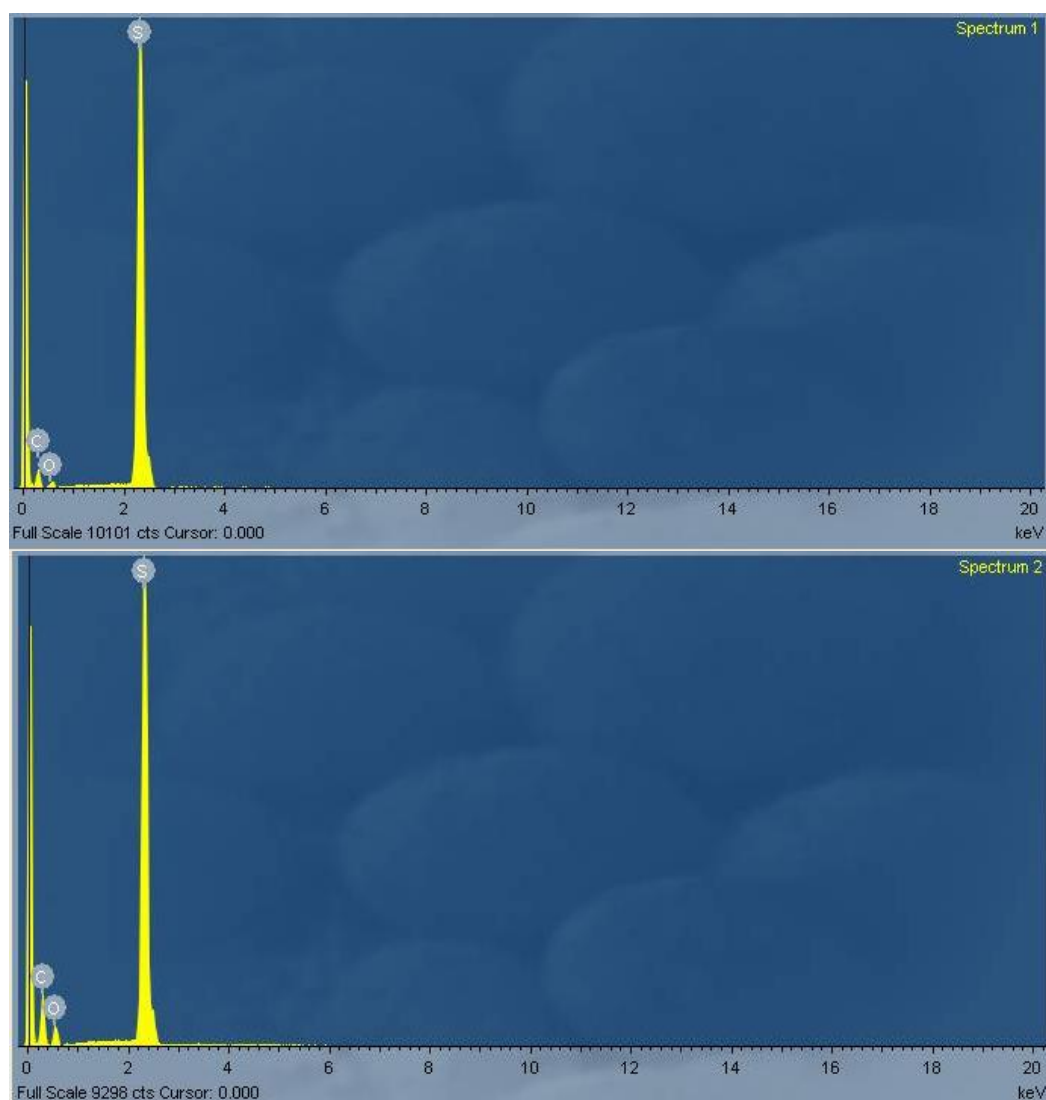


Εικόνα 3.8 Σύγκριση εικόνων SEM στοιχειακού θείου στην ίδια μεγέθυνση σε διαφορετική φάση ανάπτυξης (Α εκθετική, Β στατική).

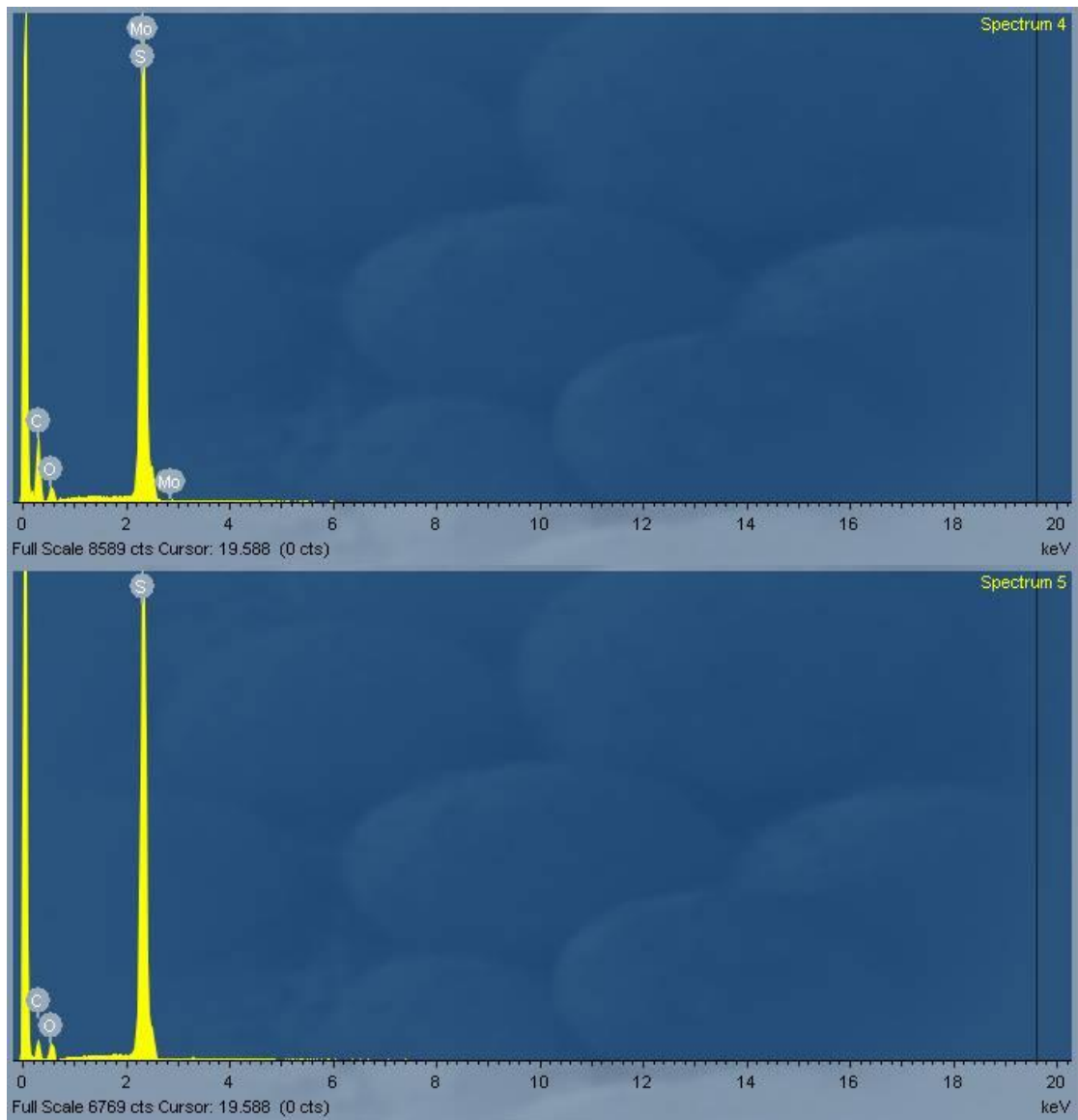
Στις **εικόνες 3.6** και **3.7** απεικονίζονται τα σφαιρίδια στοιχειακού θείου στην στατική και στην εκθετική φάση αντίστοιχα σε διάφορες μεγεθύνσεις. Ακολούθως στην **εικόνα 3.8** απεικονίζονται τα σφαιρίδια θείου στη ίδια μεγέθυνση σε διαφορετική φάση ανάπτυξης.

Σε όλες τις εικόνες παρατηρείτε ο σχηματισμός σφαιριδίων διαφόρων μεγεθών ανεξάρτητα από την φάση ανάπτυξης. Από την σύγκριση της μορφής των σφαιριδίων από κάθε φάση προκύπτει ότι στην εκθετική φάση τα σφαιρίδια είναι πιο συμπαγή και πιο σφαιρικά ενώ στην στατική λιγότερο συμπαγή και λιγότερο σφαιρικά. Γεγονός που επιβεβαιώνει ότι στην στατική φάση τα σφαιρίδια θείου αποικοδομούνται και τα κύτταρα τα χρησιμοποιούνται ως δότες ηλεκτρονίων.

Για την περαιτέρω μελέτη του παραγόμενου στοιχειακού θείου ακολούθησε στοιχειακή ανάλυση(EDS) στο κάθε δείγμα. Ακολουθούν ενδεικτικά φάσματα EDS.



Εικόνα 3.9 Ενδεικτικά φάσματα EDS στοιχειακού θείου που απομονώθηκε κατά την στατική φάση.



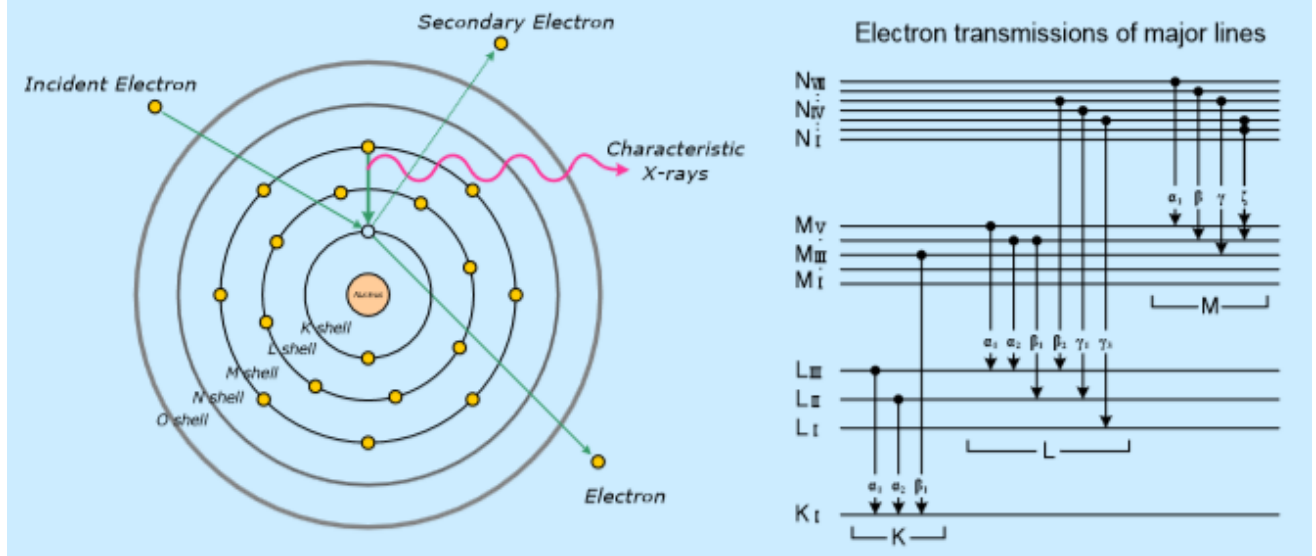
Εικόνα 3.10 Ενδεικτικά φάσματα EDS στοιχειακού θείου απομονωμένου στην εκθετική φάση.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω φάσματα το στοιχείο που κυριαρχεί σε όλα τα δείγματα είναι το θείο. Ακόμη φαίνεται να υπάρχει άνθρακας το οποίο μπορεί να οφείλεται στη χρήση ταινίας άνθρακα που τοποθετείται το δείγμα, ή σε μη καλό καθαρισμό του δείγματος ή και σε ένδειξη παρουσίας πρωτεϊνών που ίσως σχετίζονται με τη μεταφορά, δημιουργία ή μεταβολισμό των σφαιριδίων.

Όσον αφορά το μολυβδαίνιο (Mo) εκπέμπει την χαρακτηριστική του ακτινοβολία (X-Ray) ενέργειας 2,292keV, που οφείλεται στην μετάπτωση Lα και συμπίπτει με αυτή του στοιχειακού θείου ενέργειας 2,309keV της μετάπτωσης Kα (βλ. **εικόνα 3.11**).

Τέλος σε κάποια δείγματα ανιχνεύονται και μικρές ποσότητες οξυγόνου το οποίο είναι πιθανό να έχει προσβάλει το δείγμα λόγω της παρουσίας του στην ατμόσφαιρα είτε να οφείλεται σε κάποιους από τους πιθανούς λόγους που υπάρχει και η παρουσία άνθρακα (μη σωστός καθαρισμό, πρωτεΐνη).

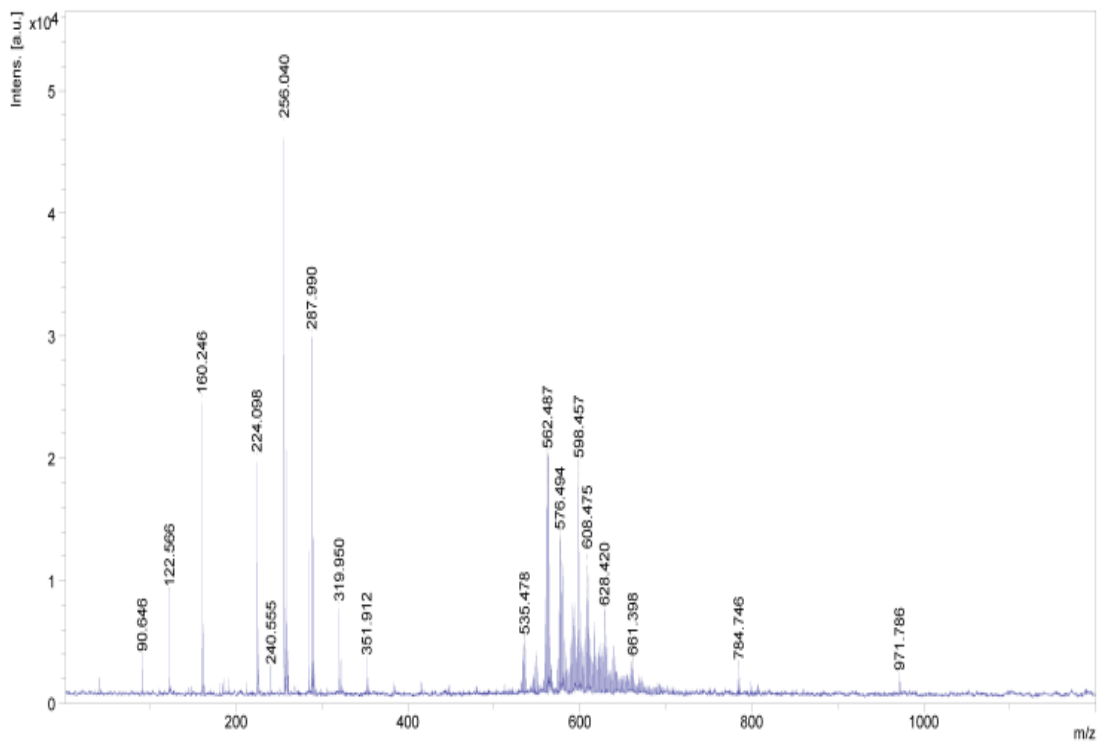
Characteristic X-rays



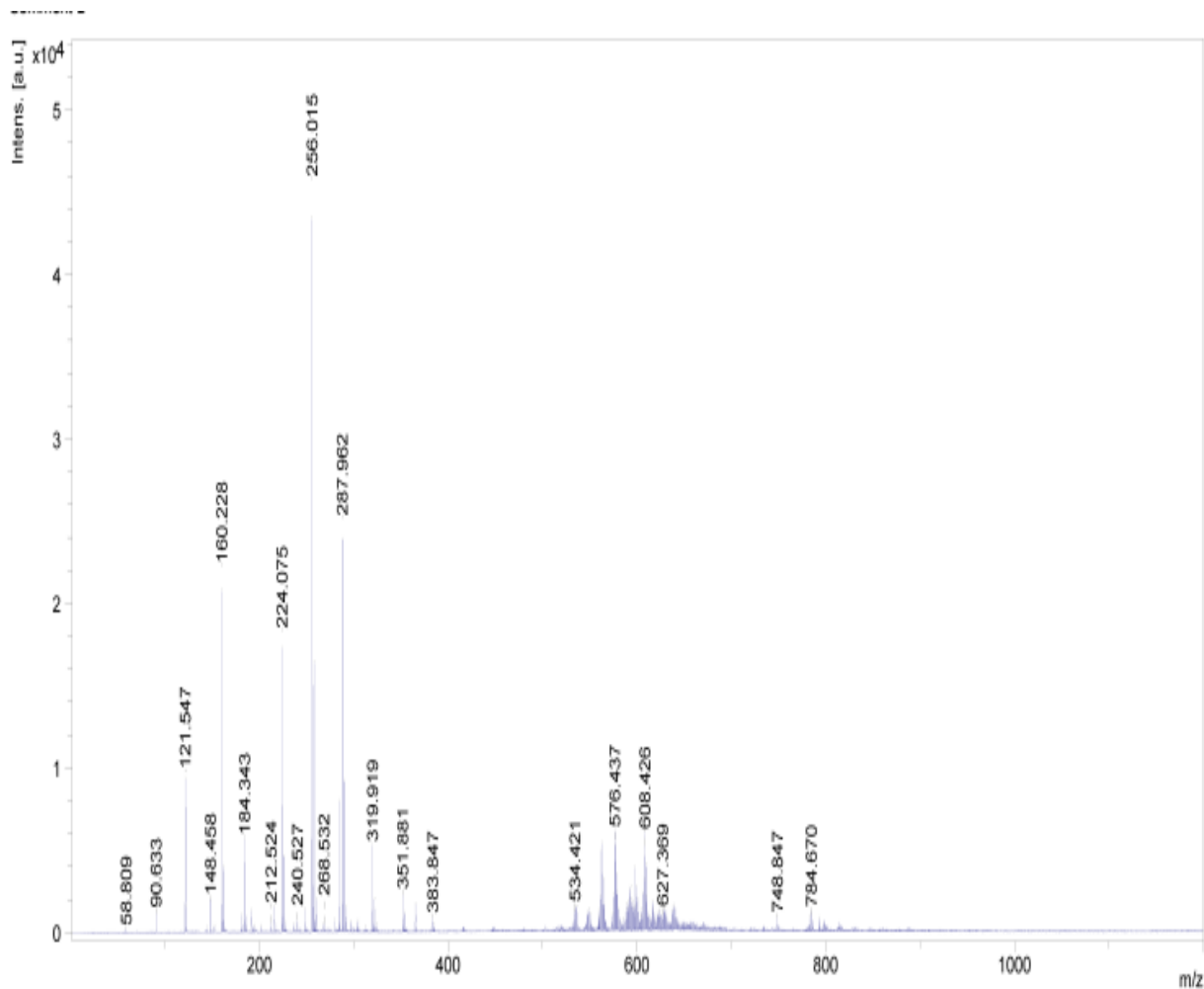
Εικόνα 3.11 Απεικόνιση χαρακτηριστικών μεταπτώσεων που εμφανίζονται στα φάσματα EDS.

3.2.2 Μελέτη των σφαιριδίων στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

Ακολουθούν τα φάσματα μάζας των παραπάνω δειγμάτων.



Εικόνα 3.12 Φάσμα μάζας στοιχειακού θείου που απομονώθηκε κατά την εκθετική φάση.



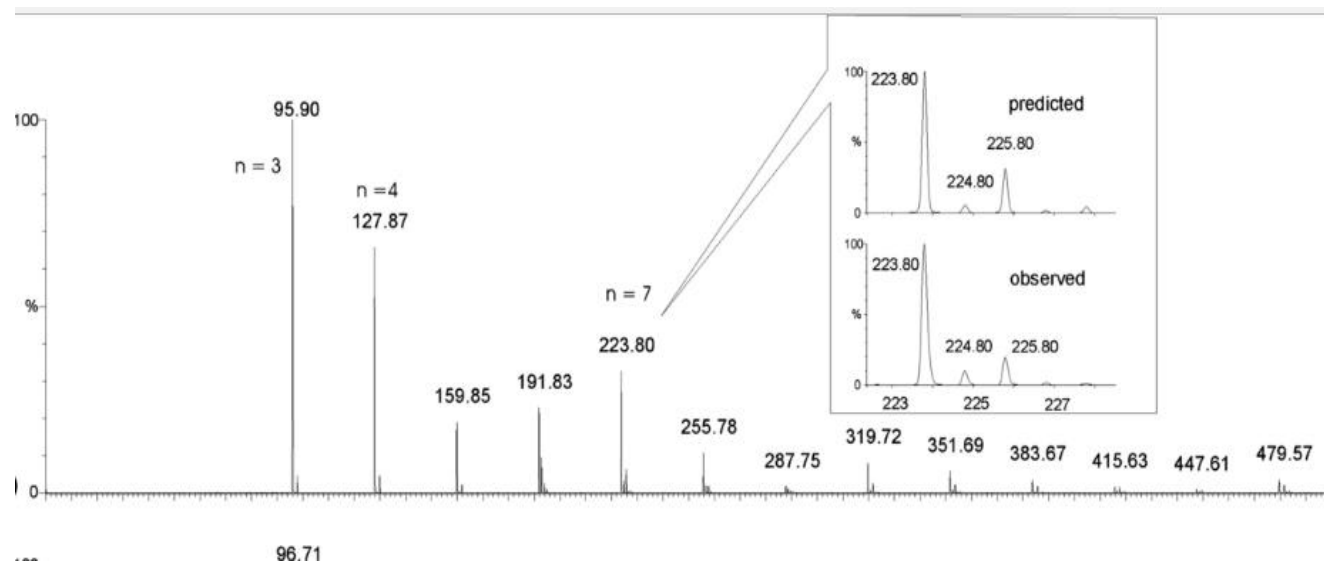
Εικόνα 3.13 Φάσμα μάζας στοιχειακού θείου που απομονώθηκε κατά την στατική φάση

Σε όλα τα παραπάνω φάσματα παρατηρήθηκαν κορυφές που αποτελούν πολλαπλάσια του στοιχειακού θείου. Οι κορυφές αυτές εμφάνισαν λόγο μάζα/φορτίο, 160(5 άτομα), 224 (7 άτομα), 256 (8 άτομα), 288(9 άτομα), 352(11 άτομα) μέχρι και 384 (12 άτομα). Ακόμα τα φάσματα παρουσίασαν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο ισοτοπικής αφθονίας, όμοιο με αυτό που εμφάνισαν δείγματα καθαρού στοιχειακού θείου στη βιβλιογραφία (εικόνα 3.14)²⁹. αυτό αποτελεί ακόμα μια απόδειξη ότι έχει γίνει επιτυχημένη απομόνωση και ότι το δείγμα περιέχει κατά κύριο λόγο στοιχειακό θείο.

Σε όλα τα φάσματα παρατηρούνται κορυφές που αντιστοιχούν από 5 έως 9 πολλαπλάσια του θείου. Όμως υπάρχουν και κορυφές που δεν αντιστοιχούν σε πολλαπλάσια του θείου και δεν έχουν αντιστοιχηθεί σε κάποιο χημικό είδος. Το μοριακό τους βάρος είναι μικρό για να γίνει αναφορά σε πεπτίδια και πιθανότατα να οφείλονται σε μη επαρκή καθαρισμό του δείγματος.

Αν παρατηρηθούν τα φάσματα που αντιστοιχούν στην εκθετική και στην στατική φάση παρατηρούνται διαφοροποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, στην εκθετική παρατηρείται ένα μοτίβο κορυφών που δεν αντιστοιχούν σε πολλαπλάσια του θείου που δίνουν αρκετά ψηλό

σήμα(κοντά στο 2) και σε ένα εύρος μαζών από 530 έως 630. Παρόμοιο μοτίβο υπάρχει και στην στατική φάση με αισθητά μικρότερο σήμα(μικρότερο του 1).



Εικόνα 3.14 Βιβλιογραφική παρατήρηση ισοτοπικού λόγου στοιχειακού θείου²⁹.

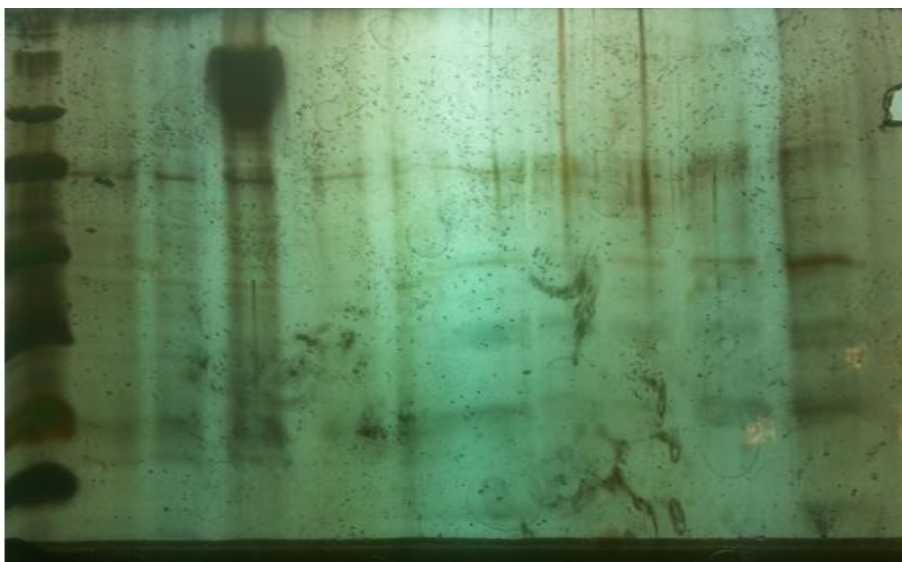
3.2.3 Μελέτη του εκκρινόμενου πρωτεόματος και των πρωτεϊνών που βρίσκονται πάνω στο στοιχειακό θείο με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν SDS-PAGE, για να φανεί αν τα πρωτόκολλα απομόνωσης λειτουργούν. Σε ορισμένα δείγματα, επειδή δεν υπήρχε η απαιτούμενη πρωτεϊνική συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε χρώση αργύρου(Silver stain).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

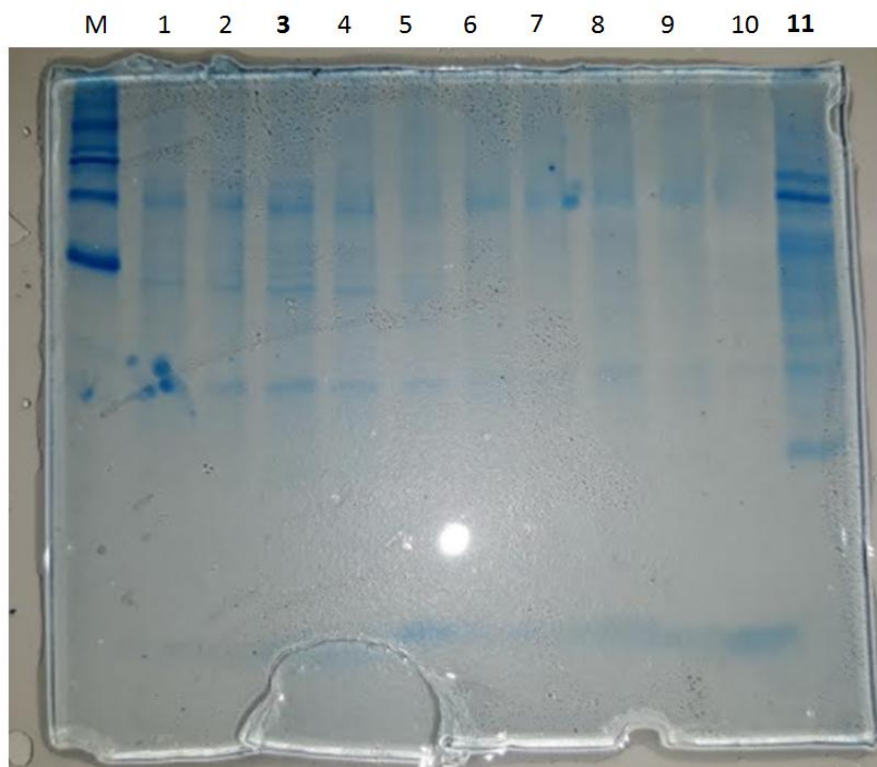


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



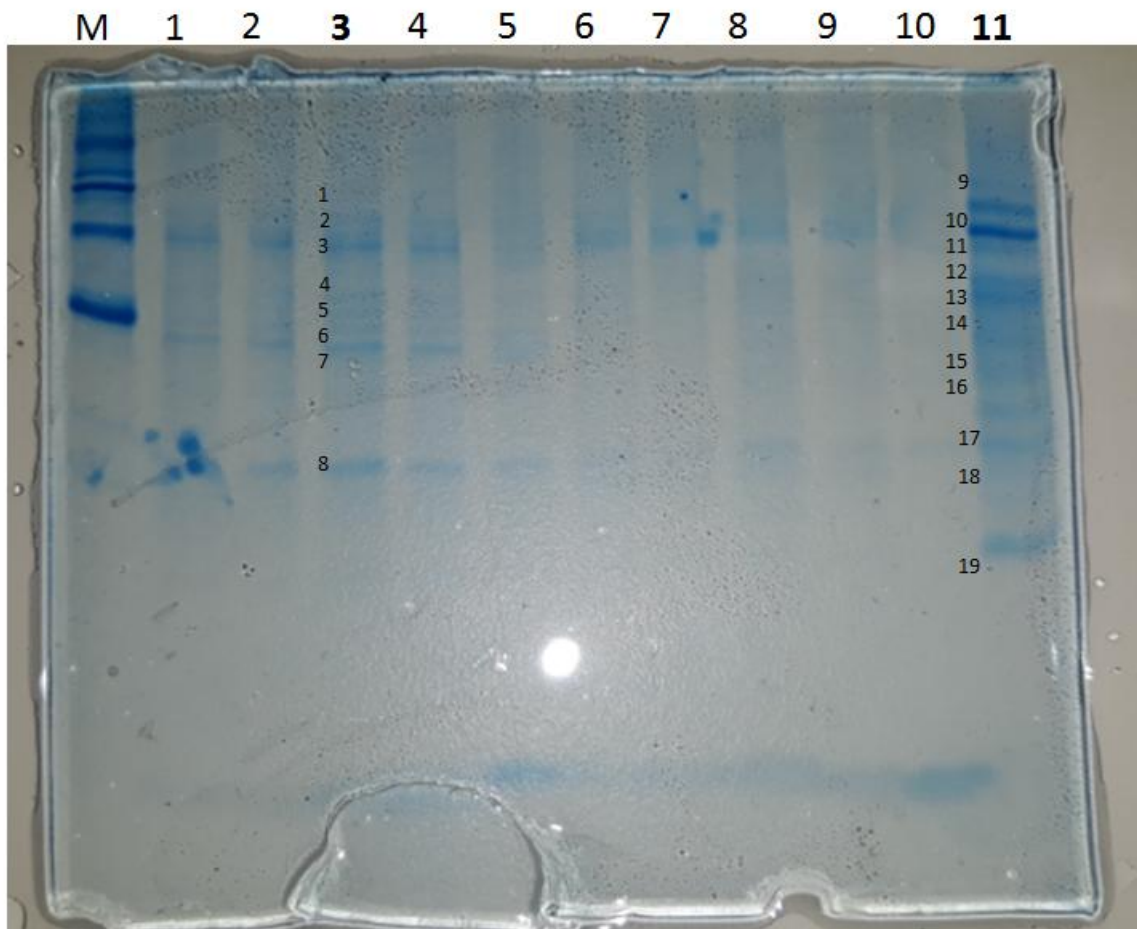
Εικόνα 3.15 SDS-PAGE πρωτεϊνικού εκχυλίσματος θείου στην στατική φάση(1-4) και εκκρινόμενου πρωτεόματος στην εκθετική(5,6) και στην στατική φάση(7-10).

Όπως φαίνεται στα παραπάνω gel η πρωτεϊνική συγκέντρωση είναι πολύ μικρή και δεν συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Bradford. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα άλατα του θρεπτικού τα οποία απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Στην συνέχεια ακολουθούν δοκιμές που έγιναν για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης πρωτεϊνών από το βιογενές θείο.

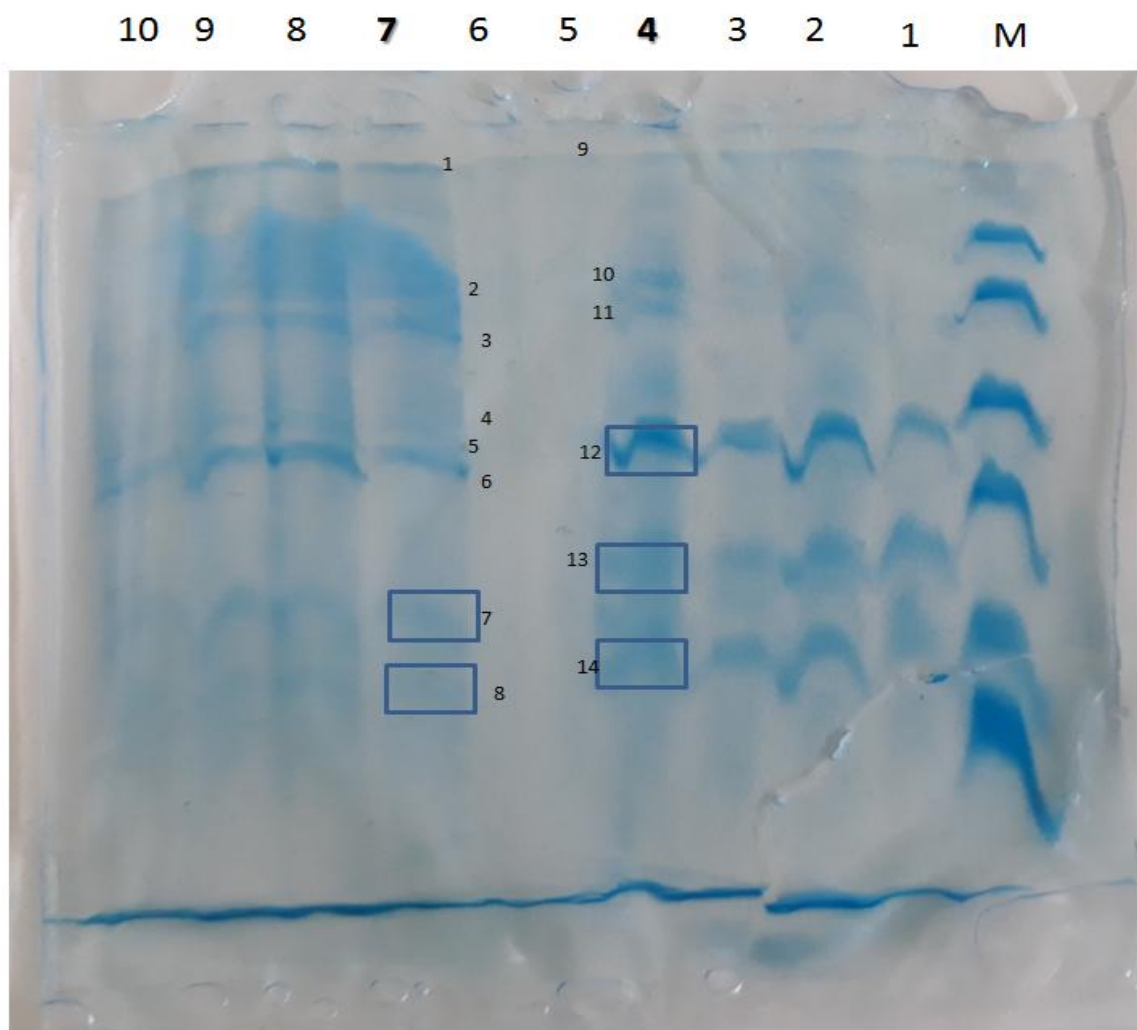


Αριθμός πηγαδιού	Περιεχόμενο
1	Θείο σε lysis buffer εκθετική
2	Θείο σε lysis buffer εκθετική
3	Θείο σε sample buffer εκθετική
4	Θείο σε sample buffer εκθετική
5	Θείο σε sample buffer mercaptoethanol free εκθετική
6	Θείο σε lysis buffer στατική
7	Θείο σε lysis buffer στατική
8	Θείο σε sample buffer στατική
9	Θείο σε sample buffer στατική
10	Θείο σε sample buffer mercaptoethanol free στατική
11	Εκκρινόμενες στατικής

Εικόνα 3.16 SDS-PAGE δοκιμές εκχύλισης πρωτεϊνών από το βιογενές θείο και πίνακας περιεχομένων(M Marker).

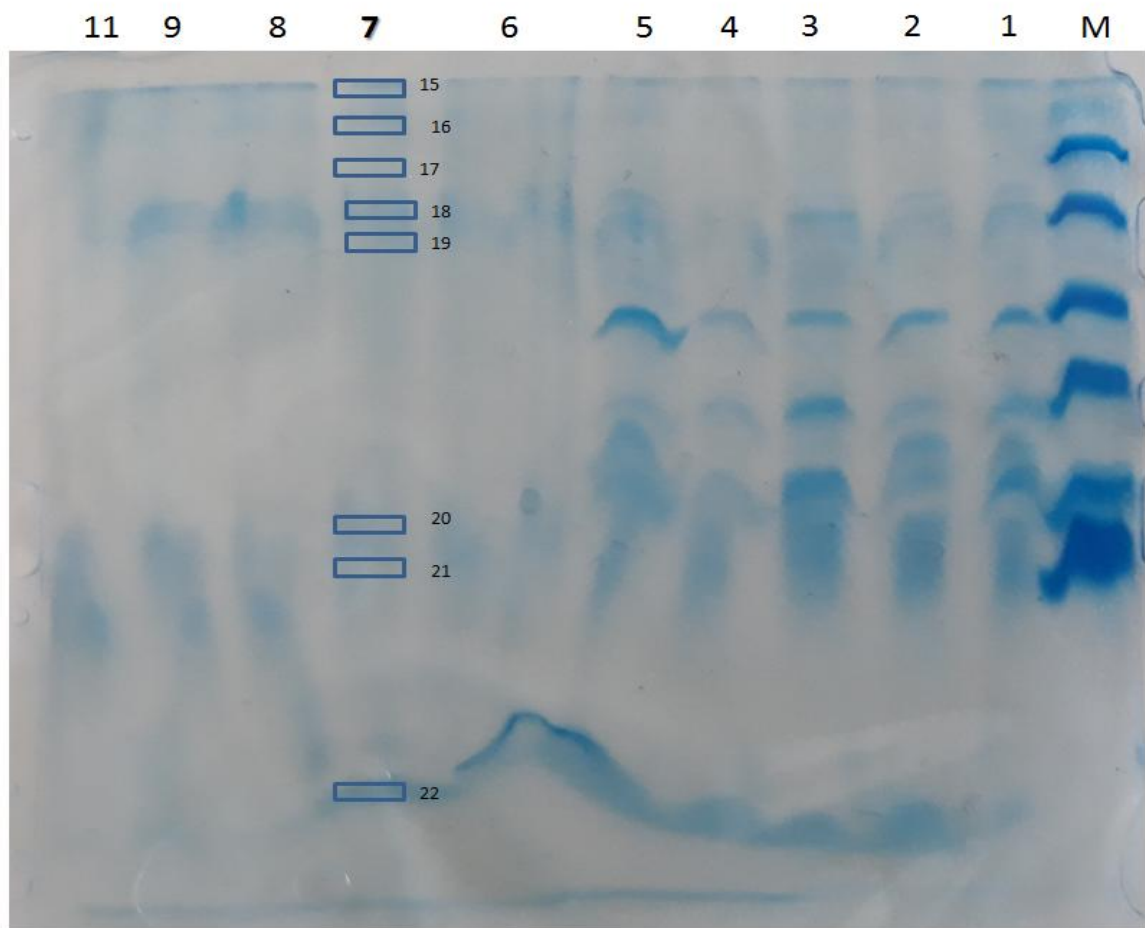


Εικόνα 3.17 Το προηγούμενο gel επεξεργασμένο με Photoshop για καλύτερη ευκρίνεια με βέλη δείχνονται οι λωρίδες που κόπηκαν για πρωτεόλυση(πηγάδια 3 και 11 θείο εκθετικής και εκκρινόμενες στατικής αντίστοιχα).



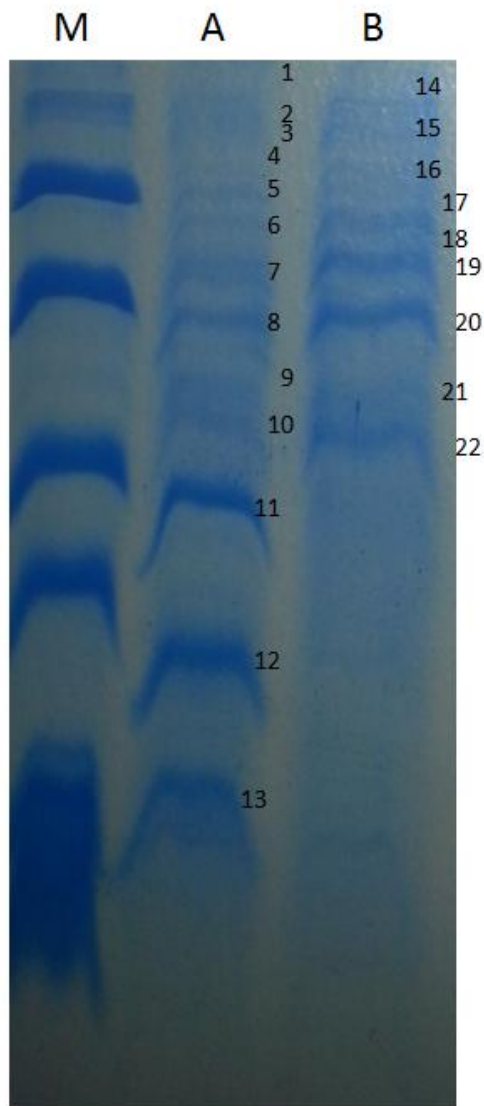
Αριθμός πηγαδιού	Περιεχόμενο
1	Εκκρινόμενες στατικής
2	Εκκρινόμενες εκθετικής
3	Εκκρινόμενες εκθετικής
4	Εκκρινόμενες εκθετικής
5	Θείο στατικής με lysis buffer
6	Θείο στατικής με lysis buffer
7	Θείο εκθετικής με lysis buffer
8	Θείο εκθετικής με lysis buffer
9	Θείο εκθετικής με lysis buffer
10	Θείο εκθετικής με lysis buffer

Εικόνα 3.18 SDS-PAGE από το οποίο κόπηκαν οι λωρίδες πηκτής από τα πηγάδια 4 και 7(εκκρινόμενες εκθετικής και θείο εκθετικής αντίστοιχα) και πίνακας περιεχομένων.



Αριθμός πηγαδιού	Περιεχόμενο
1	Εκκρινόμενες στατικής
2	Εκκρινόμενες στατικής
3	Εκκρινόμενες στατικής
4	Εκκρινόμενες στατικής
5	Εκκρινόμενες στατικής
6	Εκκρινόμενες στατικής
7	Θείο σε lysis buffer στατικής
8	Θείο σε lysis buffer στατικής
9	Θείο σε lysis buffer στατικής
10	Θείο σε lysis buffer εκθετικής
11	Θείο σε lysis buffer εκθετικής

Εικόνα 3.19 SDS-PAGE από το οποίο κόπηκαν οι πρωτεϊνικές λωρίδες από το πηγάδι 7(θείο στατικής) και πίνακας περιεχομένων.



Εικόνα 3.20 SDS-PAGE από το οποίο αναλυθηκαν οι λωρίδες πηκτής από τα πηγάδια A και B (εκκρινόμενες στατικής B και εκθετικής A συμπύκνωση με TCA).

Σημείωση: Στα παραπάνω gel κάθε πηγάδι αφορά διαφορετικό βιολογικό δείγμα.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες κόπηκαν πρωτεϊνικές λωρίδες για πρωτεόλυση από κάθε συνθήκη(εκθετική και στατικής φάση ανάπτυξης) και για διαφορετικά βιολογικά δείγματα εκκρινόμενου πρωτεόματος και πρωτεϊνικού

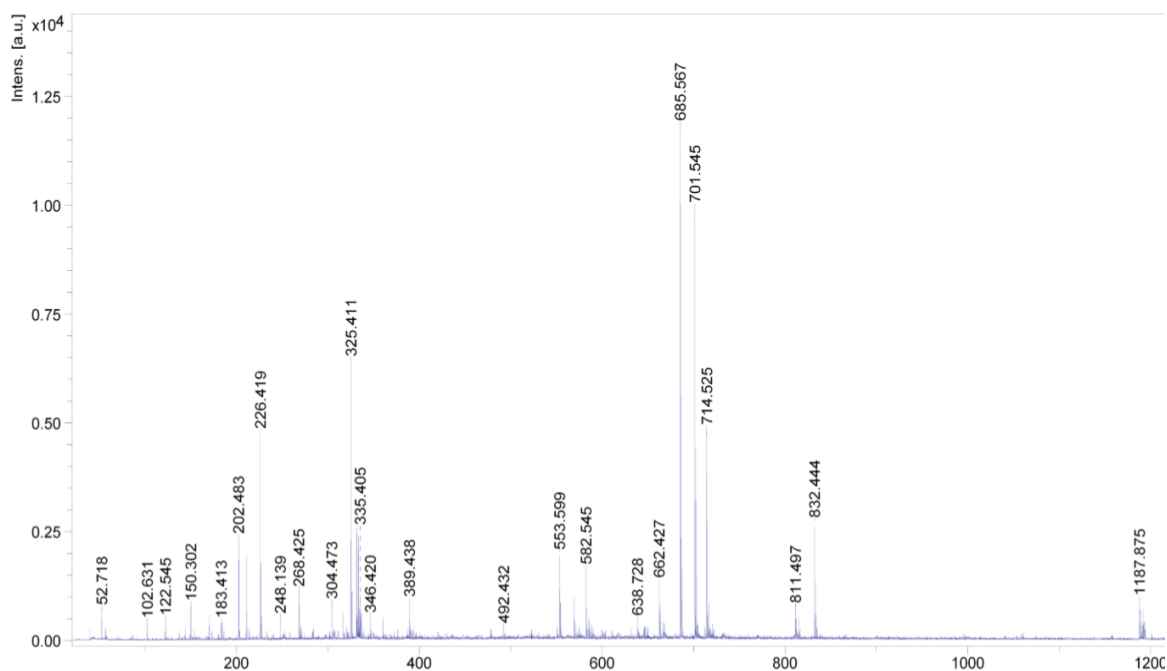
εκχυλίσματος θείου. Επειδή, δεν βρέθηκε αξιόπιστος τρόπος ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν τα τέσσερα, πιο έντονα βαμμένα gel με Coomassie G-250 που φαίνονται στις παραπάνω εικόνες.

Όσον αφορά το εκκρινόμενο πρωτόμα στην **εικόνα 3.18** οι λωρίδες **9,10** και **11** του πηγαδιού **4** (εκκρινόμενες εκθετικής), δεν φαίνονται στο πηγάδι **1** (εκκρινόμενες στατικής). Ακόμα στο gel της **εικόνας 3.20** οι λωρίδες **11, 12** και **13**, της εκθετικής φάσης δεν υπάρχουν στην στατική. Όμως επειδή δεν έχει γίνει αντιπροσωπευτική ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δεν είναι σίγουρο ότι δεν υπάρχουν οι πρωτεΐνες αυτές στην στατική φάση.

Επιπλέον, για το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το βιογενές θείο πραγματοποιήθηκε σειρά δοκιμών εκχύλισης με διαφορετικά ρυθμιστικά και φάνηκε από τα παραπάνω gel ότι το sample buffer δίνει το πιο ξεκάθαρο gel **εικόνα 3.16**. Τα gel που έγινε χρήση των άλλων δύο ρυθμιστικών παρατηρήθηκε σε ορισμένα δείγματα ανισόρροπο μέτωπο και σε μεγάλα μοριακά βάρη ένα κίτρινο στίγμα που ύστερα από την εκάστοτε χρώση βαφόταν μπλε ή μαύρο στην Coomassie G250 και στο Silver stain αντίστοιχα. Πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης επιτεύχθηκε με τη χρήση Lysis Buffer. Όσον αφορά το συγκεκριμένο υποπρωτόμα η διαφοροποίηση των πρωτεϊνών ανάμεσα στις δύο φάσεις φαίνεται στην **εικόνα 3.16**. Στο συγκεκριμένο gel είναι εμφανές ότι οι λωρίδες **4,5,6** και **7** της εκθετικής φάσης δεν υπάρχουν στην στατική. Συνεπώς υπάρχει πιθανότητα, ο αριθμός των πρωτεϊνών που βρίσκονται προσδεμένες πάνω στα σφαιρίδια του στοιχειακού θείου να σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια.

Για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών αποκόπηκαν 63 πρωτεϊνικές λωρίδες συνολικά από τις πηκτές στις **εικόνες 3.16-20**. Από αυτές ταυτοποιήθηκαν οι 6 και παρίστανται στον **πίνακα A** (βλ. παράρτημα).

Τέλος, κόπηκε άλλο ένα κομμάτι του gel που πιθανολογείται (βλ. εικόνα 3.18 κομμάτι ανάμεσα στα πηγάδια 7 και 8) ότι ήταν σφαιρίδια στοιχειακού θείου, διότι παρουσιάζεται μόνο σε πηγάδια που φορτώνονται δείγματα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στοιχειακού θείου και σε μεγάλα μοριακά βάρη. Για αυτό ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4 και καταγράφηκε το παρακάτω φάσμα LDI-TOF .



Εικόνα 3.21 LDI-TOF κίτρινου κοματιού από τα gel.

Από το παραπάνω φάσμα φαίνεται ότι υπάρχει βιογενές θείο σε αυτό το δείγμα, διότι αν το συγκρίνουμε με το βιβλιογραφικό μοτίβο του θείου (βλ. **εικόνα 3.16**) όσον αφορά τα πολλαπλάσια του θείου που έχουν και το επιθυμητό μοτίβο είναι: 6(202,483) , **10((325,411))**, 12(389,438), 17(553,599), 20(638,728). Από αυτά την μεγαλύτερη αφθονία την έχει το θραύσμα που χαρακτηρίζεται από την κορυφή **325,411 m/z** .

4 Συμπεράσματα-Προοπτικές

4.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης του *Chlorobaculum terpidum* σε θρεπτικό με Na_2S 7,7mM και $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 8mM. Επιπλέον μελετήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης των μεταβολιτών: στοιχειακού θείου και θειικών ιόντων. Η ανάπτυξη και το στοιχειακό θείο μελετήθηκαν φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού ενώ τα θειικά ιόντα με ιοντική χρωματογραφία.

Με τα δεδομένα των **εικόνων 3.3** και **3.4** προσδιορίστηκαν οι ώρες που χρειάζεται μια καλλιέργεια για να φτάσει στην εκθετική και στη στατική φάση. Πιο συγκεκριμένα, από 0-10h η καλλιέργεια βρίσκεται σε λανθάνουσα φάση, από 10-32h σε εκθετική, από 32-48h παρατηρείται πτώση της βακτηριοχλωροφύλλης και του στοιχειακού θείου και από 48h και άνω σταθεροποιούνται, άρα βρίσκεται στη στατική φάση.

Τέλος οι ώρες που επιλέχθηκαν για την μελέτη του εκκρινόμενου πρωτεόματος είναι 30h για την εκθετική και 48h για τη στατική. Ενώ οι καταλληλότερες για τη μελέτη του στοιχειακού θείου είναι 24h για την εκθετική και 48h για την στατική φάση.

4.2 Μελέτη του απομονωμένου στοιχειακού θείου

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την καλύτερη και αποδοτικότερη απομόνωση των εκκρινόμενων σφαιριδίων στοιχειακού θείου(βλ. §2.2.3). Στην συνέχεια τα σφαιρίδια μελετήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία και φασματομετρία μάζας(βλ. § 2.2.4). Οι τεχνικές αυτές πληροφορούν για την περιεκτικότητα σε στοιχειακό θείο την καθαρότητα και την μορφολογία του δείγματος σε συνδυασμό με την στοιχειακή ανάλυση.

Από την παρατήρηση των σφαιριδίων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προκύπτει ότι υπάρχει μικρή διαφοροποίηση στην μορφολογία των σφαιριδίων του θείου. Πιο συγκεκριμένα στην εκθετική φάση τα σφαιρίδια είναι πιο συμπαγή ενώ στην στατική φάση λιγότερο, γεγονός που συμφωνεί με το προτεινόμενο μοντέλο μεταβολισμού του, βάση το οποίο μόλις εξαντληθεί κάποια πηγή θείου το βακτήριο χρησιμοποιεί τα σφαιρίδια στοιχειακού θείου ως ηλεκτρονιοδότη. Τα μεγέθη των σφαιριδίων είναι ποικίλα σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνούσαν το μέγεθος των κυττάρων (μεγαλύτερα από 10μm).

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των σφαιριδίων με φασματομετρία μάζας οι κορυφές που παρατηρήθηκαν και στην εκθετική και στην στατική φάση δείχνουν ότι αντιστοιχούν σε πολλαπλάσια του ατομικού βάρους του θείου. Το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα το έδωσε η μεθανόλη. Παρατηρήθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε 5 έως 9 άτομα θείου με βάση το βιβλιογραφικό μοτίβο του θείου και σε μερικές περιπτώσεις υπήρξε κορυφή που αντιστοιχεί σε 12 άτομα θείου. Ακόμα στην εκθετική παρατηρείτε ένα μοτίβο κορυφών που δεν αντιστοιχούν σε πολλαπλάσια του θείου που δίνουν αρκετά ψηλό σήμα(κοντά στο 2) και σε ένα εύρος μαζών από 530 έως 630. Παρόμοιο μοτίβο υπάρχει και στην στατική φάση με αισθητά μικρότερο σήμα(μικρότερο του 1).

Τέλος έγινε προσπάθεια διαχωρισμού και ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που είναι προσδεμένες στα σφαιρίδια θείου(βλ. §2.2.5). Επειδή δεν βρέθηκε κατάλληλος τρόπος ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εκχύλισης με διαφορετικά ρυθμιστικά. Από αυτές προκύπτει ότι την πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση την κάνει το Lysis Buffer ενώ τον καλύτερο διαχωρισμό σε πηκτή το Sample Buffer. Όσον αφορά την ταυτοποίηση δεν ήταν δυνατή, πιθανόν λόγω χαμηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.

4.3 Μελέτη του εκκρινόμενου πρωτεόματος

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στην εκθετική και στην στατική φάση (βλ. §2.2.6). Από την πηκτή στην **εικόνα 3.20** οι λωρίδες **11, 12** και **13**, της εκθετικής φάσης δεν υπάρχουν στην στατική. Όμως επειδή δεν έχει γίνει αντιπροσωπευτική ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δεν είναι σίγουρο ότι δεν υπάρχουν οι πρωτεΐνες αυτές στην στατική φάση.

Πιθανόν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος να απορροφούν και τα άλατα του θρεπτικού. Συνεπώς για την καλύτερη ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης προτείνεται να δοκιμαστεί πρωτόκολλο αφαλάτωσης (π.χ. dialysis) και ύστερα να γίνει η ποσοτικοποίηση.

Τέλος οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν είτε κυτταροπλασματικές είτε περιπλασματικές. Αυτό σημαίνει ότι το πρωτόκολλο απομόνωσης χρειάζεται βελτιστοποίηση και πιθανόν να μην εκκρίνει πρωτεΐνες σε συγκεντρώσεις μη ανιχνεύσιμες από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους βρίσκονται στον **πίνακα Α(βλ. παράρτημα)**.

4.4 Μελλοντικοί στόχοι- Προοπτικές

Με την παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ο μεταβολισμός του θείου στο *Chlorobaculum teridum*. Προτείνεται η χρήση φασματομετρίας με ηλεκτροψεκασμό, που παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία. Ακόμα όσον αφορά την ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, για μεγαλύτερη αξιοπιστία στην μέτρηση προτείνεται πριν από αυτήν να πραγματοποιείται αφαλάτωση του δείγματος.

Τέλος ένας επιπλέον στόχος είναι να δοκιμαστεί αν το βακτήριο μπορεί να αναπτύσσεται παρουσία υδρογονανθράκων. Επίσης ο οργανισμός θα μπορούσε να βοηθήσει στην διαδικασία αποθείωσης των βιομηχανικών αποβλητών.

5 Βιβλιογραφία

- (1) Rabinowitch, E. Photosynthesis and Energy Transfer. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61* (7), 870–878.
- (2) Gest, H.; Blankenship, R. E. Time Line of Discoveries: Anoxygenic Bacterial Photosynthesis. In *Photosynthesis Research*; 2004; Vol. 80, pp 59–70.
- (3) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Stahl, D. A.; Clark, D. P. *Brock Biology of Microorganisms, 13th Edition*; 2012.
- (4) Bryant, D. A.; Frigaard, N. U. Prokaryotic Photosynthesis and Phototrophy Illuminated. *Trends in Microbiology*. 2006, pp 488–496.
- (5) Imhoff, J. F.; Govindjee; Amesz, J.; Barber, J.; Blankenship, R. E.; Murata, N.; Ogren, W. L.; Ort, D. R.; Kiel, D. U.; Weg, D. Chapter 1 Taxonomy and Physiology of Phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*; 2004; Vol. 2, pp 1–15.
- (6) Wahlund, T. M.; Woese, C. R.; Castenholz, R. W.; Madigan, M. T. A Thermophilic Green Sulfur Bacterium from New Zealand Hot Springs, *Chlorobium Tepidum* Sp. Nov. *Arch. Microbiol.* **1991**, *156* (2), 81–90.
- (7) Eisen, J. A.; Nelson, K. E.; Paulsen, I. T.; Heidelberg, J. F.; Wu, M.; Dodson, R. J.; Deboy, R.; Gwinn, M. L.; Nelson, W. C.; Haft, D. H.; et al. The Complete Genome Sequence of *Chlorobium Tepidum* TLS, a Photosynthetic, Anaerobic, Green-Sulfur Bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (14), 9509–9514.
- (8) Bugg, T. D. H.; Braddick, D.; Dowson, C. G.; Roper, D. I. Bacterial Cell Wall Assembly: Still an Attractive Antibacterial Target. *Trends in Biotechnology*. 2011, pp 167–173.
- (9) Kudryashev, M.; Aktoudianaki, A.; Dedoglou, D.; Stahlberg, H.; Tsiotis, G. The Ultrastructure of *Chlorobaculum Tepidum* Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837* (10), 1635–1642.
- (10) Pšenčík, J.; Ikonen, T. P.; Laurinmäki, P.; Merckel, M. C.; Butcher, S. J.; Serimaa, R. E.; Tuma, R. Lamellar Organization of Pigments in Chlorosomes, the Light Harvesting Complexes of Green Photosynthetic Bacteria. *Biophys. J.* **2004**, *87* (2), 1165–1172.
- (11) Bryant, D. A.; Liu, Z. Green Bacteria. Insights into Green Bacterial Evolution through Genomic Analyses. *Adv. Bot. Res.* **2013**, *66*, 99–150.
- (12) Hauska, G.; Schoedl, T.; Remigy, H.; Tsiotis, G. The Reaction Center of Green Sulfur Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2001**, *1507* (1–3), 260–277.
- (13) Jagannathan, B.; Golbeck, J. H. Unifying Principles in Homodimeric Type I

- Photosynthetic Reaction Centers: Properties of PscB and the FA, FB and FX Iron-Sulfur Clusters in Green Sulfur Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2008**, *1777* (12), 1535–1544.
- (14) Holkenbrink, C.; Barbas, S. O.; Mellerup, A.; Otaki, H.; Frigaard, N. U. Sulfur Globule Oxidation in Green Sulfur Bacteria Is Dependent on the Dissimilatory Sulfite Reductase System. *Microbiology* **2011**, *157* (4), 1229–1239.
- (15) Rodriguez, J.; Hiras, J.; Hanson, T. E. Sulfite Oxidation in *Chlorobaculum Tepidum*. *Front. Microbiol.* **2011**, *2* (MAY).
- (16) Eddie, B. J.; Hanson, T. E. *Chlorobaculum Tepidum* TLS Displays a Complex Transcriptional Response to Sulfide Addition. *J. Bacteriol.* **2013**, *195* (2), 399–408.
- (17) Marnocha, C. L.; Levy, A. T.; Powell, D. H.; Hanson, T. E.; Chan, C. S. Mechanisms of Extracellular S₀ Globule Production and Degradation in *Chlorobaculum tepidum* via Dynamic Cell-Globule Interactions. *Microbiology* **2016**, *162* (7), 1125–1134.
- (18) Hanson, T. E.; Bonsu, E.; Tuerk, A.; Marnocha, C. L.; Powell, D. H.; Chan, C. S. *Chlorobaculum Tepidum* Growth on Biogenic S(0) as the Sole Photosynthetic Electron Donor. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18* (9), 2856–2867.
- (19) Prange, A.; Chauvistré, R.; Modrow, H.; Hormes, J.; Trüper, H. G.; Dahl, C. Quantitative Speciation of Sulfur in Bacterial Sulfur Globules: X-Ray Absorption Spectroscopy Reveals at Least Three Different Species of Sulfur. *Microbiology* **2002**, *148* (1), 267–276.
- (20) Friedrich, C. G. *Physiology and Genetics of Sulfur-Oxidizing Bacteria.*; 1998; Vol. 39.
- (21) Frigaard, N. U.; Dahl, C. Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 2008, pp 103–200.
- (22) James, P. Protein Identification in the Post-Genome Era: The Rapid Rise of Proteomics. *Q. Rev. Biophys.* **1997**.
- (23) Stanier, R. Y.; Smith, J. H. C. The Chlorophylls of Green Bacteria. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41* (3), 478–484.
- (24) Link, A. J.; LaBaer, J. In-Gel Trypsin Digest of Gel-Fractionated Proteins. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, *4* (2).
- (25) Feist, P.; Hummon, A. B. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, pp 3537–3563.
- (26) Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*; 2010; Vol. 53.
- (27) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Skoog and West's Fundamentals of Analytical Chemistry. In *Skoog and West's Fundamentals of Analytical Chemistry*; 2014; p 931.
- (28) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (29) Kruegel, A.; Attygalle, A. B. Elemental Sulfur as a Versatile Low-Mass-Range Calibration Standard for Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (1), 112–116.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Α Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες και οι ιδιότητές τους

Title	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Protein MW	Method	pI-Value	Server Result File	Accession	topology
chaperonin GroEL [Chlorobium tepidum TLS]	111	95	11	58044	Chloro_NCBI_5 Oppm	5,1	../data/20180518/F006916.dat	gi 21673365	cytoplasmic
hypothetical protein CT1804 [Chlorobium tepidum TLS]	145	88	7	42898	Chloro_NCBI_5 Oppm	5,5	../data/20180518/F006918.dat	gi 21674618	outer membrane
hemagglutinin-related protein [Chlorobium tepidum TLS]	85	73	19	22132	Chloro_NCBI_5 Oppm	4,6	../data/20180518/F006919.dat	gi 21672909	periplasmic
outer surface protein, putative [Chlorobium tepidum TLS]	103	94	13	20101	Chloro_NCBI_5 Oppm	5,5	../data/20180518/F006920.dat	gi 21674953	extracellular
hypothetical protein CT1804 [Chlorobium tepidum TLS]	157	146	11	42898	Chloro_NCBI_5 Oppm	5,5	../data/20180518/F006921.dat	gi 21674618	outer membrane
outer surface protein, putative [Chlorobium tepidum TLS]	28	11	8	20101	Chloro_NCBI_5 Oppm	5,5	../data/20180518/F006926.dat	gi 21674953	extracellular