ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ του Αλέξιου Ψυχικού (AM 1856)

Μελέτη της επίδρασης ηλεκτρικής τάσεως στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθ. Κυριάκος Κοτζάμπασης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
Α1. Φωτοσυνθετικός μηχανισμός - Μοριακή δομή και λειτουργία	6
Α1.1. Ρόλος και λειτουργία κύριων πρωτεϊνικών συμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού	6
Α1.2. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων	7
Α1.3. Μοριακή δομή και λειτουργία κύριων ηλεκτρονιομεταφορέων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων	8
Α2. Προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καταπονήσεις	14
Α2.1. Φωτόσταση	14
Α2.2. Φαινοτυπική πλαστικότητα	15
Α2.2.1. Παραδείγματα φαινοτυπικής σε παρατεταμένες περιβαλλοντικέ μεταβολές	ς 16
Α2.2.2. Παραδείγματα φαινοτυπικής σε βραχυπρόθεσμες περιβαλλοντι μεταβολές	κές 17
Α2.3. Αλληλεπίδραση φωτοσυνθετικού μηχανισμού και περιβάλλοντος	19
Α3. Σκοπός	22
Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
Β1. Οργανισμός	23
Β2. Εκτίμηση κυτταρικού όγκου	25
B3. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού - καταγραφή της μοριακής δομή λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού	ς και 25
Β4. Πολαρογραφικές μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητ αναπνοής	τας και 30
Β5. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (Η₂) με Αέρια Χρωματογ Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)	φαφία 30
Β6. Υπόθεση εργασίας - Πειραματικός σχεδιασμός	31
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34

Γ1. Επιλογή βέλτιστης ασκούμενης τάσης (Volt)	34
Γ2. Επίδραση περιεκτικότητας ιόντων του διαλύματος	42
Γ3. Μοντέλο συμβατότητας της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων με τη τεχι ροή ηλεκτρονίων ενός ηλεκτρικού πεδίου	νική 47
Γ4. Εφαρμογή τάσης σε πλήρως σκοτεινό διάλυμα	49
Γ5. Η συμβατότητα φωτοσυνϑετικής και τεχνικής ροής ηλεκτρονίων οδηγεί σα μηχανισμό υψηλής παραγωγής υδρογόνου (Η₂)	ε 51
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>

Η συγκεκριμένη εργασία ανέδειξε τη δυνατότητα συντονισμού της ενδογενούς ηλεκτρονικής ροής της φωτοσυνθετικής διαδικασίας με μια εξωτερική πηγή ροής ηλεκτρονίων (έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο) καθώς και των μεταβολών που προκαλούνται στη μοριακή δομή, λειτουργία και οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Προκειμένου να μελετηθεί το φαινόμενο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειραματικές προσεγγίσεις διαφορετικών ηλεκτρικών τάσεων οι οποίες ασκήθηκαν σε καλλιέργειες με διαφορετική ιοντική ισχύ του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliguus. Όλα τα πειράματα ανέδειξαν μία πολυεπίπεδη πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να προσαρμόζει τη μοριακή του δομή και λειτουργία ανάλογα με τις συνθήκες έκθεσης του στο περιβάλλον. Η δυνατότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να μεταφέρει (εξω)ηλεκτρόνια (ηλεκτρόνια ενός ηλεκτρικού πεδίου) μέσω φωτοσυνθετικών οξειδοαναγωγικών τεχνητού αντιδράσεων [κυρίως μέσω του οξειδωμένου κέντρου αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ (P₆₈₀⁺)], όσο και η υψηλή προσαρμοστικότητα (συμβατότητα) που ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εμφάνισε σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικής τάσης ηλεκτρικού φορτίου, παρουσιάζεται για πρώτη φορά και ανοίγει νέους δρόμους για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως μεγάλη και γρήγορη παραγωγή μοριακού υδρογόνου (Η₂) μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Για να επιβεβαιώσουμε/παρατηρήσουμε καλύτερα την επίδραση της ηλεκτρικής τάσης στην λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε κλειστό σύστημα με τελικό αποδέκτη της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων την υδρογενάση που παράγει H₂. Σε καλλιέργειες που περιέχουν ζωντανά κύτταρα παρουσιάζεται ως και 70% περαιτέρω αύξηση στην παραγωγή H₂ συγκριτικά με την αντίστοιχη που δεν περιέχει ζωντανά κύτταρα (παραγωγή H2 αποκλειστικά από τη χημική υδρόλυση του νερού) και ανοίγει νέες προοπτικές για γρήγορη (μέσα σε λίγες ώρες) και μεγάλη βιοτεχνολογική παραγωγή υδρογόνου χαμηλού κόστους.

ABSTRACT

The current thesis revealed the ability of the photosynthetic apparatus to correlate the internal photosynthetic e⁻ flow with an external e⁻ flow (provided by an electrical field) as well as the differentiations caused to the molecular structure, function and performance of the photosynthetic apparatus by exposure to an electrical field. In order to study this phenomenon a series of experimental treatments were carried out by applying different electrical voltages to cell cultures with differential ionic strength of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. All the assays have shown a multilevel plasticity of the photosynthetic apparatus in order to adapt to this new environment by changing its molecular structure and functions. The ability of the photosynthetic apparatus to transfer external electrons, which are provided by an electrical field, through the photosynthetic electron transfer chain [primarily through the oxidised PSII (P_{680}^+)], in combination with the ability of the photosynthetic apparatus of algae to adapt in a wide range of electrical voltages, constitute a pioneer idea that paves the way for innovative biotechnological applications such as a fast and high yield H₂ production via photosynthesis.

For better understanding the impact of electrical field on the function of the photosynthetic apparatus, a series of assays were carried out in closed systems to use the enzyme hydrogenase as final acceptor of the photosynthetic electron flow in order to produce molecular hydrogen (H₂). Cultures with living microalgae placed in airtight beakers, under the effects of an electrical field displayed up to 70% increase in H₂ production compared to the corresponding one without living cells (H₂ production through chemical water electrolysis). The compatibility of electron flow in an electrical field with the photosynthetic electron flow paves the way for an innovative biotechnological process for a large scale, fast and low cost H₂ production.

<u>Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>

<u>Α1. Φωτοσυνθετικός μηχανισμός - Μοριακή δομή και</u> <u>λειτουργία</u>

<u>Α1.1. Ρόλος και λειτουργία κύριων πρωτεϊνικών συμπλόκων του</u> φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Η οξυγονική φωτοσύνθεση, δηλαδή η μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια από τα φυτά, τα χλωροφύκη και τα κυανοβακτήρια, υποστηρίζει την επιβίωση όλων των ανώτερων μορφών ζωής στον πλανήτη γη. Η παραγωγή του οξυγόνου καθώς και η μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα σε οργανική ύλη καθορίζει σε ένα μεγάλο βαθμό την σύσταση της ατμόσφαιρας και παρέχει την απαραίτητη ενέργεια σε όλες της μορφές ζωής. Η φωτοσύνθεση στους φυτικούς οργανισμούς επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων η πλειονότητα των οποίων πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, συγκεκριμένα στις μεμβράνες των θυλακοειδών, και περιλαμβάνουν την οξείδωση του νερού, την αναγωγή του NADP⁺ και τον σχηματισμό ATP. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αποτελείται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, το PSII, το κυτόχρωμα-b₆f, το PSI και την ATP συνθετάση, καθένα από τα οποία ορίζεται βάση των επιμέρους αντιδράσεων που καταλύει. Το PSII καταλύει την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του νερού και της πλαστοκινόνης, το κυτόχρωμα-b₆f καταλύει την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της πλαστοκινόνης και πλαστοκυανίνης, και το PSI καταλύει την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ πλαστοκυανίνης και φερρεδοξίνης. Τα τρία αυτά σύμπλοκα ορίζονται επομένως ως οξειδοαναγωγάσες καταλύοντας την μεταφορά τους ηλεκτρονίου από ένα μόριο δότη (οξείδωση) σε ένα μόριο δέκτη (αναγωγή) σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο μία αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα δύο φωτοσυστήματα περιέχουν χλωροφύλλες και φωτοσυνθετικές χρωστικές οι οποίες προσλαμβάνουν την ηλιακή ακτινοβολία και μεταφέρουν την απορροφούμενη ενέργεια στα ενεργά κέντρα των φωτοσυστημάτων. Η ενέργεια αυτή στην συνέχεια χρησιμοποιείται προκειμένου να διεγερθούν μόρια χλωροφυλλών τα οποία βρίσκονται στα ενεργά κέντρα του PSII και αποτελούν τους πρώτους

ηλεκτρονιοδότες στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο διαχωρισμός φορτίου που πραγματοποιείται στο PSII σε συνδυασμό με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αλλά και τον κατάλληλο προσανατολισμό των πρωτεϊνικών αυτών συμπλόκων στην μεμβράνη έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μιας ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης H⁺ (pmf) η οποία δρα καταλυτικά στην ενεργότητα του τέταρτου πρωτεϊνικού συμπλόκου τους ATP συνθάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP (Εικόνα 1). Τα τέσσερα αυτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι απαραίτητα για την περάτωση των φωτεινών αντιδράσεων (Nelson, 2013).



Εικόνα 1. *Α.* Σχηματική απεικόνιση τους χωροταξικής κατανομής των τεσσάρων πρωτεϊνικών συμπλόκων τους μεμβράνες των θυλακοειδών

Β. Τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών συμπλόκων που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην οξυγονική φωτοσύνθεση. Με βέλη απεικονίζεται η μετακίνηση ηλεκτρονίων και πρωτονίων. Τα κίτρινα βέλη παρουσιάζουν την απορρόφηση φωτονίων από το PSI και PSII. (Nelson and Ben-Shem, 2004).

<u>Α1.2. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων</u>

Σε γενικές γραμμές η φωτοσυνθετική διαδικασία θα μπορούσε να χωριστεί σε φωτεινές και σκοτεινές αντιδράσεις. Οι φωτεινές αντιδράσεις αποτελούν το σύνολο των διαδικασιών που οδηγούν στην παραγωγή NADPH και κατ' επέκταση στην

παραγωγή ATP διαμέσου τους μεταφοράς ηλεκτρονίων από το νερό στο NADP⁺. Για την αποτελεσματική ροή ηλεκτρονίων από το νερό στο NADPH χρησιμοποιείται μια σειρά διαφορετικών ηλεκτρονιομεταφορέων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η χλωροφύλλη a, η φαιοφυτίνη, κινόνες, τα κυτοχρώματα b και f, κέντρα Fe-S τους πρωτεΐνης Rieske, η πλαστοκυανίνη, η φερρεδοξίνη και μια φλαβοπρωτεΐνη. Τους αερόβιους οργανισμούς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το νερό τους την φερρεδοξίνη η οποία ανάγει το συνένζυμο NADP⁺. Επειδή το H₂O είναι εξαιρετικά ασθενές αναγωγικό τα PSI και PSII λειτουργούν προκειμένου να υπερνικηθεί η διαφορά δυναμικού μεταξύ τους οξειδοαναγωγής του νερού και του NADP⁺. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της απορρόφησης φωτονίων από τα δύο φωτοσυστήματα σχηματίζοντας τις διεγερμένες τους καταστάσεις P₆₈₀^{*} και P₇₀₀^{*}, οι οποίες έχουν αρνητικότερα οξειδοαναγωγικά δυναμικά από το NADP⁺ επιτρέποντας έτσι την μεταφορά ηλεκτρονίων από το H₂O προς αυτό.

<u>Α1.3. Μοριακή δομή και λειτουργία κύριων ηλεκτρονιομεταφορέων της</u> <u>αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων</u>

<u>Α1.3.1. Δομή και λειτουργία PSII</u>

Το ενεργό κέντρο του PSII συγκροτείται από δυο παρόμοιες, 40-kDa, πρωτεΐνες (D1, D2) που αποτελούνται από πέντε διαμεμβρανικές έλικες και έχουν ως στόχο τον συντονισμό των υπολοίπων συστατικών του φωτοσυστήματος που συμμετέχουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων (Εικόνα 2). Περιμετρικά του ενεργού κέντρου εδράζονται οι πρωτεΐνες CP43 και CP47 που διαθέτουν την ικανότητα απορρόφησης φωτονίων και αποτελούνται από 6 διαμεμβρανικές έλικες και 14 ή 16 μόρια χλωροφύλλης αντίστοιχα. Н απορρόφηση φωτονίων στο PSII από πραγματοποιείται τριμερές σύμπλοκο συλλογής φωτός το του φωτοσυστήματος ΙΙ (LHCII) το οποίο συγκροτείται από τις πρωτεΐνες Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3. Το PSII καταλύει την οξείδωση του νερού μια διαδικασία που για να πραγματοποιηθεί απαιτούνται δύο μόρια νερού τέσσερα κβάντα φωτός καθώς και δύο ασθενώς προσδεμένα μόρια χλωροφύλλης (P680) που δρουν ως πρωτογενείς ηλεκτρονιοδότες. Το συνολικό αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι από δύο μόρια H_2O να απελευθερώνονται 4 H^+ , 4 e^- και ένα μόριο O_2 . Τα 4 H^+ που ελευθερώνονται στον μικροχώρο συντελούν στην δημιουργία μίας πρωτονιακής βαθμίδωσης κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης. Τα ε μεταφέρονται διαδοχικά στον μεταφορέα ενός e⁻ την TyrZ (αμινοξύ τυροσίνης της πρωτεΐνης D1). Όταν το διεγερμένο P₆₈₀ (P₆₈₀*) δώσει το e⁻ στην φαιοφυτίνη a και αποκτήσει θετικό φορτίο τότε το e⁻ της TyrZ μεταφέρεται στο P₆₈₀⁺. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην οξείδωση της TyrZ η οποία μετατρέπεται έτσι σε μία ισχυρή οξειδωτική ρίζα (TyrZ⁺) η οποία είναι απαραίτητη για την οξείδωση του νερού. Η ανηγμένη πλέον φαιοφυτίνη a δίνει με την σειρά της ένα ε στην κινόνη Q_A (Εικόνα2), η οποία έχει το υψηλότερο αρνητικό δυναμικό αναγωγής από τις κινόνες που αποτελούν την ελεύθερη

δεξαμενή πλαστοκινόνης της μεμβράνης. Η οξείδωση της Q_A πραγματοποιείται με την μεταφορά ενός e⁻ στην κινόνη Q_B μετατρέποντας την σε ημικινόνη Q_B . Μετά την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου, δηλαδή μετά από έναν δεύτερο διαχωρισμό φορτίου, η μεταφορά e⁻ προς την κινόνη Q_B επαναλαμβάνεται. Επιπρόσθετα δύο πρωτόνια προστίθενται ταυτόχρονα στην Q_B , ώστε τελικά η κινόνη να δέχεται δύο e⁻ και δύο H⁺, πριν αναχθεί πλήρως σε πλαστοκινόνη PQH₂ η οποία και επιστρέφει στην δεξαμενή της πλαστοκινόνης.



Εικόνα 2. *Α.* Σχηματική απεικόνιση του PSII διμερούς. Όλες οι υπομονάδες έχουν το σχήμα κορδέλλας. Με σκούρο μπλε απεικονίζονται οι υπομονάδες D1/D2, με μοβ οι CP43/CP47, με ανοιχτό μπλε το κυτόχρωμα b₅₅₉, οι εξωτερικές υπομονάδες εμφανίζονται με πορτοκαλί και κίτρινο χρώμα ενώ οι υπόλοιπες με ροζ. Οι χλωροφύλλες είναι χρωματισμένες με σκούρο πράσινο χρώμα με τα κεντρικά ιόντα μαγνησίου να εμφανίζονται ως κίτρινες σφαίρες. Το σύμπλοκο του μαγγανίου απεικονίζεται με ανοιχτού μπλε χρώματος σφαίρες και με μοβ τα ιόντα ασβεστίου. Σαν πορτοκαλί ράβδοι απεικονίζονται τα β- καροτένια ενώ σαν κόκκινοι κύκλοι οι ομάδες της αίμης με το κεντρικό ιόν σιδήρου να είναι σφαιρικό. Τέλος με ραβδοειδές σχήμα και ανοιχτό μοβ χρώμα παρουσιάζονται οι κινόνες και η κάθετη μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει τον άξονα συμμετρίας.

B. Παρουσίαση συμπαραγόντων που βοηθούν στην μεταφορά ηλεκτρονίων η οποία απεικονίζεται με βέλη. Ισχύουν οι ίδιοι χρωματισμοί με την προσθήκη των μορίων της

φαιοφυτίνης με ανοιχτό πράσινο και της τυροσίνης με σκούρο μπλε. (Nelson and Ben-Shem, 2004)

<u>Α1.3.2. Δομή και λειτουργία του συμπλόκου του κυτοχρώματος-b₆f</u>

Το κυτοχρώμα-b₆f χαρακτηρίζεται ως μια οξειδοαναγωγάση που καταλύει την μεταφορά ηλεκτρονίων από την πλαστοκινόνη στην πλαστοκυανίνη με αποτέλεσμα την παραγωγή pmf. Η οξείδωση δύο ηλεκτρονίων μίας ανηγμένης κινόνης (PQH₂), που βρίσκεται προσδεμένη στην θέση Q₀ του αυλού του θυλακοειδούς, οδηγεί στην απελευθέρωση δύο πρωτονίων στο υδατικό τμήμα του αυλού (Εικόνα 3a, 3b). Το ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από την ανηγμένη κινόνη στην πλαστοκυανίνη διαμέσω μίας υψηλού δυναμικού αλυσίδας η οποία αποτελείται από την πρωτεΐνη Rieske και το κυτόχρωμα f, ενώ το δεύτερο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην αντίθετη πλευρά της μεμβράνης μέσω δύο ομάδων αίμης (b_L , b_H) στο κυτόχρωμα b_6 ώστε να αναχθεί μία κινόνη που βρίσκεται προσδεμένη στην θέση Q₁ του στρώματος. Ακολούθως ένα αναγωγικό γεγονός που πραγματοποιείται στην θέση Q1 οδηγεί στην μεταφορά δύο πρωτονίων από το στρώμα στην θέση αυτή με αποτέλεσμα η ανηγμένη κινόνη να απελευθερώνεται στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα οδηγώντας έτσι στην διαβάθμιση της συγκέντρωσης των πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης και άρα στην δημιουργία pmf. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μεταξύ των κυτοχρωμάτων του συμπλέγματος b₆f καλούνται Q-cycle και λαμβάνουν χώρα σε δύο μεγάλες κεντρικές κοιλότητες. Το σύμπλοκο του κυτοχρώματος-b₆f αποτελείται από ένα διμερές. Το κάθε μονομερές συγκροτείται από τέσσερις μεγάλες υπομονάδες (18-32 kDa), το κυτόχρωμα f, το κυτόχρωμα b₆ την πρωτεΐνη Rieske, την υπομονάδα IV καθώς και από άλλες τέσσερις μικρότερες υδρόφοβες υπομονάδες τις PetG, PetL, PetM και PetN. Τέλος στο σύμπλοκο συναντάμε και μόρια χλωροφύλλης a και β-καροτενίου (Nelson and Ben-Shem 2004).



Εικόνα 3. Η δομή του συμπλέγματος του κυτοχρώματος- $b_6 f$ του chlamydomonas reinhardtii και οι συμπαράγοντες που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης του.

Α. Μια εικόνα του κυτοχρώματος-b₆f διμερούς συμπλέγματος κάθετο στο επίπεδο της μεμβράνης. Ο άξονας συμμετρίας του διμερούς αναδεικνύεται με μια γραμμή. Οι υπομονάδες του κυτοχρώματος-b₆ φαίνονται με ιώδες δομές κορδέλας, οι υπομονάδες της VI υπομονάδες με γκρι δομές κορδέλας, οι Rieske σίδηρο-θείο πρωτεΐνες φαίνονται με πορτοκαλί δομές κορδέλας και οι υπομονάδες του κυτοχρώματος f φαίνονται με ανοιχτές ροζ δομές κορδέλας. Οι μικρές υπομονάδες (PetG, PetL, PetM and PetN) φαίνονται με ανοιχτές ροζ δομές κορδέλας. Οι ομάδες αίμης b_H, b_L και f φαίνονται με αναπαράσταση κόκκινων ράβδων (οι κεντρικές κόκκινες σφαίρες αναπαριστούν τα ιόντα σιδηρού), και οι επιπλέον ομάδες αίμης φαίνονται με βαθύ κόκκινο. Οι πορτοκαλί τριών διαστάσεων μοριακές δομές αναπαριστούν το καροτένιο, οι χλωροφύλλες φαίνονται με αναπαράσταση σκούρων πράσινων ράβδων (με το κεντρικά ιόντα μαγνησίου να φαίνονται σαν κόκκινες και πράσινες σφαίρες.

Β. Οι συμπαράγοντες που εμπλέκονται στην μεταφορά των ηλεκτρονίων φαίνονται στις ίδιες θέσεις με την εικόνα. 3α. Τα βέλη αναδεικνύουν την μεταφορά ηλεκτρονίων που συμβαίνει κατά τη διάρκεια του Q-κύκλου της οξειδοαναγωγής της πλαστοκινόνης (PQ) - πλαστοκυανίνης και της δραστηριότητας της μεταφοράς των πρωτονίων από το σύμπλοκο.

Οι επιπλέον ομάδες αίμης (βαθύ κόκκινο) δεν εμπλέκονται άμεσα στον κύκλο Q (Nelson and Ben-Shem, 2004).

<u>Α1.3.3. Δομή και λειτουργία PSI</u>

Το PSI των ανώτερων φυτών αποτελείται από δύο μέρη το ενεργό του κέντρο και το περιφερειακό σύμπλοκο συλλογής φωτός Ι (LHCI). Το ενεργό του κέντρο απαρτίζεται από 12-14 υπομονάδες τις PsaA-PsaL, PsaN και PsaO. Το ετεροδιμερές PsaA-PsaB σχηματίζει ουσιαστικά το κέντρο αντίδρασης του PSI καθώς σε αυτό προσδένεται το ειδικό σθενά προσδεμένο ζεύγος χλωροφυλλών Ρ700 στο οποίο πραγματοποιείται ο εκ του φωτός εκπορευόμενος διαχωρισμός των φορτίων καθώς περικλείει τους πρωτογενείς ηλεκτρονιοδότες Α₀ (χλωροφύλλη a), Α₁ (φυλλοκινόνη) και F_x (ένα σύμπλοκο Fe_4 - S_4). Επιπροσθέτως το ετεροδιμερές αυτό συντονίζει περίπου 80 μόρια χλωροφύλλης που λειτουργούν σαν εσωτερική κεραία συλλογής φωτός. Οι τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων, που είναι δύο απομακρυσμένα Fe₄-S₄ σύμπλοκα (F_a, F_b), προσδένονται στην υπομονάδα PsaC. Οι υπόλοιπες υπομονάδες συμμετέχουν στην πρόσδεση της φερρεδοξίνης (PsaC, PsaE και PsaD), της πλαστοκυανίνης (PsaF) καθώς και των LHCI (PsaK, PsaG, PsaJ και PsaF) και LHCII (Psal, PsaH και PsaL)(Εικόνα 4). Τέλος οι υπομονάδες αυτές συμβάλλουν στην διατήρηση της δομικής σταθερότητας του ενεργού κέντρου και ενδεχομένως να επιτελούν επιπρόσθετες διεργασίες. Η εξωτερική κεραία που χρησιμοποιεί το PSI (LHCI) συγκροτείται από τέσσερις πρωτεΐνες που περιέχουν χλωροφύλλη (Lhca1-Lhca4). Οι τέσσερις αυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν διμερή τα οποία όπως αναφέρθηκε προσδένονται στην PsaF υπομονάδα του ενεργού κέντρου. Σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση αυτή διαδραματίζουν σχετικά ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών καθώς μόνο η Lhca1 (και κατ' επέκταση το διμερές Lhca1-Lhca4) σχηματίζει δεσμούς συναρμογής με την υπομονάδα PsaG με αποτέλεσμα να προσδένεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο. Η σχετικά ασθενής πρόσδεση των υπόλοιπων υπομονάδων ευνοείται καθώς μεγιστοποιείται ο αριθμός των μορίων χλωροφύλλης που μπορούν να προσανατολιστούν προς το ενεργό κέντρο του φωτοσυστήματος. Επιπρόσθετα η ασθενής πρόσδεση των μονομερών παρέχει μια εξήγηση αναφορικά με το πώς μπορεί να προσαρμόζεται το LHCI σε περιβάλλοντα διαφορετικής έντασης ακτινοβολίας αλλά και διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων (Nelson and Ben-Shem 2005).



Εικόνα 4. Ένα μοντέλο για την αλληλεπίδραση του φωτοσυστήματος Ι με τους δοτές/αποδέκτες ηλεκτρονίων του και τα μονοπάτια για τη φωτοεπαγώμενη μεταφορά ηλεκτρονίων.

Α. Μία άποψη από τις θεωρητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φωτοσυστήματος Ι (PSI), πλαστοκυανίνης και φερρεδοξίνης. Το ενεργό κέντρο περιλαμβάνει 12-14 υπομονάδες που αναγράφονται ως PsaA–PsaL, PsaN και PsaO και δυο από αυτές τις υπομονάδες είναι σημειωμένες σε αυτή την εικόνα. Οι στρωματικές υπομονάδες φαίνονται με κίτρινες δομές κορδέλας, και καινούρια δομικά στοιχεία του ενεργού κέντρου που δεν είναι παρόντα στα αντίστοιχα των κυανοβακτηρίων φαίνονται με κόκκινες δομές κορδέλας. Τα συντηρημένα χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου φαίνονται με γκρι δομές κορδέλας, και το σύμπλεγμα συγκέντρωσης φωτός I(LHCI) φαίνεται με μια πράσινη δομή κορδέλας. Τα συστατικά της ηλεκτρονιακής μεταφοράς του PSI είναι: οι χλωροφύλλες (αναπαριστώμενες με σκούρες πράσινες ράβδους, στις οποίες οι κεντρικές πορτοκαλί σφαίρες αναπαριστούν τα ιόντα μαγνησίου), οι κινόνες (σκούρες ροζ αναπαραστάσεις με ράβδους) και τρία συσσωματώματα Fe₄S₄ που είναι σημειωμένα με κόκκινες και πράσινες σφαίρες. Η πλαστοκυανίνη φαίνεται σαν μια πορτοκαλί δομή κορδέλας και το άτομο χαλκού της αναπαρίσταται με μια μπλε σφαίρα. Η φερρεδοξίνη φαίνεται σαν μια σκούρα ροζ δομή κορδέλας και το σύμπλεγμα Fe₄S₄ της επίσης αναπαρίσταται με κόκκινες και πράσινες σφαίρες.

B. Οι συμπαράγοντες που εμπλέκονται στην φωτοεπαγώμενη μεταφορά ηλεκτρονίων στο PSI. Αναδεικνύονται οι θέσεις των PsaA, PsaB, PsaC, πλαστοκυανίνης, φερρεδοξίνη και του ειδικού χλωροφυλλικού ζεύγους P₇₀₀. Το σχήμα των χρωμάτων είναι το ίδιο με μέρος α, και τα μόρια της χλωροφύλλης αναπαρίστανται από συμμετρικές πορφυρίνες. Φαίνονται επίσης τα δυο κατάλοιπα τρυπτοφάνης που πιθανώς θα εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από την πλαστοκυανίνη στο P₇₀₀ (ανοιχτές μπλε και ανοιχτές ροζ τρισδιάστατες μοριακές δομές που φαίνονται στο πλαίσιο του δευτεροταγούς δομικού περιβάλλοντος τους (Nelson and Ben-Shem 2005)

<u>Α2. Προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε</u> <u>καταπονήσεις</u>

Α2.1. Φωτόσταση

Ο φωτοσυνθετικός οργανισμός μη έχοντας την δυνατότητα κίνησης είναι αναγκασμένος να προσαρμόζεται σε συνεχείς εναλλαγές στο περιβάλλον του προκειμένου να επιβιώσει. Κύριο ρόλο στην προσαρμογή του φωτοαυτότροφου οργανισμού σε μία περιβαλλοντική μεταβολή διαδραματίζει η δυνατότητα του να συγχρονίζει αντιδράσεις που παρουσιάζουν μεγάλη ανομοιογένεια σε ότι αφορά την ευαισθησία τους στην μεταβολή της θερμοκρασίας αλλά και στο χρονικό διάστημα που απαιτεί η ολοκλήρωση τους. Κατά συνέπεια οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί διαθέτουν ένα σύστημα το οποίο συντονίζει την ταχύτατη απορρόφηση ενέργειας, μέσω φωτοχημικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν την πρόσληψη ηλιακής ακτινοβολίας, την μεταφορά ενέργειας και τον διαχωρισμό φορτίου που δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από τις αλλαγές θερμοκρασίας, με τις πολύ πιο χρονοβόρες και θερμοκρασιακά ευαίσθητες διαδικασίες του μεταβολισμού του άνθρακα (C) του αζώτου (N) και του θείου (S)(Adams and Demmig-Adams 1992; Horton et al. 1996). Σε περιπτώσεις όπου ο φωτοσυνθετικός οργανισμός απορροφούσε περισσότερη από την απαραίτητη για αυτόν ενέργεια, υπήρχε πιθανότητα δημιουργίας ριζών οξυγόνου θέτοντας έτσι σε κίνδυνο την λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση την επιβίωση του οργανισμού. Προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος αυτός αναπτύχθηκε ο μηχανισμός της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) μέσω του οποίου η περίσσια ενέργεια αποβάλλεται με την μορφή θερμότητας είτε από την κεραία μέσω του κύκλου τον ξανθοφυλλών είτε από το ενεργό κέντρο μέσω ανασυνδιασμού φορτίου. Ο μηχανισμός εξισορρόπησης της απορροφούμενης ενέργειας με την απαιτούμενη ενέργεια καλείται φωτόσταση και μπορεί να δωθεί από την εξίσωση σ_{PSII} x $E_k = \tau^{-1}$ (Sane et al. 2003). Ο δείκτης σ_{PSII} αντιπροσωπεύει την απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας του PSII , ο E_k το επίπεδο της ακτινοβολίας (I) κατά το οποίο παρατηρείται μέγιστη κβαντική απόδοση (απορρόφηση φωτονίων) από τα φωτοσυστήματα και τέλος ο δείκτης τ^{-1} ο οποίος αναπαριστά τον ρυθμό περάτωσης των μεταβολικών διεργασιών αφομοίωσης του C, N και S δηλαδή τον ρυθμό που το φυτό καταναλώνει τα φωτοσυνθετικά προϊόντα με στόχο την ανάπτυξη του. Το γινόμενο σ_{PSII} x E_k αντιπροσωπεύει όλες τις διαδικασίες που πραγματοποιούνται κατά την απορρόφηση φωτονίων, την μεταφορά ηλεκτρονίων και τον διαχωρισμό φορτίου στο PSII. Το PSI δεν περιλαμβάνεται στην εξίσωση αυτή καθώς έχει υψηλότερη κβαντική απόδοση από το PSII και δεν θεωρείται περιοριστικός παράγοντας του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί

έχουν αναπτύξει πολλούς μηχανισμούς προκειμένου να συντονίζουν την απορροφούμενη ενέργεια με τις μεταβολικές ανάγκες τους, σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Οι προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε διαφορετικά περιβάλλοντα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, σε αυτές που προκαλούνται είτε λόγω υψηλής είτε λόγω χαμηλής πίεσης διέγερσης (excitation pressure). Στην παρούσα εργασία σκόπιμο θεωρείται να επικεντρωθούμε στις μεταβολές που προκαλούνται λόγω υψηλής πίεσης διέγερσης (High excitation pressure, HEP). Η υψηλή πίεση διέγερσης είναι αποτέλεσμα μια ανισορροπίας μεταξύ της ενέργειας που απορροφάται φωτοχημικά με αυτή που καταναλώνεται βιοχημικά είτε αποσβένεται με την μορφή θερμότητας και παρατηρείται κάθε φορά που σ_{PSII} x $E_k > \tau^{-1}$. Από την στιγμή που η οξείδωση της πλαστοκινόνης από το κυτόχρωμα b₆/f αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων (Haehnel, 1984) αποτέλεσμα της HEP είναι η υπερ-αναγωγή της δεξαμενής της πλαστοκινόνης. Η ΗΕΡ πραγματοποιείται κάτω από οποιαδήποτε συνθήκη ισχύει I > E_k, και επομένως εμφανίζεται σαν απόκριση σε πολλούς διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως υψηλή ένταση ακτινοβολίας (HL), χαμηλής θερμοκρασίας (LT), περιορισμού θρεπτικών συστατικών και νερού. Επομένως η προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε οποιαδήποτε από τα περιβάλλοντα αυτά θα πρέπει να μιμείται την προσαρμογή σε υψηλή ένταση ακτινοβολίας (Huner et al., 2012)

Α2.2. Φαινοτυπική πλαστικότητα

Οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί που αναπτύσσονται υπό την επίδραση ΗΕΡ αναδιαμορφώνουν την δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού προσπαθώντας να ισορροπήσουν την ενδοκυτταρική ροή ενέργειας και να εγκαθιδρύσουν μια νέα κατάσταση φωτόστασης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω της ενίσχυσης των δραστηριοτήτων που καταναλώνουν τα φωτοσυνθετικά προϊόντα οδηγώντας στην ανάπτυξη και αύξηση σε βιομάζα του οργανισμού είτε με την μείωση της αποδοτικότητας της απορρόφησης ηλιακής ακτινοβολίας (Gray et al., 1996). Το τελευταίο επιτυγχάνεται τόσο για βραχυπρόθεσμες περιβαλλοντικές μεταβολές, όπως με την απόσβεση της ενέργειας με την μορφή θερμότητας μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών όσο και σε παρατεταμένες περιβαλλοντικές μεταβολές όταν π.χ. ο οργανισμός μειώνει το φυσικό μέγεθος του LHC μειώνοντας έτσι παράλληλα την πιθανότητα απορρόφησης φωτονίου. Οι στρατηγικές που συναντάμε για την επανεγκαθίδρυση της φωτόστασης μεταξύ των οργανισμών είναι ειδοειδικές και εξαρτώνται τόσο από τον γονότυπο όσο και από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται ο οργανισμός. Έτσι για ένα συγκεκριμένο γονότυπο μπορεί να έχουμε την εμφάνιση πολλών διαφορετικών φαινοτύπων ανάλογα με την αλληλεπίδραση του οργανισμού με το περιβάλλον. Το φαινόμενο αυτό

χαρακτηρίζεται ως φαινοτυπική πλαστικότητα και αντανακλά τις αλλαγές σε μεταγραφικό μεταφραστικό και μέτα-μεταφραστικό επίπεδο στις οποίες υπόκειται ο οργανισμός προκειμένου να ρυθμίσει κατάλληλα τον μεταβολισμό και την ανάπτυξη του(Maxwell et al., 1995).

<u>Α2.2.1. Παραδείγματα φαινοτυπικής σε παρατεταμένες</u> <u>περιβαλλοντικές μεταβολές</u>

Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Η ανάπτυξη των χλωροφυκών D. Salina και Chlorella vulgaris υπό συνθήκες υψηλής έντασης ακτινοβολίας έχει σαν αποτέλεσμα τα φύκη αυτά να εμφανίζουν ένα κίτρινο ή κίτρινο-πράσινο χρωματισμό φαινοτυπικό αποτέλεσμα της χαμηλής συγκέντρωσης χλωροφύλλης ανά κύτταρο και του υψηλού λόγου χλωροφύλλης a/b (Ort and Melis, 2011). Από την στιγμή που το LHCII, που κωδικοποιείται στον πυρήνα, δεσμεύει το μεγαλύτερο μέρος της χλωροφύλλης στους ευκαρυωτικούς χλωροπλάστες (Green et al., 2003), αυτός ο HL φαινότυπος αντιπροσωπεύει αλλαγές στο σ_{PSII}. Αντίστοιχος φαινότυπος παρατηρείται επίσης όταν τα χλωροφύκη αυτά αναπτύσσονται σε χαμηλή θερμοκρασία και μέτριας έντασης ακτινοβολία άρα συνολικά ο φαινότυπος αυτός μπορεί να χαρακτηριστεί ως ΗΕΡ φαινότυπος. Ο λόγος που πραγματοποιείται η μεταβολή αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα φύκη αυτά έχουν περιορισμένες δυνατότητες προσαρμογής του ρυθμού μεταβολισμού του άνθρακα και του ρυθμού ανάπτυξης τους, επομένως συντονίζουν την πρόσληψη και κατανάλωση ενέργειας προκειμένου να επιβιώσουν σε ένα HL περιβάλλον μειώνοντας το σ_{PSII} μέσω της μείωσης της απορροφούμενης ακτινοβολίας (λιγότερα μόρια χλωροφύλλης) και αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας μέσω θερμότητας (Maxwell et al., 1995). Ο συντονισμένος έλεγχος της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης καθώς και η διαθεσιμότητα των μεταγράφων και των πολυπεπτιδίων της Lhcb φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του φαινοτύπου αυτού (Maxwell et al., 1995). Επιπρόσθετα διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης της ομάδας των γονιδίων CAO, από τα οποία εκφράζεται ένα ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της χλωροφύλλης a σε b, συμβαίνουν ταυτόχρονα με τις μεταβολές της διαθεσιμότητας του μεταγράφου Lhcb όταν το φυτό προσαρμόζεται σε περιβάλλοντα υψηλής έντασης ακτινοβολίας. Επιπλέον η οξειδοαναγωγική κατάσταση της δεξαμενής της πλαστοκινόνης ρυθμίζει την διαθεσιμότητα των μεταγράφων CAO και Lhcb. Τέλος ο κιτρινοπράσινος χρωματισμός που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα φύκη που αναπτύσσονται υπό αυτές τις συνθήκες, αποτελεί ένδειξη παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης. Δεν έχει ακόμη πάντως διευκρινιστεί αν το σήμα που μεταδίδει η οξειδοαναγωγική κατάσταση της δεξαμενής της πλαστοκινόνης επιδρά απευθείας στον μεταγραφικό ρυθμό των γονιδίων Lhcb και CAO ή παρεμβάλλεται ένας ενδιάμεσος ρυθμιστικός μηχανισμός που διαμορφώνει τα επίπεδα της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης b

ελέγχοντας την μεταγραφική έκφραση των γονιδίων CAO (Maxwell et al., 1995; Horton et al. 1996).

Επίπεδο έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων

Φυτά, όπως το σιτάρι και η σίκαλη, τα οποία αναπτύσσονται σε ψυχρά περιβάλλοντα εμφανίζουν μία αναπτυξιακή διαφοροποίηση όπου από επιμήκη μορφή παρουσιάζουν νανισμό. Το φαινόμενο αυτό όμως δεν συνδυάζεται και με μείωση της βιομάζας τους καθώς αυτή είναι ίδια ή και μεγαλύτερη αν συγκριθεί με αυτή των φυτών που παρουσίασαν τον επιμήκη φαινότυπο χάρις τον συνδυασμό διαφορετικών παραμέτρων όπως η αύξηση του πάχους του φύλλου, η αύξηση του κυτταροπλασματικού όγκου σε συνδυασμό με την μείωση της περιεκτικότητας του σε νερό και την ταυτόχρονη διατήρηση ίδιου αριθμού φύλλων. Αντίστοιχος φαινότυπος εμφανίζεται επίσης όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα υψηλής θερμοκρασίας και υψηλής έντασης ακτινοβολίας οδηγώντας στο συμπέρασμα πως ο φαινότυπος αυτός προκαλείται λόγω HEP. Εν αντιθέσει με το προηγούμενο παράδειγμα τα φυτά αυτά διατηρούν την φωτόσταση τους αυξάνοντας τον ρυθμό αφομοίωσης του CO₂ μέσω της επαγωγής της μεταγραφής και της μετάφρασης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν το ένζυμο Rubisko καθώς και φρουκτάνης των ρυθμιστικών ενζύμων βιοσύνθεσης της και της κυτταροπλασματικής σουκρόζης. Οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αυτών συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση του ρυθμού εξαγωγής του άνθρακα από τα φύλλα και αναστολή της φωτοαναπνοής ενώ ταυτόχρονα οι μη φωτοχημικές απώλειες λόγω θερμότητας διατηρούνται στο ελάχιστο δυνατό. Το ολικό αποτέλεσμα αυτού του είδους προσαρμογής είναι η αύξηση της φυτικής βιομάζας αλλά και η αύξηση της συγκέντρωσης τελικών προϊόντων της φωτοσυνθετικής διαδικασίας όπως η σουκρόζη η οποία σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες σε συνθήκες παγετού. Αυτή η ευρείας κλίμακα μεταβολή, η οποία επιφέρει αλλαγές στην μορφολογία, φυσιολογία και στο βιοχημικό περιβάλλον του προσαρμοσμένου σε ψυχρές συνθήκες φυτού, έχει δειχθεί ότι οφείλεται στην δράση ομάδων μεταγραφικών παραγόντων των CBFs και DREBs, η υπερέκφραση των οποίων οδηγεί σε εμφάνιση αντίστοιχων φαινοτύπων με αυτούς που παρατηρούνται σε φυτά προσαρμοσμένα σε ψυχρά περιβάλλοντα (Maxwell et al., 1995; Huner et al., 2012).

<u>Α2.2.2. Παραδείγματα φαινοτυπικής σε βραχυπρόθεσμες</u> <u>περιβαλλοντικές μεταβολές</u>

Κίνηση χλωροπλαστών

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει την δυνατότητα να προσαρμόζεται και σε αλλαγές στην ένταση και το μήκος κύματος της απορροφούμενης ακτινοβολίας που συμβαίνουν κατά την διάρκεια μίας μέρας χωρίς να απαιτούνται τόσο εκτενείς μεταβολές στην σύνθεση του. Μία από τις προσαρμογές αυτές είναι η κίνηση του χλωροπλάστη σαν απόκριση σε αλλαγές της έντασης της ακτινοβολίας και εμφανίζεται σε όλα τα φυτικά είδη. Το φαινόμενο αυτό πραγματοποιείται με την βοήθεια των μικρονιματίων ακτίνης, μια πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού, οι οποίες ελέγχουν την κίνηση και καθορίζουν την θέση του χλωροπλάστη. Κάτω από συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού (LL) οι χλωροπλάστες διευθετούνται κάθετα της διεύθυνσης της ηλιακής ακτινοβολίας, στο πάνω και κάτω μέρος του κυττάρου, προκειμένου να υπάρξει η βέλτιστη αξιοποίηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ενώ σε περιπτώσεις υψηλής έντασης ακτινοβολίας η διευθέτηση των χλωροπλαστών αλλάζει και είναι παράλληλη προς την ηλιακή ακτινοβολία ενώ πλέον εντοπίζονται περιμετρικά του κυττάρου στα πλαϊνά τοιχώματα. Η μετακίνηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την επικάλυψη των χλωροπλαστών μεταξύ τους και παράλληλα την μείωση της συνολικής επιφάνειας που εν δυνάμει μπορεί να προσλάβει ηλιακή ακτινοβολία με στόχο την προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αντίστοιχες κινήσεις χλωροπλαστών μπορούν να επαχθούν με την έκθεση του φυτού σε κυανή ακτινοβολία (430-500 nm) (Xu et al. 2015).

State transition

Ένας ακόμη μηχανισμός προσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε διαφορετικά φάσματα ηλιακής ακτινοβολίας που έχει αναπτυχθεί είναι το μοντέλο δύο καταστάσεων (state transition). Αυτές οι αλλαγές καταστάσεων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έχουν σαν στόχο την ομαλή κατανομή της απορροφούμενης ενέργειας μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων καθώς το PSI απορροφά ακτινοβολία βέλτιστα σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 700 nm ενώ το PSII προσλαμβάνει πιο αποτελεσματικά ακτινοβολία μήκους κύματος μικρότερου των 700 nm. Η διαφορά στις βέλτιστες συνθήκες απορρόφησης ακτινοβολίας μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων έχει σαν αποτέλεσμα, όταν το φυτό εκτίθεται σε ερυθρό φάσμα ακτινοβολίας το PSII να προλαμβάνει περισσότερη ενέργεια συγκριτικά με αυτήν που κατανέμεται στο PSI, όπου προκειμένου να εξισορροπηθεί η διαφορά της διοχετευόμενης ενέργειας μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων η θυλακοειδής μεμβράνη μεταπίπτει στην κατάσταση 2 κατά την οποία ένα ποσοστό των LHCIIs αποσπάται από το PSII και προσδένεται στο PSI. Αντίθετη είναι η μεταβολή σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 700 nm όταν το PSI, που έχει προσδεμένα LHCIIs, απορροφά περισσότερη ενέργεια από το PSII με αποτέλεσμα την αποκοπή των LHCIIs και την εκ νέου επαναπρόσδεση τους στο PSII (κατάσταση 1). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται μέσω μίας προσδεμένης στην θυλακοειδή μεμβράνη φωσφατάσης (Stt7 στα φύκη, STN7 στα φυτά) η οποία φωσφορυλιώνει τα LHCIIs αυξάνοντας την συγγένεια πρόσδεσης τους προς το PSII. Η ενεργότητα της συγκεκριμένης φωσφατάσης ρυθμίζεται από την οξειδωτική κατάσταση της

δεξαμενής της πλαστοκινόνης, όπου όταν αυτή είναι σε ανηγμένη μορφή ενεργοποιείται και όταν επανοξειδωθεί απενεργοποιείται μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό και την συγγένεια πρόσδεσης των LHCIIs για καθένα από τα δύο φωτοσυστήματα (Xu et al. 2015).

Κύκλος ξανθοφυλλών

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί κύκλοι ξανθοφυλλών στα φυτά, αυτός της βιολοξανθίνης και αυτός της λουτεΐνης (Lut). Η βιολοξανθίνη, που συναντάται σε όλα τα χερσαία φυτά, μετατρέπεται αντιστρεπτά σε ζεαξανθίνη (Zea) ενώ το εποξείδιο της λουτεΐνης σε λουτεΐνη. Οι δύο αυτοί κύκλοι εμπλέκονται στην αλλαγή κατάστασης του PSII, όπου από την φάση απορρόφησης ηλιακής ακτινοβολίας μεταπίπτει σε μια φάση απόσβεσης της ενέργειας μέσω θερμότητας (qE) γεγονός που συνήθως συνεπάγεται περιβάλλοντα υψηλής έντασης ακτινοβολίας. Η συσσώρευση της Zea επιταχύνει την απόσβεση της ενέργειας μέσω θερμότητας ενώ παράλληλα καθυστερεί την χαλάρωση της έντασης του φαινομένου αυτού. Στην διαδικασία της qE η Zea έχει διττό ρόλο τόσο της απορρόφησης ενέργειας από διεγερμένα μόρια χλωροφύλλης όσο και της μεταφοράς της ενέργειας από ένα διεγερμένο μόριο χλωροφύλλης σε ένα γειτονικό του. Η Lut από την πλευρά της εξασφαλίζει την δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών της κεραίας, την μεταφορά της ενέργειας διέγερσης σε μόρια χλωροφύλλης και την απόσβεση ενέργειας των διεγερμένων μορφών χλωροφύλλης ³Chl και ¹Chl (Adams and Demmig-Adams 1992, Xu et al. 2015; Malliarakis et al., 2015).

Α2.3. Αλληλεπίδραση φωτοσυνθετικού μηχανισμού και περιβάλλοντος

Αποτελεί γεγονός πως η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επηρεάζει σημαντικά πολλούς οξειδοαναγωγικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική μεταφορά σήματος. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι πως πολλοί παράγοντες που συμμετέχουν ή επηρεάζουν την μεταφορά ηλεκτρονίων, όπως η δεξαμενή της πλαστοκινόνης, το PSII, η *pmf*, καθώς και οι αποδέκτες ηλεκτρονίων του PSI, αποτελούν παράλληλα και αισθητήρες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αποδέκτες ηλεκτρονίων του PSI αποτελούν η φερρεδοξίνη, η θειορεδοξίνη, περοξυρεδοξίνες, H₂O₂ και μεταβολικά ενδιάμεσα του κύκλου του άνθρακα. Οι οξειδοαναγωγικές καταστάσεις όλων των μορίων αυτών μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα η συντονισμένα επιδρώντας σε διαφορετικό βαθμό στην επαγωγή ενός παλίνδρομου σήματος επικοινωνίας μεταξύ του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και του πυρήνα με στόχο την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που επηρεάζουν την φωτοσυνθετική διαδικασία. Το τελικό αποτέλεσμα αυτού του συνόλου οξειδοαναγωγικών αισθητήρων και σηματοδοτών είναι η

παροχή στον φωτοσυνθετικό οργανισμό της δυνατότητας απόκρισης σε μεταβολές της πίεσης διέγερσης, που συνοδεύονται από μεταβολές στο περιβάλλον του, με στόχο την διατήρηση της φωτόστασης του. Η ιδιότητα αυτή, της επικοινωνίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με τον πυρήνα οδήγησε στην διατύπωση της θεωρίας πως τόσο οι φωτοϋποδοχείς όσο και τα φωτοσυστήματα ενός φωτοσυνθετικού οργανισμού μπορούν να δρούν ανεξάρτητα ως αισθητήρες της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας, είναι όμως και άρρηκτα συνδεδεμένοι με ανατροφοδοτικές αποκρίσεις παραγόμενων μεταβολιτών της φωτοσυνθετικής διαδικασίας που έχουν ως σκοπό την δυνατότητα προσαρμογής του φωτοσυνθετικού οργανισμού τόσο σε απότομες όσο και σε παρατεταμένες μεταβολές στο περιβάλλον του. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται πως οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί πρέπει να επεξεργαστούν τις πληροφορίες που τους παρέχονται από τις μεταβολές της έντασης αλλά και του είδους της ακτινοβολίας, μέσω των φωτοϋποδοχέων, σε συνδυασμό με την κατάλληλη αξιοποίηση του φωτός ως πηγή ενέργειας όπως και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, με στόχο την βέλτιστη ανάπτυξη τους σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Επομένως, πέρα της κλασικής του θεώρησης ως ένας μετασχηματιστής ενέργειας ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός πρέπει επίσης να λογίζεται ως ένας ευαίσθητος αισθητήρας περιβαλλοντικών μεταβολών (Miskiewicz et al., 2000; Sane et al., 2003; Huner et al., 2012).

Οι εξελίξεις ιδίως των τελευταίων 20 χρόνων στον τομέα αυτό είναι ραγδαίες και καθοριστικές, αποκαλύπτοντας νέες πτυχές της μοριακής, βιοενεργητικής και φυσιολογικής λειτουργίας του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού. Με την ανίχνευση πολυαμινών [η διαμίνη πουτρεσίνη (Put), η τριαμίνη σπερμιδίνη (Spd), η τετραμίνη σπερμίνη (Spm)] στο χλωροπλάστη και για πρώτη φορά διεθνώς στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis, et al., 1993), άνοιξε ένα νέο κεφάλαιο κατανόησης του μηχανισμού της προσαρμοστικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (και σι αι ο καταβολισμός αυτών των πολυαμινών ελέγχεται φωτονιακά από τους ίδιους φωτοϋποδοχείς που ελέγχουν την βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (και κατ' επέκταση την ανάπτυξη του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη) και αποτελούν βασικό ρυθμιστή αυτής της διαδικασίας (Beigbeder and Kotzabasis, 1994; Beigbeder et al., 1995; Andreadakis and Kotzabasis, 1996; Dörnemann et al., 1996)

Στον ώριμο χλωροπλάστη βρέθηκε ότι η δυναμική και η πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στηρίζεται στους διακριτούς ρόλους της δράσης της διαμίνης πουτρεσίνης (Put) από τις υπόλοιπες πολυαμίνες, σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm). Η φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε υψηλή (HL) ή χαμηλή ένταση (LL) φωτισμού ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση Put/Spm. Η μείωση αυτής της σχέσης (Put/Spm) προσομοιώνει τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με αντίστοιχη προσαρμοσμένη σε χαμηλό φωτισμό [αύξηση του μεγέθους της λειτουργικής κεραίας (ABS/RC) και του ολιγομερισμού του LHCII, μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS), της σχέσης Chl a/b, της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm), της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αναπνοής, ...], ανεξαρτήτως του φωτονιακού περιβάλλοντος. Αντίθετα, η αύξηση της σχέσης Put/Spm οδηγεί σε ένα φωτοσυνθετικό μηχανισμό αντίστοιχο με τον προσαρμοσμένο (δομικά και λειτουργικά) σε υψηλής έντασης φωτισμό (Kotzabasis et al., 1999).

Κεντρικό ρόλο σε αυτό τον μηχανισμό ρύθμισης της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού φαίνεται ότι παίζει η αλληλεπίδραση των πολυαμινών με την αυτοπρωτεολυτική δράση του LHCII. Ρυθμίζοντας τον πολυμερισμό/ αποπολυμερισμό του LHCII ελέγχει την δομική και λειτουργική πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στη διαδικασία της φωτοπροσαρμογής του(Navakoudis et al., 2007; Tsiavos et al., 2012).

Το εν λόγω εύρημα γίνεται πολύ πιο σημαντικό, από τη στιγμή που κατανοήσαμε και αναδείξαμε τον κεντρικό ρόλο του LHCII στην αίσθηση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Η δυνατότητα «αίσθησης» των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και καταπονήσεων (αυξομείωση της PAR-ακτινοβολίας, έκθεση σε αυξημένες συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικού όζοντος, UV-B ακτινοβολίας, χαμηλής θερμοκρασίας, αυξημένης αλατότητας, κ.α.) βασίζεται στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του PSII, η οποία ελέγχεται μεταξύ άλλων από το λειτουργικό μέγεθος του LHCII, που καθορίζει την πίεση διέγερσης του PSII (excitation pressure) και ως εκ τούτου την ένταση της υφιστάμενης καταπόνησης. Αφού αποδείχθηκε ότι μπορούμε να ελέγξουμε το μέγεθος και την οργάνωση του LHCII, μέσω των πολυαμινών, βρέθηκε ότι σε όλες τις μορφές καταπονήσεων (abiotic stress) εμπλέκεται η διαφοροποίηση του μεγέθους και της οργάνωσης του LHCII, που ελέγχεται από τη σχέση Put/Spm. Έτσι, σε σειρά πειραμάτων που έγιναν σε θαλάμους περιβαλλοντικής προσομοίωσης (GSF-Μόναχο), μπορέσαμε να μετατρέψουμε υπερευαίσθητα στο όζον φυτά καπνού Bel W₃ σε ανθεκτικά και αντίστροφα, ανθεκτικά φυτά Bel B να τα μετατρέψουμε σε ευαίσθητα στο όζον, επεμβαίνοντας απλώς με πολυαμίνες (σχέση Put/Spm) στο LHCII (Navakoudis, Lutz et al. 2003). Το ίδιο παρατηρήσαμε ότι συμβαίνει και όταν τα φυτά εκτεθούν σε υψηλή UVB ακτινοβολία (προσομοίωση φαινομένου εξασθένισης της στρατοσφαιρικής στιβάδος του όζοντος), σε μείωση της θερμοκρασίας ή σε αύξηση της αλατότητας, αλλά και σε οποιαδήποτε μορφή αβιοτικής καταπόνησης (Ioannidis et al., 2004; Navakoudis et al., 2005; Sfakianaki et al., 2006; Demetriou et al., 2007; Sfichi-Duke et al., 2008; Kotakis et al., 2014).

Ως εκ τούτου LL-συνθήκες (ή εξωγενής προσθήκη Spm) και αβιοτική καταπόνηση δρουν συνεργιστικά και αυξάνουν δραματικά την ευαισθησία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στην καταπόνηση. Αντίθετα HL-συνθήκες (ή εξωγενής προσθήκη Put) και αβιοτική καταπόνηση δρουν ανταγωνιστικά και αυξάνουν σημαντικά την ανθεκτικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στην καταπόνηση (loannidis et al., 2008).

Η διεξοδική μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της φωτοσυνθετικής διαδικασίας από πολυαμίνες έδειξε διακριτούς ρόλους για την πουτρεσίνη (Put) σε σχέση με τις άλλες δύο πολυαμίνες (Spd, Spm), οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν από *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Πιο αναλυτικά, η αύξηση της πουτρεσίνης (Put) προκαλεί αναστολή της ενεργοποίησης της μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) και ταυτόχρονα παράταση του χρόνου αποφόρτισης της θυλακοειδούς μεμβράνης. Αυτό συνδέεται άμεσα με τις βιοχημικές ιδιότητες της Put αλλά και την επαγωγή της φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας και της φωτοφωσφορυλίωσης. Η ικανότητα της πουτρεσίνης να αυξάνει τη χημειοωσμωτική σύνθεση ATP (έως 70% ρυθμίζοντας το ΔpH και Δψ του μικροχώρου) προτείνεται ως μια κεντρική αιτία για να ερμηνεύσει κανείς το γιατί η πουτρεσίνη δρα ως παράγοντας αύξησης των κυττάρων αλλά και γιατί αυξάνεται η σχέση Put/Spm σε συνθήκες καταπόνησης (διαδικασίες με υψηλό ενεργειακό κόστος) (Ioannidis et al. 2006; Ioannidis and Kotzabasis 2007; Ioannidis et al., 2012; Ioannidis and Kotzabasis 2014).

Αντίθετα με την Put, οι πολυαμίνες Spd και Spm προκαλούν επαγωγή της μηφωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) εις βάρος της φωτοχημικής απόσβεσης ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς φωτοπροστασίας ακόμη και σε χαμηλής ένταση φωτισμό (δηλ. «παρακάμπτουν» την φωτονιακή εντολή) (Ioannidis et al., 2011; Tsiavos et al., 2012; Malliarakis et al., 2015; Tsiavos et al., 2015).

<u>Α3. Σκοπός</u>

Η πολυεπίπεδη πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να προσαρμόζει τη μοριακή δομή και λειτουργία του ανάλογα με τις συνθήκες έκθεσης του στο περιβάλλον, αποτέλεσε το έναυσμα να ελεγχθεί με την παρούσα εργασία για πρώτη φορά η συμβατότητα μιας εξωτερικής ηλεκτρονιακής ροής (ηλεκτρικό ρεύμα) με την ενδογενή μεταφορά ηλεκτρονίων που παρατηρείται στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και των επιδράσεων που αυτή επιφέρει στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Όλος ο πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας εργασίας αποσκοπεί τόσο στην ενδογενή δυνατότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να μεταφέρει (εξω)ηλεκτρόνια (ηλεκτρόνια ενός μέσω φωτοσυνθετικών τεχνητού ηλεκτρικού πεδίου) οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, όσο και στην υψηλή προσαρμοστικότητα (συμβατότητα) που ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός θα εμφανίσει σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικής τάσης ηλεκτρικού φορτίου, ανοίγοντας νέες προοπτικές για καινοτόμες βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως η παραγωγή μοριακού υδρογόνου μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<u>Β1. Οργανισμός</u>

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus wild type D3 (Gafrron, 1939) (Εικόνα 5). Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο: Φυτά Διαίρεση: Χλωρόφυτα Κλάση: Χλωροφύκη Τάξη: Chlorococcales Γένος: Scenedesmus Είδος: Scenedesmus obliquus



Εικόνα 5. Το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με ελλειψοειδή κύτταρα, μήκους περίπου 5-10 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 4-8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, συνήθως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά, βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο, γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη, τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*). Πρόκειται για φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό, που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά. Ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα Ι και ΙΙ.

Η ανάπτυξη των οργανισμών έγινε σε επιμήκεις γυάλινους σωλήνες (Ø 5cm × 50 cm), με ειδικό στόμιο στο κάτω μέρος του σωλήνα, που επιτρέπει τον αερισμό της καλλιέργειας, ενώ ενυδρείο σταθερής τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασίας 30°C, μπροστά από λάμπες Εικόνα 6. Σύστημα καλλιέργειας λευκού φωτισμού, με ρυθμιζόμενη ένταση (Εικόνα 6). Η σύσταση του θρεπτικού υλικού



του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus

αναγράφεται στον Πίνακα 1. Το μικροφύκος αναπτύχθηκε σε αυτές τις συνθήκες για 2-3 ημέρες περίπου, έπειτα χρησιμοποιήθηκε ως μητρική καλλιέργεια για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Πίνακας 1. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας του Scenedesmus obliguus (Bishop and Senger, 1971)

Συστατικά	Περιεκτικότητα (σε g/L)
CaCl2 x 2H ₂ O	1,50
KNO ₃	80,0
MgSO ₄ x7H ₂ O	24,6
NaCl	47,0
$Na_2HPO_4 x 2H_2O$	17,8
NaH ₂ PO ₄ x1H ₂ O	40,5
FeSO ₄ x1H ₂ O	0,06
Fe(III)citrate	0,24
H_3BO_3	2,86
MnCl ₂ x4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,079
МоО ₃ (85%-99.5%)	0,0177

<u>Β2. Εκτίμηση κυτταρικού όγκου</u>

Δείγματα των 5 mL από τις καλλιέργειες των φυκών φυγοκεντρήθηκαν σε βαθμονομημένο τριχοειδή υαλοσωλήνα για 5 λεπτά στα 1500g, προκειμένου να καθιζήσουν (Logothetis et al., 2004). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, παρουσιάζεται ως όγκος καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume; PCV) ανά mL καλλιέργειας (μL PCV/mL καλλιέργειας).

<u>Β3. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού - καταγραφή της μοριακής</u> δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα, είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους (Kautsky and Hirsch, 1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού ιδιαίτερα της ταχείας φάσης – έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της μοριακής δομής και λειτουργίας, αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των (Strasser and Strasser, 1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας, η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους, που αφορούν τη μοριακή δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_o) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρι ένα σταθερό επίπεδο (FS).



Εικόνα 7. Handy PEA για τις μετρήσεις του επαγωγικού ωθοοισμού

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments) (Εικόνα 7), και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer HP 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser (1995).

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα καλλιεργειών όγκου 1 mL, τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min, προκειμένου να "αδειάσουν" τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος Fv/Fm, που συνδέεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική απόδοση (Strasser and Strasser, 1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια [J, I και P (Εικόνα 8)], υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικός μηχανισμού: ο λόγος ABS/RC, που συνδέεται με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII, ο λόγος **Dio/RC**, που συνδέεται με την ενέργεια που χάνεται με τη μορφή θερμότητας, ο λόγος **RC/CSo**, που συνδέεται με την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII, ο φωτοσυνθετικός δείκτης (PI_(abs)) και η πρωτογενής φωτοχημεία (PSI_o).



Εικόνα 8. Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι 3000 μmol×m⁻²s⁻¹ ερυθρού φωτός (650nm).

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
Ft	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβόληση
$F_{50\mu s}$	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
F _{300µs}	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της καμπύλης OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα Ι (30 ms) της καμπύλης ΟJIP
$F_p (= F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο Ρ της καμπύλης ΟJIP
t_{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού Fm
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το $F = F_m$
Παράμετροι JIP-test	
F _o	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε ''ανοιχτά'' κέντρα (open PSII RCs, t = 0)

Πίνακας 2. Βασικές παράμετροι JIP-test

_	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα
F_{m_k}	τα κέντρα είναι "κλειστά"
	(closed PSII RCs, t = tFm)
F_{v}	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$F_{v} = F_{m} - F_{o}$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής Φθορισμού
$V_t = (F_t - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
$V_J = (F_J - F_o)(F_m - F_o)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_{o} = (\Delta V / \Delta t)_{o}$ = 4(F _{300 µs} - F _o)/(F _m - F _o)	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης <i>V = f(t)</i>
$S_m = (Area)/(F_m - F_o)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιούμενο ως προς Fv (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q _A)
$S_s = V_J / M_o$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης ΟJIP που αντιστοιχεί μόνο στην ΟJ φάση (διάστημα όπου η Q _A των RC ανάγεται μία φορά)
$N = S_m / S_s = S_m M_o (1/V_J)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q _A στο διάστημα tFm
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει ((A)
$ABS/RC = M_o (1/V_J)(1/\Phi_{Po})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας
$TR_o/RC = M_o (1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)
$ET_o/RC = M_o (1/V_J)\Psi_o$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για t = 0)
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	
$\Phi P_o = TR_o / ABS = [1 - (F_o / F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (για t = 0)
$\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση (excision) τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q ₄ (για t

	= 0)	
$\Phi_{Eo} = ET_o / ABS = [1 - (F_o / F_m)] \Psi_o$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για t = 0)	
$\Phi_{Do} = 1 - \Phi P_o = F_o / F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων (για t = 0)	
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή		
ABS/CS _o	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το Fo	
ABS/CS _m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το Fm	
$TR_o/CS_o = \Phi_{p_o} (ABS/CS_o)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για t = 0)	
$ET_o/CS_o = \Phi_{Eo} (ABS/CS_o)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης (για t = 0)	
$DI_o/CS_o = (ABS/CS_o) - (TR_o/CS_o)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης (για t = 0)	
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης		
RC/CS _o	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης	
Δείκτες επίδοσης		
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi P_o/1 - \Phi P_o)(\Psi_o/1 - \Psi_o)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια	
$PI_{CS_o} = (RC/CS_o)(\Phi P_o/1 - \Phi P_o)(\Psi_o/1 - \Psi_o)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = 0)	
$PI_{CS_m} = (RC/CS_m)(\Phi P_o/1 - \Phi P_o)(\Psi_o/1 - \Psi_o)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = tFm)	
$SFI_{ABS} = (1 - \Phi P_o)(1 - \Psi_o)$ Ικανότητα παραγωγής έργου	Δείκτης λειτουργικότητας	
$DF_{ABS} = \log PI_{ABS}$	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια	

<u>Β4. Πολαρογραφικές μετρήσεις μέγιστης φωτοσυνθετικής</u> δραστηριότητας και αναπνοής

Οι μετρήσεις της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της αναπνοής έγιναν με σύστημα Clark type ηλεκτροδίου της Hansatech. Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός άλλου από άργυρο (άνοδος) τίθεται, μέσω ενός ηλεκτρολύτη (κορεσμένο διάλυμα KCl), μία μικρή ηλεκτρική τάση (~50V). Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου, χρειάζεται O₂ το οποίο περνά από μία ημιπερατή μεμβράνη, που χωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόδια. Η καταγραφή της έντασης του ρεύματος (σε A) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης οξυγόνου του δείγματος.

Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου από το δείγμα (φωτοσυνθετικά μικροφύκη) επιτυγχάνεται μόνο με το φωτισμό του δείγματος. Η αποφυγή του περιοριστικού για τη φωτοσύνθεση παράγοντα (συγκέντρωση CO₂ στο διάλυμα του δείγματος) επιτυγχάνεται με την προσθήκη NaHCO₃. Μονοκύτταρα φύκη *Scenedesmus obliquus* συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση 5 min στα 1500 g και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (34 mg NaHCO₃ και 8,96 mg Tricin σε 100 mL dH₂O, PH: 7,6 με KOH), έτσι ώστε η πυκνότητα του αιωρήματος σε κύτταρα να είναι 10 μL PCV/mL. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφτηκε σε διάφορες εντάσεις φωτισμού (ώστε να αποφευχθεί τόσο ο αυτοσκιασμός όσο και η φωτοαναστολή), ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα σε απόλυτο σκοτάδι. Τόσο η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα όσο και η αναπνοή ανήχθησαν ανά μL PCV.

<u>Β5. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (Η₂) με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)</u>

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του οξυγόνου και του παραγόμενου υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Shimadzu GC 2010 Plus, Kyoto, Japan), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση - 23.5 mL min⁻¹). 1mL αέριου δείγματος εγχεόταν στην GC-TCD μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, όπου και ο διαχωρισμός του H₂ και του O₂ γινόταν με βάση τη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η θερμική αγωγιμότητα του Αργού είναι 0.0001772 Wcm K⁻¹, του Οξυγόνου 0.0002674 W cm K⁻¹ και του Υδρογόνου 0.001815 W cm K⁻¹. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη μήκους 30 m, διαμέτρου 0,53 mm και πάχους 20 μm (Vici Metronics MC Poulsbo,USA) με τη θερμοκρασία του φούρνου στους 120°C. Η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C και του σημείου εισόδου της ένεσης ήταν 180°C. Η ποσοτικοποίηση των Η₂ και O₂ έγινε χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες των αερίων.

<u>Β6. Υπόθεση εργασίας - Πειραματικός σχεδιασμός</u>

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία έχει σχεδιαστεί με βάση της ιδιότητες που επιδεικνύει ένα υδατικό διάλυμα αλάτων, ως ηλεκτροχημική δίοδος, όταν σε αυτό εφαρμοστεί κατάλληλης έντασης ηλεκτρική τάση προκαλώντας με τον τρόπο αυτό την ηλεκτρόλυση του. Αρχικά ως ηλεκτρική τάση ορίζεται η ποσοτική έκφραση της διαφοράς δυναμικού μεταξύ δύο φορτισμένων σημείων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση αυτή τόσο μεγαλύτερη είναι η ροή φορτισμένων σωματιδίων μέσω ενός αγώγιμου μέσου. Η μονάδα μέτρησης 1 Volt ορίζεται η δύναμη που θα μεταφέρει ένα coulomb (6,24 x 10¹⁸) φορτίου, όπως ηλεκτρόνια διαμέσω μίας αντίστασης. Τέλος η ηλεκτρόλυση είναι η ηλεκτροχημική διεργασία κατά την οποία πραγματοποιούνται οξειδοαναγωγικές χημικές αντιδράσεις με κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας. Όταν μία ποσότητα άλατος (π.χ. NaCl) εισαχθεί σε ένα διάλυμα στο οποίο εμπεριέχονται ηλεκτρόδια τροφοδοτούμενα από μία πηγή παροχής συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος, εφαρμόζοντας έτσι κατάλληλη διαφορά δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων, λαμβάνουν χώρα οι ακόλουθες ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Στην κάθοδο (αρνητικό ηλεκτρόδιο), όπου υπάρχει περίσσεια ηλεκτρονίων οδεύουν λόγω έλξης τα κατιόντα Na⁺. Φθάνοντας εκεί προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια (αναγωγή) και μεταπίπτουν σε ουδέτερα άτομα. Στην άνοδο (θετικό ηλεκτρόδιο), όπου υπάρχει έλλειψη ηλεκτρονίων οδεύουν τα ανιόντα CI. Εκεί, αποβάλλουν ηλεκτρόνια (οξείδωση) οπότε μεταπίπτουν σε ουδέτερα ασταθή άτομα και στη συνέχεια συνδέονται ανά δύο σχηματίζοντας μόρια χλωρίου. Τα ηλεκτρόνια παράγονται από την πηγή του συνεχούς ρεύματος, φτάνουν από τον εξωτερικό αγωγό στην κάθοδο και εκεί καταναλώνονται σε μια αναγωγική αντίδραση. Άλλα ηλεκτρόνια γεννιούνται στην άνοδο από μια οξειδωτική δράση και απομακρύνονται μέσω αυτής προς την πηγή. Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι η ηλεκτρόλυση είναι το σύνολο των αντιδράσεων οξείδωσης και αναγωγής που λαμβάνουν χώρα όταν σε ένα τήγμα η διάλυμα ηλεκτρολύτη εφαρμόσουμε κατάλληλη διαφορά δυναμικού. Στην περίπτωση όμως ηλεκτρόλυσης υδατικού διαλύματος ηλεκτρολύτη τα πράγματα περιπλέκονται, δηλαδή, οι αντιδράσεις που γίνονται στην κάθοδο ή στην άνοδο δεν είναι πλέον προφανείς, καθώς στο διάλυμα εκτός από τα ιόντα του ηλεκτρολύτη υπάρχουν και μόρια νερού και τα προϊόντα ιοντισμού αυτού H₃O⁺ και OH⁻. Οι ουσίες αυτές μπορούν να πάρουν μέρος στις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Επίσης είναι δυνατόν το ένα ή και τα δύο ηλεκτρόδια να προκαλέσουν δευτερεύουσες αντιδράσεις, είτε με τα προϊόντα της ηλεκτρόλυσης, είτε με το διάλυμα. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου αποτελεί μέτρο της ευκολίας οξείδωσης ή αναγωγής μιας ουσίας και συνεπώς συσχετίζεται με την ευκολία εκφόρτισης των ιόντων στο διάλυμα (Diamond 1970).

Σε γυάλινο beaker 500 mL προσθέσαμε διάλυμα 400 mL υγρής καλλιέργειας και απιονισμένου νερού με αναλογία όγκων 1/1 και σταθερής συγκέντρωσης κυττάρων PCV= 5 μL/mL. Για την παροχή ηλεκτρικής τάσεως στην καλλιέργεια τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά του beaker κατάλληλα ηλεκτρόδια. Στην κάθοδο δηλαδή τον αρνητικό πόλο του κυκλώματος τοποθετήθηκε ηλεκτρόδιο από ψευδάργυρο (Zn) ενώ στον θετικό πόλο, δηλαδή την άνοδο, τοποθετήθηκε ηλεκτρόδιο από χαλκό (Cu).Η ηλεκτρονική ροή, μεταξύ των μετάλλων, επιτυγχάνεται χάρις το φαινόμενο της ηλεκτρολυτικής διάβρωσης. Κατά το φαινόμενο αυτό η ύπαρξη δύο μετάλλων που διαβρέχονται από έναν ηλεκτρολύτη (θρεπτικό μέσο) έχει ως αποτέλεσμα την μετακίνηση ηλεκτρονίων από το ηλεκτροθετικότερο (Cu) προς το ηλεκταρνητικότερο (Zn) μέταλλο με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός θετικού και ενός αρνητικού πόλου στο διάλυμα. Εκμεταλλευόμενη την πολικότητα αυτή που εμφανίζει το διάλυμα εφαρμόσαμε ηλεκτρική τάση που έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά ηλεκτρονίων από τον ψευδάργυρο προς τον χαλκό διαμέσω του θρεπτικού μέσου. Παράλληλα με εξωτερική ηλεκτρονιακή ροή παρατηρείται και μία δευτερεύουσα, μεταξύ των μετάλλων, από την στιγμή που έχουν δημιουργηθεί διαφορετικοί ηλεκτρικοί πόλοι

1. Τα άτομα Zn αποβάλλουν το καθένα δύο ηλεκτρόνια και μετατρέπονται σε ιόντα, που περνάνε στο διάλυμα, με αποτέλεσμα τη σταδιακή «διάλυση» του μετάλλου: $Zn_{(s)} \rightarrow Zn^{2+}_{(aq)}+2e$

2. Τα κατιόντα Cu²⁺ προσλαμβάνουν το καθένα δύο ηλεκτρόνια και μετατρέπονται σε άτομα χαλκού, που ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μεταλλικό χαλκό: Cu²⁺_(aq) +2e⁻→Cu_(s).

Οι αντιδράσεις αυτές επιταχύνονται λόγω της εξωτερικής παροχής ηλεκτρονιακής ροής. Παρότι ο χαλκός δρα ανταγωνιστικά, ως προς την πρόσληψη e από τα κύτταρα (εννοώντας το επαγόμενο από το φως θετικά φορτισμένο φωτοσύστημα ΙΙ – P680⁺), κατά την διάχυση των ηλεκτρονίων ένα μέρος τους ευελπιστούμε ότι θα προσλαμβάνεται από το P680⁺ καθώς εμφανίζει και αυτό, όπως ο χαλκός, θετικό φορτίο ενώ παράλληλα βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση στο διάλυμα. Τα δύο ηλεκτρόδια είχαν συνολικό μήκος 20 cm το καθένα τα 15 εκ' των οποίων είχαν σπειροειδή διαμόρφωση και βυθίζονταν στην καλλιέργεια ενώ μέσω της υπόλοιπης επιφάνειας γινόταν η σύνδεση των ηλεκτροδίων με βολτόμετρο προκειμένου να υπάρχει παροχή σταθερής ηλεκτρικής τάσης. Η όλη πειραματική διαδικασία πραγματοποιείτο σε ειδικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 30°C και σε σταθερή ένταση φωτισμού 110 μ mol.m⁻².s⁻¹. Η καταγραφή της διαφοροποίησης της μοριακής δομής και λειτουργίας φωτοσυνθετικού μηχανισμού του πραγματοποιήθηκε με με την χρήση της τεχνικής του επαγωγικού φθορισμού (βλ. παραπάνω). Το διάλυμα αναδευόταν συνεχώς, μέσω της παροχής αέρα υπό πίεση, πέραν του διαστήματος κατά το οποίο γινόταν η εκάστοτε μέτρηση.

Για να επιβεβαιώσουμε/παρατηρήσουμε καλύτερα την επίδραση της ηλεκτρικής τάσης στην λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε κλειστό σύστημα με τελικό αποδέκτη της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων την υδρογενάση που παράγει H₂. Το σύστημα αποτελούσε δοχείο 1 L με τρεις διαφορετικές, αεροστεγώς κλεισμένες με septum, υποδοχές μία για κάθε ηλεκτρόδιο και μία για την βελόνα δειγματοληψίας.

<u>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>

<u>Γ1. Επιλογή βέλτιστης ασκούμενης τάσης (Volt)</u>

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στόχος μας είναι η μελέτη των επιδράσεων του ηλεκτρικού πεδίου στην φωτοσυνθετική διαδικασία. Προκειμένου λοιπόν να δούμε εάν όντως η φωτοσυνθετική διαδικασία επηρεάζεται από την ύπαρξη ηλεκτρικού πεδίου επιλέχτηκε η άσκηση τριών (3) διαφορετικών ηλεκτρικών τάσεων 5, 7 και 10 Volt, σε καλλιέργειες μικροφυκών όγκου V=400 mL με PCV= 5μL/mL, ούτως ώστε να επιλεχθεί αυτή που το φύκος έδειχνε να προσαρμόζεται καλύτερα προκειμένου να ακολουθήσει περαιτέρω μελέτη του φαινομένου στην επιλεγμένη ένταση. Κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε μετά από τριήμερη επώαση σε ενυδρείο προκειμένου να υπάρχει σταθερή αναλογία καλλιέργειας και dH₂O. Στα 400 mL περιέχονταν 200 mL καλλιέργειας και 200 mL dH₂O αναλογίας 1:1 v/v (2/4 CM). Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη αναλογία όγκων καλλιέργειας και dH₂O είναι πως μετά την τριήμερη επώαση (προκειμένου η ανάπτυξη των φυκών να περάσει από την εκθετική και να εισέλθει στην στατική φάση) η καλλιέργεια εμφάνιζε πολύ υψηλό PCV(10) και μια μικρότερη αναλογία κυττάρων στο διάλυμα θα ενέτεινε τα αποτελέσματα της ηλεκτρικής τάσης στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό καθιστώντας ευκολότερη την μελέτη του φαινομένου. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας 30°C και σε όλα τα πειράματα οι καλλιέργειες αναδεύονταν συνεχώς με την παροχή αέρα υπό πίεση και όχι με μαγνητικό αναδευτήρα προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση μαγνητικού πεδίου στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό.



Εικόνα 9. Ανάλυση της μεταβολής της καμπύλης φθορισμού κατά την άσκηση τάσεως 5 Volt, η οποία παριστάνει την αποδιέγερση μορίων χλωροφύλλης α της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII. Οι μετρήσεις μπορούν να θεωρηθούν εμπιστεύσημες μόνο αφού οξειδωθεί πλήρως ο πρώτος αποδέκτης ηλεκτρονίων του PSII (Q_A) και για τον λόγο αυτό δεν περιλαμβάνονται τιμές πριν το χρονικό διάστημα των 0,03 ms.



Εικόνα 10. Ανάλυση της μεταβολής της καμπύλης φθορισμού κατά την άσκηση τάσεως 7 Volt, η οποία παριστάνει την αποδιέγερση μορίων χλωροφύλλης α της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII. Οι μετρήσεις μπορούν να θεωρηθούν εμπιστεύσημες μόνο αφού οξειδωθεί πλήρως ο πρώτος αποδέκτης ηλεκτρονίων του PSII (Q_A) και για τον λόγο αυτό δεν περιλαμβάνονται τιμές πριν το χρονικό διάστημα των 0,03 ms.



Εικόνα 11. Ανάλυση της μεταβολής της καμπύλης φθορισμού κατά την άσκηση τάσεως 10 Volt, η οποία παριστάνει την αποδιέγερση μορίων χλωροφύλλης α της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII. Οι μετρήσεις μπορούν να θεωρηθούν εμπιστεύσημες μόνο αφού οξειδωθεί πλήρως ο πρώτος αποδέκτης ηλεκτρονίων του PSII (Q_A) και για τον λόγο αυτό δεν περιλαμβάνονται τιμές πριν το χρονικό διάστημα των 0,03 ms.



Εικόνα 12. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής του δείκτη Fv/Fm για 3 διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικών πεδίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 13. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της πρωτογενούς φωτοχημείας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (PSIo) για 3 διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικών πεδίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 14. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) για 3 διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικών πεδίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 15. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας ανά ενεργό φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης (DI_{O/}/RC) για 3 διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικών πεδίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 16. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII (RC/CSo) για 3 διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικών πεδίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 17. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της φωτοσυνθετικής επίδοσης γενικά ανά απορροφώμενη ενέργεια, εκφρασμένη με τον δείκτη Pl(abs) για 3 διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικών πεδίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 18. Σχετικές τιμές της μεταβολής όλων των δεικτών της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μετά από έκθεση της καλλιέργειας του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus για 60 λεπτά σε διαφορετικές εντάσεις ηλεκτρικής τάσης. Κάθε τιμή είναι ομαλοποιημένη ως προς την αρχική ένδειξη που εμφάνιζε το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η ένταση των 5 Volt, με πορτοκαλί των 7 Volt και με πράσινο των 10 Volt ενώ με μαύρο η καλλιέργεια μάρτυρας που δεν εκτέθηκε σε ηλεκτρικό πεδίο. Οι ορισμοί όλων των δεικτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Αρχικά στις καλλιέργειες ασκήθηκαν ηλεκτρικές τάσεις τριών διαφορετικών εντάσεων 5, 7 και 10 V. Στις δύο πρώτες το ηλεκτρικό πεδίο δεν φαίνεται να επηρεάζει τις καμπύλες του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνες 9 και 10). Κατά την άσκηση ηλεκτρικής τάσεως 10 V φάνηκε να επηρεάζεται έστω και οριακά ο φθορισμός όπως παρατηρείται στην Εικόνα 11. Με την άσκηση ηλεκτρικής τάσεως 10 Volt, παρατηρήθηκε μετά από 2 ώρες να εμφανίζεται έντονη συσσωμάτωση των κυττάρων της καλλιέργειας χωρίς όμως το σύστημα να καταρρεύσει. Η έντονη συσσωμάτωση των κυττάρων και ο διαχωρισμός της καλλιέργειας σε δύο φάσεις, μία που περιείχε κύτταρα και μία χωρίς, κατά την άσκηση ηλεκτρικής τάσεως 10 V μπορεί να οφείλεται στην έλξη των κυττάρων προς τον θετικό πόλο του διαλύματος λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν οι μεμβράνες τους (Soomro, Ndikubwimana et al. 2016). Στις υπόλοιπες εντάσεις (5 και7 V) δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο αυτό. Η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση εκφρασμένη ως Fv/Fm (Εικόνα 12), η πρωτογενής φωτοχημική απόσβεση (PSI₀ – Εικόνα 13), αλλά και το μέγεθος της λειτουργικής κεραίας (ABS/RC, Εικόνα 14) που ελέγχει τη φωτοσυνθετική διαχείριση της δεσμευμένης ενέργειας δεν εμφανίζουν ουσιαστικές μεταβολές στα 5 και στα 7 V, ενώ μικρή πτώση καταγράφεται κατά την εφαρμογή 10 V. Τα στοιχεία αυτά μας δείχνουν ότι τα φωτοσυστήματα δεν βρίσκονται σε ιδιαίτερη πίεση διέγερσης (excitation pressure), οπότε ούτε σε συνθήκες έντονης καταπόνησης. Η μη φωτοχημική διάχυσης της ενέργειας (Dl_o/RC, Εικόνα 15) εμφάνισε ανοδική τάση, με την πάροδο του χρόνου, ενώ η φωτοσυνθετική επίδοση ανά απορροφούμενη ενέργεια (PI(abs), Εικόνα 17) πτωτική. Η μεταβολή των τιμών γινόταν εντονότερη με την αύξηση της ασκούμενης ηλεκτρικής τάσης. Η μεγαλύτερη και η πλέον χαρακτηριστική μεταβολή παρατηρήθηκε στην πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων του φωτοσυστήματος ΙΙ (RC/CSo, Εικόνα 16). Οι τρεις διαφορετικοί χειρισμοί παρουσίασαν σημαντική αύξηση (~50%) της πυκνότητας των ενεργών κέντρων μετά από επώαση ενενήντα λεπτών στο ηλεκτρικό πεδίο. Στην συνέχεια ακολούθησε μείωση της συγκέντρωσης των ενεργών κέντρων η οποία ήταν ταχύτερη όσο αυξανόταν η ηλεκτρική τάση (Εικόνα 16). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει, όπως και στις περιπτώσεις των άλλων δεικτών, ότι τα φωτοσυστήματα δεν υπόκειντο σε έντονο stress αφού βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σε τέτοιες περιπτώσεις παρατηρείται μείωση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων και αύξηση του μεγέθους της λειτουργικής κεραίας (ABS/RC) (Demetriou et al., 2007; Yamamoto, Kai et al. 2014). Τα δύο αυτά αποτελέσματα συνδυαστικά μας οδηγούν στην υπόθεση πως ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός προσπαθεί να προσαρμοστεί και να εκμεταλλευτεί την επιπρόσθετη/εξωγενή ηλεκτρονιακή ροή αυξάνοντας σχετικά γρήγορα τον αριθμό των φωτοσυνθετικών ενεργών κέντρων, ίσως μέσω ενεργοποιήσεως ήδη υπαρχόντων ανενεργών ή μέσω σύνθεσης νέων ενεργών κέντρων αντίδρασης. Η συνδυαστική διαφοροποίηση όλων των δεικτών όπως αυτοί παρουσιάζονται στην Εικόνα 18, παραπέμπουν σε de novo

αύξηση των λειτουργικών φωτοσυνθετικών μονάδων. Ενώ μία σειρά δείκτες ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (όπως TRo/RC, ETo/RC, ABS/RC, DIo/RC) παραμένουν σχεδόν σταθεροί, οι ίδιοι δείκτες ανά επιφάνεια (TRo/CS, ETo/CS, ABS/CS, DIo/CS) αυξάνονται σημαντικά κατά περίπου 10%, 40% και 60% μέσα σε μία ώρα επώασης σε ηλεκτρικό πεδίο με τάση 5V, 7V και 10V αντίστοιχα (Εικόνα 18).

Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής σειράς ανέδειξαν την ηλεκτρική τάση των 7V ως την πλέον κατάλληλη για όλες τις πειραματικές προσεγγίσεις που ακολούθησαν.

Γ2. Επίδραση περιεκτικότητας ιόντων του διαλύματος

Η αγωγιμότητα ενός μέσου στο ηλεκτρικό ρεύμα επιδρά στην ταχύτητα διέλευσης των ηλεκτρονίων μέσα σε αυτό. Τα ιόντα που περιέχονται στο διάλυμα αποτελούν τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει την αγωγιμότητα του. Στα προηγούμενα πειράματα ο αριθμός των ιόντων μέσα στο διάλυμα ήταν σταθερός αφού πάντα περιέχονταν 200 mL καλλιέργειας. Ο συγκεκριμένος πειραματικός σχεδιασμός έχει ως στόχο να καταδείξει την επίδραση της περιεκτικότητας των ιόντων στο διάλυμα όταν σε αυτό ασκείται ηλεκτρική τάση. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκαν 2 επιπλέον πειραματικοί σχεδιασμοί διαφορετικής περιεκτικότητας ιόντων από τον αρχικό, όπου η αναλογία όγκου καλλιέργειας και dH₂O ήταν 1:1 v/v (μεσαία περιεκτικότητα ιόντων – 2/4 CM) . Στον ένα χειρισμό, η αναλογία όγκου καλλιέργειας και dH₂O ήταν 3:1 v/v (υψηλή περιεκτικότητα ιόντων – 3/4 CM) ενώ στον άλλο χειρισμό η αναλογία όγκων ήταν 1:3 v/v (χαμηλή περιεκτικότητα ιόντων -1/4 CM). Ο χρόνος εφαρμογής της ηλεκτρικής τάσεως καθορίστηκε στις τέσσερις ώρες βάσει των προηγούμενων μετρήσεων στα 7 V. Τα πειράματα και σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 30°C με ανάδευση μέσω της διοχέτευσης αέρα υπό πίεση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το θρεπτικό μέσο που αναπτύσσονται τα φύκη περιέχει ιόντα και ανάλογα με την αραίωση που πραγματοποιείται στο διάλυμα με dH₂O διαφοροποιούνται και οι τελικές συγκεντρώσεις των ιόντων. Σε μία ηλεκτρική δίοδο, όπως μπορεί να χαρακτηριστεί ο πειραματικός αυτός σχεδιασμός, η ταχύτητα μεταφοράς των e⁻ από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο μεταβάλλεται με την μεταβολή της περιεκτικότητας των ιόντων στο διάλυμα (Diamond 1970).

Στα διαγράμματα που ακολουθούν οι δείκτες Fv/Fm, PSI_o και ABS/RC DI_o/RC, PI(abs) δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δύο χειρισμών (Εικόνες 19, 20, 21, 22, 24). ο δείκτης RC/Cs_o παρουσίασε αισθητή μεταβολή με τον χειρισμό υψηλής περιεκτικότητας ιόντων παρουσιάζοντας ταχύτερη μεταβολή συγκριτικά με τον χειρισμό χαμηλής περιεκτικότητας ιόντων (Εικόνα 23). Από την άλλη η πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων (RC/Cs_o) και στο χειρισμό με χαμηλή συγκέντρωση ιόντων, παρουσίασε υψηλές τιμές αλλά με μεγάλη χρονική καθυστέρηση (Εικόνα 23). Η συνδυαστική διαφοροποίηση όλων των δεικτών μετά από 60 λεπτά έκθεση όλων των χειρισμών (control, 1/4 CM, 2/4 CM, 3/4 CM) σε ηλεκτρικό πεδίο 7V, όπως αυτοί παρουσιάζονται στην Εικόνα 25 παραπέμπουν σε σημαντική διαφοροποίηση της μοριακής δομής και λειτουργείας του Φωτοσυνθετικού μηχανισμού (σημαντική αύξηση των δεικτών RC/CS, TRo/CS, ETo/CS, ABS/CS και Dlo/CS μόνο στους χειρισμούς με μεσαία και υψηλή περιεκτικότητα ιόντων, ενώ στον χειρισμό με χαμηλή περιεκτικότητα ιόντων δεν παρατηρήθηκε καμία αξιόλογη μεταβολή (Εικόνα25).



Εικόνα 19. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής του δείκτη Fv/Fm για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ενώ με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 20. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής του δείκτη της πρωτογενούς φωτοχημείας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού PSIo για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ενώ με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 21. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ενώ με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 22. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας ανά ενεργό φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης (DIo/RC) για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ενώ με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 23. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII (RC/CS₀) για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ενώ με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 24. Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της φωτοσυνθετικής επίδοσης γενικά ανά απορροφώμενη ενέργεια, εκφρασμένη με τον δείκτη Pl(abs) για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ενώ με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων. Όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς την τιμή που εμφάνιζαν τα δείγματα πριν την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στο διάγραμμα περιέχονται και τυπικές αποκλίσεις.



Εικόνα 25. Σχετικές τιμές της μεταβολής όλων των δεικτών της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μετά το πέρας 60 λεπτών για δείγματα με διαφορετική περιεκτικότητα ιόντων. Κάθε τιμή είναι ομαλοποιημένη ως προς την αρχική ένδειξη που εμφάνιζε το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται ο χειρισμός με υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων (3/4 CM) με μαύρο αυτός με χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων (1/4 CM), με πράσινο ο χειρισμός μέσης περιεκτικότητας ιόντων (2/4 CM) ενώ με μπλε η καλλιέργεια μάρτυρας (καλλιέργεια μέσης περιεκτικότητας ιόντων που δεν εκτέθηκε σε ηλεκτρικό πεδίο).

<u>Γ3. Μοντέλο συμβατότητας της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων με</u> τη τεχνική ροή ηλεκτρονίων ενός ηλεκτρικού πεδίου

Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να εξηγηθούν με την εξής παραδοχή: Τα ενεργά κέντρα αντίδρασης PSII διεγείρονται από την ηλιακή ενέργεια, που μεταφέρεται μέσω του LHCII στο P₆₈₀. Η διέγερση του P₆₈₀ (P₆₈₀*) επάγει την μεταφορά ηλεκτρονίων και ως συνέπεια έχουμε την οξείδωση του σε P₆₈₀⁺. Σε αυτή την φάση η ανατροφοδότηση ηλεκτρονίων προς το P₆₈₀⁺ (και η μετατροπή του σε P₆₈₀) πραγματοποιείται από την φωτόλυση του νερού (που λαμβάνει χώρα στο φωτοσύστημα II) με αποτέλεσμα και την απελευθέρωση O₂. Στη φάση αυτή, όπου το ενεργό κέντρο αντίδρασης του PSII είναι οξειδωμένο (P₆₈₀⁺) και βρίσκεται σε ένα τεχνητό ηλεκτρικό πεδίο, μπορεί να λάβει τα ηλεκτρόνια απευθείας από το ηλεκτρικό πεδίο αντί από την φωτόλυση του νερού. Αυτό θα σημάνει άμεση αναγωγή του κέντρου αντίδρασης (P₆₈₀). Το κέντρο τώρα είναι «ανοικτό» και είναι διαθέσιμο πάλι για διέγερση χωρίς να υπάρχει πίεση διέγερσης του (βλ. απλοποιημένο μοντέλο επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό – Εικόνα 26). Αυτό ενδεχομένως είναι και το σήμα ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μπορεί να διαχειριστεί περισσότερη ηλιακή ενέργεια με αποτέλεσμα να αυξηθούν σημαντικότατα τα ενεργά κέντρα αντίδρασης (RC/CS) και να συμπαρασύρουν όλους τους επιμέρους παράγοντες μίας ενεργής φωτοσυνθετικής μονάδας, μεταξύ των οποίων και η φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ΕΤο/CS).



Εικόνα 26. Απλοποιημένο μοντέλο της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου στην λειτουργεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η ηλεκτρονιακή ροή λόγω της παρουσίας ηλεκτρικού πεδίου ενώ με μπλε η ενδογενής μεταφορά ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού λόγω της φωτόλυσης του νερού που λαμβάνει χώρα στο φωτοσύστημα ΙΙ.

Εάν αυτός ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι σωστός τότε η αυξημένη ροή ηλεκτρονίων δεν θα συνοδεύεται και από αυξημένη φωτοσυνθετική παραγωγή Ο₂. Πολαρογραφικές μετρήσεις που έγιναν σε καλλιέργειες εκτεθειμένες σε ηλεκτρικό πεδίο 7V σε σχέση με καλλιέργειες μάρτυρα, έδειξαν ξεκάθαρα ότι η

φωτοσυνθετική παραγωγή είναι σημαντικά χαμηλότερη στην καλλιέργεια που είχε εκτεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα, ενώ η αναπνευστική δραστηριότητα (μιτοχονδριακή κατανάλωση O₂ παραμένει αμετάβλητη (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Γραφική απεικόνιση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και αναπνοής ως ρυθμός παραγωγής ή κατανάλωσης O₂ αντίστοιχα, σε καλλιέργειες που εκτέθηκαν η όχι σε ηλεκτρικό πεδίο. Ως control αναπαρίσταται ο χειρισμός που δεν εκτέθηκε σε ηλεκτρικό πεδίο ενώ με Η.Π. ο άλλος χειρισμός που εκτέθηκε.

<u>Γ4. Εφαρμογή τάσης σε πλήρως σκοτεινό διάλυμα</u>

Τα προηγούμενα πειράματα μας παρείχαν αρκετές ενδείξεις ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός όχι μόνο προσαρμόζεται αλλά παράλληλα προσπαθεί να εκμεταλλευθεί την επιπρόσθετη πηγή ηλεκτρονίων που του παρέχεται μέσω της άσκηση ηλεκτρικής τάσεως στην καλλιέργεια. Προκειμένου όμως να υπάρξει οριστική επιβεβαίωση της παρατήρησης αυτής και να μην μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετική αιτία (όπως στην παρουσία ανιόντων χαλκού στο διάλυμα) η διαδραμάτιση του φαινομένου αυτού, πραγματοποιήθηκε ο παρακάτω πειραματικός χειρισμός όπου μελετήθηκε η επίδραση ηλεκτρικής τάσεως των 7 V στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό υγρής καλλιέργειας όγκου V=400 mL με PCV= 5μL/mL χωρίς αυτή να εκτίθεται στο φως, οπότε χωρίς τη λειτουργία της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Στα 400 mL περιέχονταν 200 mL καλλιέργειας και 200 mL dH₂O δηλαδή μια αναλογία 1:1 v/v (χειρισμός 2/4 CM). Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας στους 30°C με ανάδευση μέσω της παροχής αέρα υπό πίεση. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι δείκτες που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (μεταξύ αυτών και ο RC/CS_o) παραμένουν ουσιαστικά αδιαφοροποίητοι (Εικόνα 28) σε αντίθεση με τον χειρισμό όπου η καλλιέργεια ήταν εκτεθειμένη στο φως (Εικόνες 18 και 25). Αυτό υποδηλώνει ξεκάθαρα ότι το φαινόμενο που παρουσιάσαμε παραπάνω έχει σχέση με τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων. Όταν αυτή δεν λειτουργεί (σε συνθήκες σκότους) η επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου είναι ανύπαρκτη.



Εικόνα 28. Σχετικές τιμές της μεταβολής όλων των δεικτών της μοριακής δομής και λειτουργείας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καλλιέργειας του μικροφύκους που εκτέθηκε σε ηλεκτρικό πεδίο σε συνθήκες σκότους για μία ώρα (μπλε γραμμή - 2/4 CM) σε σχέση με αντίστοιχη καλλιέργεια μάρτυρα (χωρίς την έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο - μαύρη γραμμή - Control).

Όπως παρατηρείται μεταξύ των δύο χειρισμών δεν σημειώνονται σημαντικές μεταβολές σε κανέναν από τους δείκτες που παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα. Το γεγονός αυτό αποτελεί την επιβεβαίωση της συμβατότητας της e⁻ ροής μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αφού το παρατηρούμενο φαινόμενο δεν εμφανίζεται απουσία φωτονιακού ερεθίσματος και επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε πως η αύξηση της πυκνότητας των ενεργών

φωτοσυνθετικών κέντρων αποτελεί μια προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε περιβάλλοντα υψηλότερης e⁻ ροής, όπως αυτό διατυπώθηκε στο παραπάνω προτεινόμενο μοντέλο λειτουργίας (Εικόνα 26).

<u>Γ5. Η συμβατότητα φωτοσυνθετικής και τεχνικής ροής ηλεκτρονίων</u> οδηγεί σε μηχανισμό υψηλής παραγωγής υδρογόνου (H₂)

Όλα τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι η έκθεση των χλωροφυκών σε ηλεκτρικό πεδίο σε συνθήκες φωτισμού αυξάνει την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων μειώνοντας ταυτόχρονα την φωτοσυνθετική απελευθέρωση οξυγόνου (βλ. Εικόνα 26). Ως εκ τούτου, θεωρητικά, η διεξαγωγή του πειράματος σε ένα κλειστό σύστημα θα μπορούσε να οδηγήσει άμεσα στην έκφραση της υδρογενάσης και στην μοριακού Η₂. Για την εξακρίβωση αυτής της δυνατότητας παραγωγή πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υδρογόνου (H₂) και οξυγόνου (O₂) με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD) (Shimadzu GC 2010 Plus, Kyoto, Japan), με φέρον αέριο Αργό (5bar Πίεση - 23.5 mL min⁻¹). 1mL αέριου δείγματος εγχεόταν στην GC-TCD μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, όπου και ο διαχωρισμός του Η₂ και του Ο₂ γινόταν με βάση τη θερμική αγωγιμότητα των αερίων. Η ποσοτικοποίηση των αερίων έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς για γνωστές ποσότητες των αερίων. Οι παρακάτω πειραματικοί χειρισμοί έχουν ως στόχο να αναδείξουν τις βέλτιστες συνθήκες κάτω από τις οποίες καλλιέργειες μικροφυκών που βρίσκονται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου έχουν την δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό σε κλειστό σύστημα τοποθετήθηκαν 500 mL διαλύματος (σε φιάλη του 1L που κλείνει αεροστεγώς με septum) το οποίο αποτελείτο από ισόποση ποσότητα καλλιέργειας και απιονισμένου νερού (2/4 CM). Η τελική συγκέντρωση κυττάρων στο διάλυμα ήταν 5 μL PCV/mL και η ασκούμενη ηλεκτρική τάση 7V. Σε όλους τους χειρισμούς χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη (0,5g/L) ως συμπληρωματική πηγή άνθρακα-ενέργειας για την παραγωγή H₂ (Papazi et al., 2012). Στους παρακάτω πειραματικούς χειρισμούς ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια η οποία αποστειρώθηκε στους 120°C και της ασκήθηκε ηλεκτρική τάση αφού περιμέναμε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 29, γκρι χρώμα), καθώς και θρεπτικό μέσο χωρίς να περιέχει κύτταρα (Εικόνα 29, κίτρινο χρώμα). Οι συγκεκριμένοι χειρισμοί χρησιμοποιήθηκαν με στόχο να διαφοροποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί η παραγωγή Η₂ μέσω της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου από την παραγωγή Η₂ μέσω της υδρόλυσης του νερού (Εικόνα 29). Η αποστείρωση της καλλιέργειας εξασφαλίζει την μη ενεργότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των μικροφυκών και της υδρογενάσης, ενώ παράλληλα διατηρείται η ίδια αγωγιμότητα του διαλύματος στο ηλεκτρικό ρεύμα με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Οι δύο άλλοι πειραματικοί χειρισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είχαν διαφορά ως προς το

περιβάλλον στο οποίο εκτίθεντο τα κύτταρα, στην μία περίπτωση (Εικόνα 29, μπλε χρώμα) επικρατούσαν ανοξικές συνθήκες ενώ στην άλλη (πορτοκαλί χρώμα) όχι. Η επίτευξη ανοξικών συνθηκών πραγματοποιήθηκε με την επώαση του διαλύματος στο κλειστό δοχείο για χρονικό διάστημα 3 ημερών και την μετέπειτα εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Στην άλλη περίπτωση υπήρξε άμεση εφαρμογή της ηλεκτρικής τάσης με το που τοποθετήθηκε η καλλιέργεια στο κλειστό σύστημα.



Εικόνα 29. Παραγωγή H₂ σε κλειστό σύστημα λόγω άσκησης ηλεκτρικής τάσης 7 Volt. Με μπλε χρώμα αναπαρίσταται η καλλιέργεια στην οποία επικρατούν ανοξικές συνθήκες, με πορτοκαλί η καλλιέργεια όπου υπάρχει διαθέσιμο O₂ στο σύστημα, ενώ με γκρι και κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι χειρισμοί μάρτυρες που περιέχουν νεκρά κύτταρα η μόνο θρεπτικό μέσο αντίστοιχα.

Όπως παρατηρούμε και στις δύο περιπτώσεις που υπάρχουν ζωντανά κύτταρα παρατηρείται σαφώς υψηλότερη (υπερδιπλάσια) παραγωγή H₂ γεγονός το οποίο οφείλεται στην λειτουργία της υδρογενάσης. Η υψηλότερη παραγαγωγή H₂ (1,7L/L PCV σε διάρκεια μόλις 5 ωρών) παρατηρήθηκε στο χειρισμό με τριήμερη επώαση, αποτέλεσμα αναμενόμενο από την στιγμή που δεν σπαταλάται χρόνος για να επιτευχθούν ανοξικές συνθήκες όπως συμβαίνει στον άλλο χειρισμό. Για να επιβεβαιωθεί ότι η επιπρόσθετη παραγωγή H₂ οφείλεται στην ενεργότητα της υδρογενάσης και όχι στην αύξηση του ρυθμού ηλεκτρόλυσης του διαλύματος, όπως

συμβαίνει σε περιπτώσεις που δεν χρησιμοποιούνται αδρανή ηλεκτρόδια, παρουσίαζεται παρακάτω κινητική μελέτη του ρυθμού παραγωγής H₂ ανα ώρα συγκρινόμενη πάντα με τον εκάστοτε ρυθμό παραγωγής H₂ στον χειρισμό μάρτυρα για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 30. Ρυθμός παραγωγής H₂ ανά ώρα λόγω άσκησης ηλεκτρικής τάσης 7 Volt. Με μπλε χρώμα αναπαρίσταται η καλλιέργεια στην οποία επικρατούν ανοξικές συνθήκες, με πορτοκαλί η καλλιέργεια όπου υπάρχει διαθέσιμο O₂ στο σύστημα, ενώ με γκρι και κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι χειρισμοί μάρτυρες που περιέχουν νεκρά κύτταρα η μόνο θρεπτικό μέσο αντίστοιχα.

Όπως γίνεται σαφές από το σχήμα στους χειρισμούς που περιέχονται κύτταρα (μπλε πορτοκαλί) υπάρχει αυξημένος ρυθμός παραγωγής H_2 συγκριτικά με τους χειρισμούς μάρτυρες (γκρι, κίτρινο). Ιδιαίτερα αυξημένος παρουσιάζεται ο ρυθμός παραγωγής H_2 για τις 4 πρώτες ώρες που ασκείται ηλεκτρική τάση στις καλλιέργειες. Το χρονικό διάστημα αυτό συμπίπτει με την αύξηση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων όπως παρουσιάστηκε στην εικόνα 16 γεγονός το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αυξημένη παραγωγή H_2 οφείλεται στην ενεργότητα της υδρογενάσης. Επειδή όμως παράλληλα υπάρχει και αύξηση του ρυθμού παραγωγής του H_2 και στους χειρισμούς μάρτυρες, λόγω της υδρόλυσης του νερου, δεν μπορεί να αποδοθεί με ακρίβεια στην συγκεκριμένη εικόνα τι ποσοστό της παραγωγής H_2 οφείλεται καθαρά στην ενεργότητα του ενζύμου. Για τον λόγο αυτόν στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το ίδιο δίαγραμμα με την διαφορά ότι όλες οι τιμές είναι κανονικοποιημένες ως προς τον χειρισμό που περιείχε τα νεκρά κύτταρα (γκρι χρώμα) προκειμένου να μην συμπεριλαμβάνεται η αύξηση της παραγωγής H_2 λόγω της αύξησης του ρυθμού υδρόλυσης του νερού.



Εικόνα 31. Ρυθμός παραγωγής H₂ ανά ώρα (σχετικές τιμές) λόγω άσκησης ηλεκτρικής τάσης 7 Volt, όπου όλες οι τιμές είναι ομαλοποιημένες ως προς τον χειρισμό που περιείχε τα νεκρά κύτταρα (γκρι χρώμα). Με μπλε χρώμα αναπαρίσταται η καλλιέργεια στην οποία επικρατούν ανοξικές συνθήκες, με πορτοκαλί η καλλιέργεια όπου υπάρχει διαθέσιμο O₂ στο σύστημα, ενώ με γκρι και κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι χειρισμοί μάρτυρες που περιέχουν νεκρά κύτταρα η μόνο θρεπτικό μέσο αντίστοιχα.

Η παραπάνω εικόνα καθιστά σαφές πως όταν επικρατούν ανοξικές συνθήκες υπάρχει ταχύτερη παραγωγή υδρογόνου στο διάλυμα λόγω της λειτουργίας της υδρογενάσης. Ακόμα συγκρίνοντας την συγκεκριμένη εικόνα στην περίπτωση που έχουν επιτευχθεί ανοξικές συνθήκες (μπλε γραμμή) με την εικόνα 16 παρατηρούμε ότι ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής H₂ παρατηρείται στο χρονικό διάστημα 60-120 λεπτών όπου η πυκνότητα των ενεργών κέντρων παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές (Εικόνα 16) και ακολουθεί φθήνουσα πορεία, ανάλογη με αυτήν που εμφανίζει η πυκνότητα των ενεργών κέντρων, εως ότου ο ρυθμός παραγωγής H₂ στον χειρισμό αυτόν, εξισωθεί με τον ρυθμό παραγωγής H₂ λόγω υδρόλυσης του νερού (γκρι) μετά από 5 ώρες. Στο χρονικό διάστημα 60-120 λεπτών ο ρυθμός παραγωγής H_2 λόγω της ενεργότητας της υδρογενάσης είναι κατά 110% υψηλότερος από τον αντίστοιχο που οφείλεται στην υδρόλυση του νερού. Ο χειρισμός κατά τον οποίο υπάρχει άμεση εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης (πορτοκαλί χρώμα) εμφανίζει έναν ενδιάμεσο ρυθμό παραγωγής H₂ και ακολουθεί και αυτός πτωτική τάση μετα το πέρας τεσσάρων ωρών. Ο λόγος που ο χειρισμός αυτός εμφανίζει ετεροχρονισμένη κορυφή 2 ώρες αργότερα μπορεί να οφείλεται στην παρουσία O2 στον κλειστό σύστημα, που παρεμποδίζει την λειτουργεία της υδρογενάσης, και άρα απαιτείται κάποιο χρονικό διάστημα ώστε να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής Η₂.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής ηλεκτρικής τάσης στην μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus. Με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διερευνήθηκε η επίδραση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου καθώς και η περιεκτικότητα της καλλιέργειας σε ιόντα, στην δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αναφορικά με την δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και στις 3 διαφορετικές ηλεκτρικές τάσεις που ασκήθηκαν (5,7,10 V) παρατηρήθηκε αύξηση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων (Εικόνα 16) η οποία με την σειρά της συμπαρέσυρε σημαντικές αλλαγές πολλών ακόμα παραμέτρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως για να προσαρμοστεί ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός στην εξωτερική ροή ηλεκτρονίων είτε ενεργοποιεί απενεργοποιημένα ενεργά κέντρα είτε συνθέτει καινούρια, χωρίς όμως να ασκεί επιπρόσθετη πίεση διέγερσης στα είδη υπάρχοντα. Προκειμένου να υπάρξει η ενεργοποίηση επιπρόσθετων ενεργών κέντρων απαραίτητη φάνηκε να είναι η προϋπάρχουσα φωτονιακή διέγερση του P₆₈₀ αφού όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 28, απουσία φωτονιακού ερεθίσματος δεν παρατηρούνται αξιόλογες μεταβολές στην φωτοσυνθετική μονάδα. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στην διατύπωση ενός μοντέλου σύμφωνα με το οποίο η διεγερμένη κατάσταση του P₆₈₀ (P₆₈₀⁺) έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από την εξωτερική ροή ηλεκτρονίων, ανάγοντας το, καθιστώντας έτσι εφικτή την εκ νέου μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω αυτού χωρίς να απαιτείται προηγουμένως φωτόλυση του νερού που λαμβάνει χώρα στο φωτοσύστημα ΙΙ (Εικόνα 26). Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μειωμένη φωτοσυνθετικής παραγωγή Ο2 ενώ ο μιτοχονδριακός ρυθμός αναπνοής διατηρείται σταθερός (Εικόνα 27). Τέλος δείχθηκε πως αύξηση της ιοντικής ισχύς αλλά και της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου οδηγούν σε ταχύτερη εκδήλωση του φαινομένου αυτού αλλά ταυτόχρονα μειώνουν την διάρκεια του (Εικόνες 18, 25).

Όλα τα πειράματα ανέδειξαν μία πολυεπίπεδη πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να προσαρμόζει τη μοριακή του δομή και λειτουργία ανάλογα με τις συνθήκες έκθεσης του στο περιβάλλον. Η δυνατότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να μεταφέρει (εξω)ηλεκτρόνια (ηλεκτρόνια ενός τεχνητού ηλεκτρικού πεδίου) μέσω φωτοσυνθετικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, όσο και η υψηλή προσαρμοστικότητα (συμβατότητα) που ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εμφάνισε σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικής τάσης ηλεκτρικού φορτίου, παρουσιάζεται για πρώτη φορά και ανοίγει νέους δρόμους για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως παραγωγή μοριακού υδρογόνου (H₂) μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Για να επιβεβαιώσουμε/παρατηρήσουμε καλύτερα την επίδραση της ηλεκτρικής τάσης στην λειτουργεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε κλειστό σύστημα προκειμένου να δούμε εάν υπάρχει παραγωγή H₂. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 29, σε καλλιέργειες που περιέχουν ζωντανά κύτταρα παρουσιάζεται ως και 70% αύξηση στην παραγωγή H₂ συγκριτικά με την αντίστοιχη που προέρχεται από την υδρόλυση του νερού. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση του ενζύμου της υδρογενάσης καθώς παρατηρείται παράλληλα μείωση της φωτοσυνθετικής παραγωγής O₂ ενώ ο μιτοχονδριακός ρυθμός αναπνοής διατηρείται σταθερός με αποτέλεσμα το σύστημα να οδηγείται σε συνθήκες ανοξίας. Με βάση την προηγούμενη παρατήρηση μπορούμε να συμπεράνουμε πως το ηλεκτρικό πεδίο επιδρά στην αυξημένη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων (Εικόνα 26) που οδηγούνται (λόγω της καθιέρωσης υποξικών συνθηκών) στην υδρογενάση που τα μετατρέπει σε μοριακό υδρογόνο. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων , πέραν της υδρογενάσης, έχει ακόμη πολλούς αποδέκτες ηλεκτρονίων, όπως περιεγράφηκαν στην παράγραφο Α.2.3, και επομένως η επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή ροή, λόγω του ηλεκτρικού πεδίου, είναι πιθανό να ενσωματώνεται στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και σε άλλα σημεία πέραν του οξειδωμένου κέντρου αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ (P₆₈₀⁺).

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams W. W., and Demmig-Adams B. (1992). Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. <u>Planta</u> **186**(3): 390-398.
- Andreadakis, A. and Kotzabasis K. (1996). The role of polyamines in the chloroplast photodevelopment. Changes in the biosynthesis and catabolism of the polyamines in isolated plastids during the chloroplast photodevelopment. J. Photochem. Photobiol. **B33**:163-170.
- Bautista A. I. and Necchi-Junior O. (2008). Photoacclimation in a tropical population of Cladophora glomerata (L.) Kutzing 1843 (Chlorophyta) from southeastern Brazil. <u>Braz J Biol</u> **68**(1): 129-136.
- Beigbeder A. and Kotzabasis K. (1994). The influence of exogenously supplied spermine on protochlorophyllide and chlorophyll biosynthesis. J. Photochem. Photobiol. B23:201-206.
- Beigbeder A., Vavadakis M., Navakoudis E. and Kotzabasis K. (1995). Influence of polyamine inhibitors on the Light-independent and the light-dependent chlorophyll biosynthesis, and on the photosynthetic rate. <u>J. Photochem.</u> <u>Photobiol.</u> **B28**:235-242.
- Demetriou G., Neonaki C., Navakoudis E. and Kotzabasis K. (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus the protective role of polyamines. <u>Biochim Biophys Acta</u> **1767**(4): 272-280.
- Diamond J. M. (1970). "An inductive conductivity meter for monitoring the salinity of dialysis water." <u>IEEE Trans Biomed Eng</u> **17**(2): 109-117.
- Dörnemann D., Navakoudis E. and Kotzabasis K. (1996). Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wild type and pigment mutants of the unicellular greenalga Scenedesmus obliquus and their possible role in chloroplast photodevelopment. J. Photochem. Photobiol. **B36**: 293-299.
- Gaffron H. (1939). Der auffalende Unterschied in der Physiologie nahe verwandter Algenstaemme nebst Bemerkungen über die Lichtatmung. <u>Biologisches Zentralblatt</u> **43**: 402-410.
- Gray G. R., Savitch L. V., Ivanov A. G. and Huner N. (1996). "Photosystem II Excitation Pressure and Development of Resistance to Photoinhibition (II. Adjustment of Photosynthetic Capacity in Winter Wheat and Winter Rye)." <u>Plant Physiol</u> **110**(1): 61-71.

- Green B.R., Anderson J.M. and Parson W.W. (2003). "Photosynthetic membranes and their light harvesting antennas" *in Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol.13, Light Harvesting Antennas in Photosynthesis.
- Haehnel W. (1984). Photosynthetic electron transport in higher plants. *Ann.Rev.PlantPhysiol.* **35**, 659–693.
- Horton P., Ruban A. V. and Walters R. G. (1996). "Regulation of Light Harvesting in Green Plants." <u>Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol</u> **47**: 655-684.
- Huner N. P., Bode R., Dahal K., Hollis L., Rosso D., Krol M. and Ivanov A. G. (2012). "Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the "grand design of photosynthesis" revisited." <u>Front Plant Sci</u> 3: 255.
- Ioannidis N. E., Cruz J. A., Kotzabasis K. and Kramer D. M. (2012). "Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit." <u>PLoS One</u> 7(1): e29864.
- Ioannidis N. E. and Kotzabasis K. (2007). "Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> 1767(12): 1372-1382.
- Ioannidis N. E. and Kotzabasis K. (2014). "Polyamines in chemiosmosis in vivo: A cunning mechanism for the regulation of ATP synthesis during growth and stress." <u>Front Plant Sci</u> 5: 71.
- Ioannidis N. E., Sfichi-Duke L. and Kotzabasis K. (2011). "Polyamines stimulate non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in Scenedesmus obliquus." <u>Photosynth Res</u> 107(2): 169-175.
- Ioannidis N. E., Sfichi L. and Kotzabasis K. (2006). "Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1757**(7): 821-828.
- Kautsky H., Hirsch A. (1931). Neue versuche zur kohlenfaure-assimilation. <u>Naturwissenschaften</u> **19**(48): 964.
- Kotakis C., Theodoropoulou E., Tassis K., Oustamanolakis C., Ioannidis N. E. and Kotzabasis K. (2014). "Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress." J Plant Physiol **171**(2): 48-51.
- Kotzabasis K., Fotinou C., Roubelakis-Angelakis K. A. and Ghanotakis D. (1993). "Polyamines in the photosynthetic apparatus : Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine." <u>Photosynth Res</u> **38**(1): 83-88.
- Kotzabasis K. and Senger H. (1994). "Free, conjugated and bound polyamines during the cell cycle in synchronized cultures of Scenedesmus obliquus." <u>Z</u> <u>Naturforsch C</u> 49(3-4): 181-185.
- Logothetis K., Dakanali S., Ioannidis N. and Kotzabasis K. (2004). "The impact of high CO2 concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines." J Plant Physiol **161**(6): 715-724.

- Lutz C., Navakoudis E., Seidlitz H. K. and Kotzabasis K. (2005). "Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1710**(1): 24-33.
- Malliarakis D., Tsiavos T., Ioannidis N. E. and Kotzabasis K. (2015). "Spermine and lutein quench chlorophyll fluorescence in isolated PSII antenna complexes." J <u>Plant Physiol</u> 183: 108-113.
- Maxwell D. P., Falk S. and Huner N. (1995). "Photosystem II Excitation Pressure and Development of Resistance to Photoinhibition (I. Light-Harvesting Complex II Abundance and Zeaxanthin Content in Chlorella vulgaris)." <u>Plant Physiol</u> 107(3): 687-694.
- Maxwell D. P., Laudenbach D. E. and Huner N. (1995). "Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and cab mRNA Abundance in Dunaliella salina." <u>Plant</u> <u>Physiol</u> 109(3): 787-795.
- Miskiewicz E., Ivanov A. G., Williams J. P., Khan M. U., Falk S. and Huner N. P. (2000). "Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, Plectonema boryanum UTEX 485, to temperature and light." <u>Plant Cell Physiol</u> **41**(6): 767-775.
- Navakoudis E., Ioannidis N. E., Dörnemann D. and Kotzabasis K. (2007). "Changes in the LHCII-mediated energy utilization and dissipation adjust the methanol-induced biomass increase." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1767**(7): 948-955.
- Navakoudis E., Lutz C., Langebartels C., Lutz-Meindl U. and Kotzabasis K. (2003).
 "Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1621(2): 160-169.
- Nelson N. (2013). "Evolution of photosystem I and the control of global enthalpy in an oxidizing world." <u>Photosynth Res</u> **116**(2-3): 145-151.
- Nelson N. and Ben-Shem A. (2004). "The complex architecture of oxygenic photosynthesis." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **5**(12): 971-982.
- Nelson N. and Ben-Shem A. (2005). "The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis." <u>Bioessays</u> **27**(9): 914-922.
- Ort D. R. and Melis A., (2011). "Optimizing antenna size to maximize photosynthetic efficiency." <u>Plant Physiol</u> **155**(1): 79-85.
- Papazi A., Andronis E., Ioannidis N.E., Chaniotakis N. and Kotzabasis K. (2012). High yields of hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols biodegradation from the green alga Scenedesmus obliquus. <u>PLoS ONE</u> 7(11): e49037.
- Sane P. V., Ivanov A. G., Hurry V., Huner N. P. and Oquist G. (2003). "Changes in the redox potential of primary and secondary electron-accepting quinones in

photosystem II confer increased resistance to photoinhibition in low-temperature-acclimated Arabidopsis." <u>Plant Physiol</u> **132**(4): 2144-2151.

- Sfakianaki M., Sfichi L. and Kotzabasis K. (2006). "The involvement of LHCIIassociated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature." J Photochem Photobiol B **84**(3): 181-188.
- Sfichi-Duke L., Ioannidis N. E. and Kotzabasis K. (2008). "Fast and reversible response of thylakoid-associated polyamines during and after UV-B stress: a comparative study of the wild type and a mutant lacking chlorophyll b of unicellular green alga Scenedesmus obliquus." <u>Planta</u> **228**(2): 341-353.
- Sfichi L., Ioannidis N. and Kotzabasis K. (2004). "Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes." <u>Photochem Photobiol</u> **80**(3): 499-506.
- Soomro R. R., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Lin L. and Danquah M. K. (2016). "Development of a Two-Stage Microalgae Dewatering Process - A Life Cycle Assessment Approach." <u>Front Plant Sci</u> 7: 113.
- Strasser B.J., Strasser R.J. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test in Mathis, P. (ed.) Photosynthesis: from Light to Biosphere, Springer Netherlands. p.977-980 ISBN: 978-94-009-0173-5.
- Tsiavos T., Ioannidis N. E. and Kotzabasis K. (2012). "Polyamines induce aggregation of LHC II and quenching of fluorescence in vitro." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **1817**(5): 735-743.
- Tsiavos T., Ioannidis N. E., Tsortos A., Gizeli E. and Kotzabasis K. (2015). "Spermine is a potent modulator of proton transport through LHCII." <u>J Plant Physiol</u> 177: 44-50.
- Tsolakis G., Parashi E., Galland P. and Kotzabasis K. (1999). "Blue light signaling chains in Phycomyces: phototransduction of carotenogenesis and morphogenesis involves distinct protein kinase/phosphatase elements." <u>Fungal Genet Biol</u> 28(3): 201-213.
- Xu D. Q., Chen Y. and Chen G. Y. (2015). "Light-harvesting regulation from leaf to molecule with the emphasis on rapid changes in antenna size." <u>Photosynth Res</u> **124**(2): 137-158.
- Yamamoto Y., Kai S., Ohnishi A., Tsumura N., Ishikawa T., Hori H., Morita N. and Ishikawa Y. (2014). "Quality control of PSII: behavior of PSII in the highly crowded grana thylakoids under excessive light." <u>Plant Cell Physiol</u> **55**(7): 1206-1215.