

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«Ανάπτυξη τεχνικών φασματομετρίας μάζας και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για τη μελέτη της επίδρασης των Ni(II), As(V), Se(VI) στην ακορεστότητα των λιπιδίων των μικροαλγών *Chlamydomonas reinhardtii* και *Chlorella sorokiniana*»**

**ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**

**Υπεύθυνος Καθηγητής: Σπυρίδων Α. Περγαντής**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
MASTERS OF CHEMISTRY PROGRAMME**



**MASTER THESIS**

**«Development of mass spectrometric and nuclear magnetic resonance techniques for investigating the effect of Ni(II), As(V), and Se(VI) on lipid saturation in *Chlamydomonas reinhartii* and *Chlorella sorokiniana*»**

**STERGIOU EVANGELOS**

**Master Thesis Supervisor: Spiros A. Pergantis**

**HERAKLION 2022**

## **Εξεταστική Επιτροπή**

### **Περγαντής Σπυρίδων**

*Καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας,  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

### **Απόστολος Σπύρος**

*Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής και  
Περιβαλλοντικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

### **Λυδάκης – Σημαντήρης Νικόλαος**

*Καθηγητής, Τομέας Φυτοπροστασίας και Βιοτεχνολογικών  
Εφαρμογών, Τμήμα Γεωπονίας, Ελληνικό Μεσογειακό  
Πανεπιστήμιο*

*Στην οικογένεια μου...*

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε ώστε να ολοκληρώσω τις μεταπτυχιακές σπουδές μου. Επίσης, ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Ωνάση, το οποίο με την υποτροφία του με στήριξε και ενθάρρυνε τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Εν συνεχεία, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Σπύρο Περγαντή που εκτιμώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Η καθοδήγηση του ήταν πολύτιμη και οι συζητήσεις μας ήταν πάντα εποικοδομητικές.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δρ Απόστολο Σπύρο και Δρ. Νικόλαο Λυδάκη που εκτός από την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της εργασίας μου, συνέβαλαν σημαντικά με τη πολύτιμη βοήθεια τους στο κομμάτι της φασματοσκοπίας NMR και της ανάπτυξης και διαχείρισης των κυτταρικών καλλιεργειών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου μας, Μαυράκη Μάνο και Πανάγου Τζορτζίνα, για τις συμβουλές τους, την εξαιρετική συνεργασία μας και το φιλικό περιβάλλον που επικρατούσε στο εργαστήριο· είναι επιστήμονες με λαμπρό μέλλον.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Στέργιο, τη μητέρα μου Κωνσταντίνα και τον αδερφό μου Θανάση για την αγάπη και τη στήριξη τους από τα πρώτα βήματα της ζωής μου.

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας των  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα λιπίδια των κύτταρων *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1690 wild type) και *Chlorella sorokiniana* μέσω φασματομετρίας μάζας και φασματοσκοπίας NMR. Οι πρώτες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* που είχαν αναπτυχθεί παρουσία  $Ni^{2+}$  μέσω της τεχνικής της φασματομετρίας μάζας εκρόφησης υπερηχητικού ιοντισμού EASI-MS. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη γρήγορη λήψη φάσματος μάζας σε ambient συνθήκες με μόνη προετοιμασία δείγματος την πλύση των κυττάρων με απιονισμένο νερό. Παρατηρήθηκε μείωση της ακορεστότητας των PG (34:X) και SQDG (34:X) με αύξηση της συγκέντρωσης του  $Ni^{2+}$ . Ακολούθησαν μετρήσεις με την τεχνική HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning), λαμβάνοντας φάσμα  $^1H$  NMR σε λυοφιλιωμένα Control (απουσία πρόσθετης ποσότητας μετάλλου/μεταλλοειδούς) κύτταρα και σε κύτταρα αναπτυγμένα σε συγκεντρώσεις  $Ni^{2+}$  χωρίς κάποια επιπλέον επεξεργασία δείγματος. Με αύξηση της συγκέντρωσης  $Ni^{2+}$ , παρατηρήθηκε σχετική μείωση της ολοκλήρωσης της κορυφής που αντιστοιχεί στα πρωτόνια διπλών δεσμών έναντι των πρωτονίων του α-άνθρακα των λιπαρών οξέων. Έπειτα, καλλιεργήθηκαν νέες ποσότητες *Chlamydomonas reinhardtii* και πραγματοποιήθηκαν μικροεκχυλίσσεις για τη συγκέντρωση των λιπιδίων. Οι μετρήσεις συνεχίστηκαν με λήψη φασμάτων  $^1H$  συμβατικού (υγρής κατάστασης) NMR στα λιπιδικά εκχυλίσματα οι οποίες πρόσφεραν καθαρότερα φάσματα και έδειξαν την τάση των κυττάρων να αποκτούν λιγότερο ακόρεστο λιπιδικό προφίλ με την αύξηση των συγκεντρώσεων των  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  στις καλλιέργειες των κυττάρων. Έπειτα, στα εκχυλίσματα έγινε αποτελεσματικός αναλυτικός διαχωρισμός με στήλη  $C_{18}$  και ανίχνευση των πολικών λιπιδίων μέσω παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MS/MS, MRM mode), όπου παρατηρήθηκε ποιοτικά και ημιποσοτικά, η αναδιοργάνωση των λιπιδίων όταν στο θρεπτικό υλικό προστίθεται ποσότητα  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$ .

Τέλος, καλλιεργήθηκαν κύτταρα *Chlorella sorokiniana*, τα οποία αν και ανήκουν στη κατηγορία των μικροαλγών όπως τα *Chlamydomonas reinhardtii*, εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις  $As^{5+}$  και  $Se^{6+}$ . Παρόλο που το λιπιδικό τους προφίλ είναι περισσότερο ακόρεστο από τα *Chlamydomonas reinhardtii*, από τα φάσματα NMR δεν φάνηκε να υπάρχει μείωση της ακορεστότητας, όταν η

ανάπτυξη τους γίνεται παρουσία αυτών των 3 στοιχείων στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, όταν η επώαση γίνεται για το κάθε στοιχείο ξεχωριστά.

Λέξεις κλειδιά: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, ακορεστικότητα λιπιδίων, φασματομετρία μάζας, φασματοσκοπία NMR

## Abstract

In this thesis, the effect of the presence of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  on the lipids of *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-1690 wild type) and *Chlorella sorokiniana* cells was investigated using mass spectrometry and NMR spectroscopy. The first measurements were performed on *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  by the technique of sonic spray ionization desorption mass spectrometry (EASI-MS). This technique allows rapid acquisition of mass spectra under ambient conditions with minimal sample preparation. A decrease of the unsaturation levels of PG (34:X) and SQDG (34:X) was observed with increasing  $\text{Ni}^{2+}$  concentration. This was followed by measurements using HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) technique, obtaining  $^1\text{H}$  NMR spectra in lyophilized Control cells (cultivated in the absence of additional metal/metalloid) and in cells grown with  $\text{Ni}^{2+}$  without any additional sample treatment. With increasing  $\text{Ni}^{2+}$  concentrations, a relative decrease in peak integration corresponding to double bond protons versus fatty acid  $\alpha$ -carbon protons was observed. New quantities of *Chlamydomonas reinhardtii* were then cultured and microextractions of their lipids were performed. The measurements were continued by obtaining  $^1\text{H}$  conventional (liquid state) NMR spectra on the lipid extracts, which provided cleaner spectra and showed the tendency of the cells to acquire a less unsaturated lipid profile with increasing concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$ . Then, the extracts were subjected to efficient analytical separation by C18 column and polar lipids were detected by multiple reaction monitoring (MS/MS, MRM mode). Then, the lipid reorganization of the cells was observed when  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  were added to the nutrient by qualitative and semi-quantitative analysis.

Finally, *Chlorella sorokiniana* cells were cultured, which, although belonging to the microalgae class like *Chlamydomonas reinhardtii*, showed significantly higher tolerance

to high concentrations of  $\text{As}^{5+}$  and  $\text{Se}^{6+}$ . Also, although their lipid profile is more unsaturated than that of *Chlamydomonas reinhardtii*, according to their NMR spectra the lipid unsaturation levels remained constant when grown in the presence of these 3 elements at the studied concentrations, when the cells were incubated with each element separately.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, lipid unsaturation, mass spectrometry, NMR spectroscopy



## Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	11
1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	11
1.2 <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	11
1.3 Καλλιέργεια άλγεων παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μετάλλων.....	11
1.4 Βιοαπορρόφηση μετάλλων από άλγη .....	13
1.5 Η ακορεστότητα των μεμβρανικών λιπιδίων και η ρευστότητα των μεμβρανών .	13
1.6 Το λιπιδικό προφίλ των άλγεων .....	14
1.7 Φασματομετρία μάζας (MS).....	16
1.7.1 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευμένου πλάσματος (ICP-MS).....	16
1.7.2 Αναλυτής μάζας τετράπολου .....	17
1.7.3 Υψηλής απόδοσης χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (RP-HPLC-MRM).....	17
1.7.4 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	19
1.7.5 Ambient τεχνικές ιοντισμού.....	20
1.7.6 Ιοντισμός με υπερηχητική εκνέφωση – Sonic Spray Ionization (SSI) .....	21
1.8 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	24
1.9 Στόχος διατριβής.....	26
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος.....	27
2.1 Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	27
2.2 Παρασκευή διαλυμάτων - Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων .....	28
2.3 Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια.....	29
2.4 Ανάπτυξη κυττάρων .....	30
2.4.1 Κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης φωτομετρικά .....	31
2.4.2 Ανάπτυξη κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα .....	32
2.5 Χώνευση κυττάρων και ποσοτικοποίηση νικελίου .....	32
2.6 Εκχύλιση λιπιδίων και προετοιμασία δείγματος για λήψη φασμάτων NMR .....	33
2.7 Προετοιμασία δείγματος για HPLC-MRM.....	34
2.8 Προετοιμασία δείγματος για EASI-MS.....	34

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	36
3.1 Εκτίμηση της ανάπτυξης <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> παρουσία $Ni^{2+}$ , $As^{5+}$ , $Se^{6+}$ ..	36
3.2 Ποσοτικοποίηση Ni σε κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> καλλιεργημένων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις $Ni^{2+}$ με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευμένου πλάσματος (ICP-MS).....	38
3.3 Απευθείας ανάλυση μεμβρανικών λιπιδίων σε κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> με φασματομετρία μάζας εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (EASI-MS) .....	41
3.4 Προσδιορισμός ακόρεστότητας λιπιδίων των κυττάρων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) .....	47
3.5 Ανάλυση λιπιδικού εκχυλίσματος κυττάρων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> με υψηλής απόδοσης χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με φασματομετρία μάζας παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (RP-HPLC-MRM) .....	56
3.6 Εκτίμηση της ανάπτυξης κυττάρων <i>Chlorella sorokiniana</i> παρουσία $Ni^{2+}$ , $As^{5+}$ , $Se^{6+}$ .....	66
3.7 Προσδιορισμός ακόρεστότητας εκχυλίσματος κυττάρων <i>Chlorella sorokiniana</i> με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) .....	69
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα – Μελλοντικοί στόχοι.....	72
4.1 Συμπεράσματα .....	72
4.2 Μελλοντικοί στόχοι.....	74
Βιβλιογραφία .....	76
Παράρτημα .....	80

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

### 1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Τα άλγη είναι μια ευρεία κατηγορία φωτοσυνθετικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Το *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μονοκύττατο πράσινο άλγος με μέση διάμετρο 10 μm με 2 μαστίγια των 10-12 μm. Μεγαλώνει σε εύκρατο κλίμα, σε ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας (20-25°) με επαρκές φως και συστατικά αναδιπλασιάζεται μέσα σε 6-8 h. Αξιοποιείται σαν πρότυπος οργανισμός για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών όπως είναι η φωτοσύνθεση, οι μεταβολές που προκαλούνται όταν αλλάζει η σύσταση του θρεπτικού υλικού, η κίνηση των κυττάρων, η χρήση των μαστιγίων και άλλα<sup>[1]</sup>.

### 1.2 *Chlorella sorokiniana*

Το γένος *Chlorella* αποτελείται από μονοκύτταρα πράσινα μικροάλγη, όπως το *Chlamydomonas reinhardtii*, τα οποία έχουν σφαιρικό σχήμα με λείο κυτταρικό τοίχωμα χωρίς μαστίγια. Στο εργαστήριο καλλιεργήθηκε το είδος *Chlorella sorokiniana*, το οποίο αναπτύχθηκε στο ίδιο θρεπτικό υλικό και στις ίδιες συνθήκες με το *Chlamydomonas reinhardtii*. Είναι επίσης μιξοτροφικό και μπορεί να αξιοποιήσει οξικά ανιόντα σαν πηγή άνθρακα. Η μέση διάμετρος του βάσει οπτικού μικροσκοπίου φάνηκε να είναι περίπου 5 μm<sup>[2]</sup>.

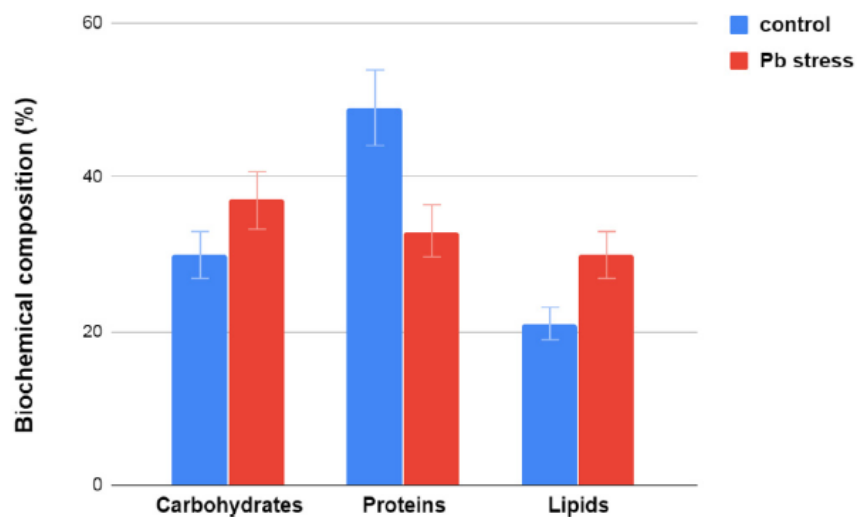
### 1.3 Καλλιέργεια άλγων παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μετάλλων

Τα κύτταρα όταν αναπτύσσονται παρουσία μετάλλων σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα συνηθισμένα επίπεδα, πιο συχνά λόγω ανθρωπογενούς περιβαλλοντικής ρύπανσης, προκαλείται στρες. Μη απαραίτητα βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο και ο μόλυβδος αντικαθιστούν κατιόντα που λειτουργούν ως συμπάροντες σε ένζυμα και προκαλείται οξειδωτικό στρες. Επομένως, τα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως το *Chlamydomonas reinhardtii* και η *Chlorella sorokiniana*, υπερπαραγάγουν συγκεκριμένα οργανικά οξέα, αμινοξέα και πεπτίδια και παράλληλα με τη δράση ενζύμων προσπαθούν να διαχειριστούν το στρες<sup>[3]</sup>. Επίσης, στο *Chlamydomonas*

*reinhardtii* έχει παρατηρηθεί η άμεση μείωση της έκλυσης του οξυγόνου από τη φωτοσύνθεση σε αυξημένη έκθεση μεταλλικών κατιόντων<sup>[4]</sup>.

Τα *Chlamydomonas reinhardtii*, υπό κανονικές συνθήκες ποσοστιαία ανά ξηρό βάρος αποτελείται από 24% λιπαρά, 34% πρωτεΐνη, 36% υδατάνθρακες και 6% ανόργανα συστατικά<sup>[5]</sup>. Όταν αναπτυχθεί υπό συνθήκες στρες, η σύσταση του αλλάζει, γίνεται συσσώρευση αμύλου και τριγλυκεριδίων-TAG<sup>[6]</sup>.

Τα περισσότερα μικροάγλη παράγουν μικρές ποσότητες TAG κατά την εκθετική ανάπτυξή τους και η παραγωγή αυτών των λιπαρών μεγιστοποιείται στο πλατό ανάπτυξης<sup>[7]</sup>. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα λιπίδια αποθήκευσης ενέργειας, δηλαδή κυρίως τα τριγλυκερίδια συνήθως έχουν μικρότερο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων συγκριτικά με τα μεμβρανικά λιπίδια<sup>[8]</sup>.



Εικόνα 1: Η βιοχημική σύσταση control κυττάρων *Chlorella sorokiniana* συγκριτικά με κύτταρα καλλιεργημένα παρουσία  $Pb^{2+}$  σε μεγάλη συγκέντρωση, όπου η περιεκτικότητα των κυττάρων σε υδατάνθρακες και λιπαρά είναι αυξημένη καθώς παράγονται αυξημένες ποσότητες αμύλου και αποθηκευτικών λιπιδίων<sup>[9]</sup>.

## 1.4 Βιοαπορρόφηση μετάλλων από άλγη

Υπάρχει ενδιαφέρον στη χρήση άλγεων για επεξεργασία μολυσμένων υδάτων και βιοαποκατάσταση εδάφους μέσω βιοαπορρόφησης (biosorption) βαρέων μετάλλων. Τα μεταλλικά κατιόντα έλκονται από αρνητικά φορτισμένες ομάδες της μεμβράνης όπως  $\text{OH}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{RS}^-$  και  $\text{RO}^-$ . Έπειτα, μεγάλα σύμπλοκα ενζύμων, οι κυτοσολικές πρωτεΐνες, μεσολαβούν στη μεταφορά του μετάλλου στο εσωτερικό των κυττάρων<sup>[10]</sup>. Ως άμυνα, τα ευκαριωτικά κύτταρα συνθέτουν πεπτίδια, όπως τις φυτοχελατίνες και μεταλλοθειονίνες, που συμπλέκονται με τα βαρέα μέταλλα και μειώνουν τη τοξικότητά τους<sup>[11]</sup>.

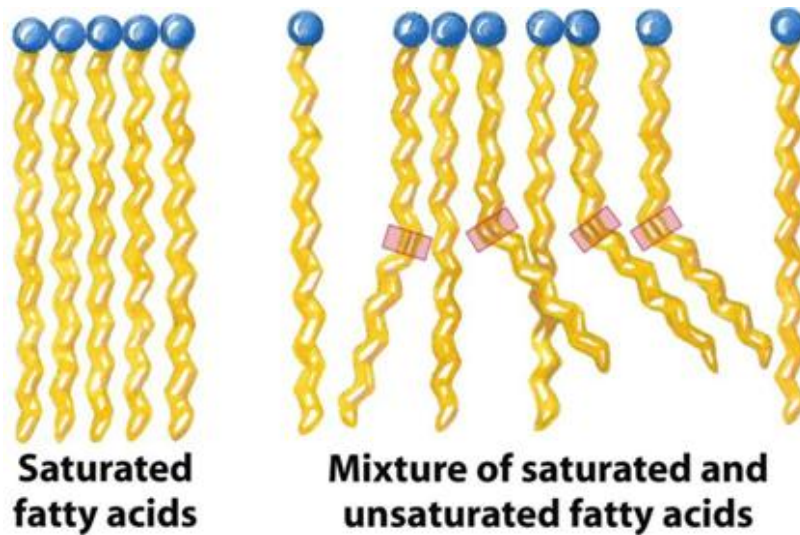
## 1.5 Η ακορεστότητα των μεμβρανικών λιπιδίων και η ρευστότητα των μεμβρανών

Οι μεμβράνες αποτελούν τους φυσικούς φραγμούς του κυττάρου και των οργανιδίων και η δομή τους είναι δυναμική, δηλαδή μπορεί να αλλάζει. Για αυτό, οι μεμβράνες επηρεάζονται άμεσα από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες<sup>[12]</sup>.

Τα κύτταρα τείνουν να διατηρούν τη μεμβρανική ρευστότητα τους υπό ποικίλες συνθήκες ανάπτυξης ρυθμίζοντας την σύσταση τους σε λιπίδια. Είναι γνωστό πως τα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα από ότι όταν αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε *Chlamydomonas reinhardtii* πως με ταχεία αύξηση της θερμοκρασίας προκαλούνται απότομες μειώσεις σε συγκεκριμένα πολυακόρεστα (PUFA) μεμβρανικά λιπίδια και παράλληλη αύξηση πολυακόρεστων λιπιδίων αποθήκευσης, υποδεικνύοντας έτσι τη δυνατότητα μετατροπής των λιπιδίων από τη μια μορφή στην άλλη για τη διατήρηση της ρευστότητας της μεμβράνης<sup>[13]</sup>.

Τα κύτταρα παράγουν τα λιπαρά οξέα που χρειάζονται ξεκινώντας από σχετικά μικρές και κορεσμένες αλυσίδες όπως το παλμιτικό λιπαρό οξύ (16:0), οι οποίες επεκτείνονται κατά 2 άνθρακες τη φορά στο ενδοπλασματικό δίκτυο και προσθέτοντας διπλούς δεσμούς μέσω των δεσατουρασών<sup>[14]</sup>. Τα άλγη πρέπει να συνθέτουν πολυακόρεστα λιπαρά ώστε να εξασφαλίζεται η ρευστότητα των μεμβρανών τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για αυτό, η δράση των δεσατουρασών σε χαμηλές

Θερμοκρασίες αυξάνεται ώστε να διατηρηθεί η ρευστότητα της μεμβράνης<sup>[15][16]</sup>.



Εικόνα 2: Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα στην πιο σταθερή διαμόρφωση τους, δηλαδή πλήρως εκτεταμένα, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε όλο το μήκος με δυνάμεις van der Waals. Στα ακόρεστα, ο *cis* διπλός δεσμός κάμπτε το σχήμα προκαλώντας ασθενέστερο πακετάρισμα αλυσίδων, επομένως μεγαλύτερη ρευστότητα στη μεμβράνη<sup>[14]</sup>.

Οι δεσατουράσες των λιπαρών οξέων είναι ένζυμα αποκορεσμού, δηλαδή αφαιρούν 2 υδρογόνα από την αλυσίδα του λιπαρού οξέος δημιουργώντας ένα διπλό δεσμό<sup>[17]</sup>. Τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν στο ενεργό κέντρο τους 2 άτομα σιδήρου. Μελέτη έδειξε ότι κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό πτωχό σε σίδηρο, έχουν μικρότερη ακορεστότητα στα λιπαρά τους σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται υπό κανονικές συνθήκες πιθανότατα λόγω δυσλειτουργίας των δεσατουρασών<sup>[18]</sup>.

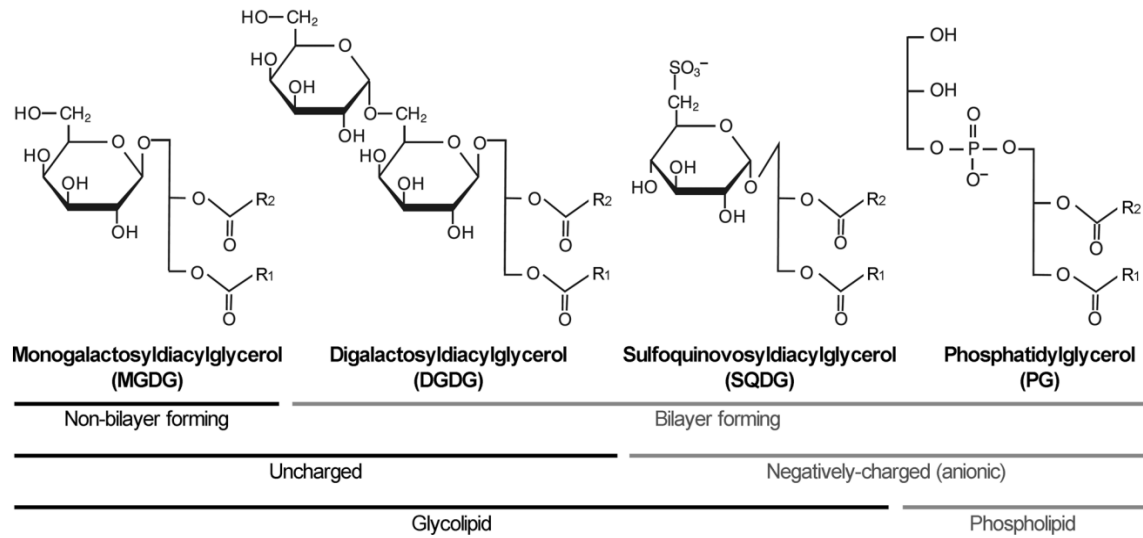
## 1.6 Το λιπιδικό προφίλ των άλγεων

Το λιπιδικό προφίλ των άλγεων παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς παράγουν μεγάλη και ιδιαίτερη ποικιλία λιπιδίων. Τα κύρια λιπαρά οξέα τους είναι τα 16:0, 18:X (όπου X 1, 2, 3) και πολυακόρεστα ω-3, παρουσιάζοντας έτσι ομοιότητα με τα λιπίδια των φυτών και των ψαριών<sup>[19]</sup>. Επίσης, χάρη στη μεγάλη απόδοση παραγωγής βιομάζας των άλγεων, υπάρχει εκτεταμένο ενδιαφέρον για παραγωγή τροφής και βιοντίζελ από

άλγη, συνήθως τροποποιημένα ή επωασμένα υπό στρες ώστε να είναι πιο αποδοτική και στοχευμένη η παραγωγή. Τα άλγη θεωρητικά μπορούν να έχουν 9-10% απόδοση φωτοσύνθεσης<sup>[20]</sup>.

Τα λιπίδια ταξινομούνται στα πολικά μεμβρανικά και στα άπολα τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια, που λειτουργούν κυρίως ως μέσα αποθήκευση ενέργειας κυρίως. Τα μεμβρανικά λιπίδια έχουν υδρόφιλο και υδρόφοβο μέρος. Η ποικιλία των πολικών και αλειφατικών μερών επιτρέπει την ύπαρξη πάνω από 1000 διαφορετικών λιπιδίων<sup>[21]</sup>.

Οι εσωτερικές θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών ποσοστιαία αποτελούν τις κύριες μεμβράνες των άλγεων οι οποίες αποτελούνται από 4 κυρίως πολικά είδη λιπιδίων, τα ουδέτερα MGDG, DGDG (μονο/δι-γαλακτοζυλοδιακυλογλυκερόλη) και τα αρνητικά φορτισμένα SQDG, PG (σουλφοκινοβοσυλοδιακυλογλυκερόλη και φωσφατίδυλογλυκερόλη) σε ποσοστά 40-55%, 15-35%, 10-20%, 10-20% αντίστοιχα<sup>[22][23]</sup>.



Εικόνα 3: Οι δομές των κύριων μεμβρανικών λιπιδίων των άλγεων<sup>[22]</sup>.

## 1.7 Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας είναι μία από τις ισχυρότερες αναλυτικές τεχνικές με μεγάλο εύρος εφαρμογών σε διάφορους κλάδους της επιστήμης. Χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των μαζών ατόμων, μορίων και θραυσμάτων αυτών. Είναι μία ευαίσθητη και ταχεία τεχνική με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και συνήθως είναι η μόνη επιλογή για την ανάλυση ιχνοποσότητας αναλύτη.

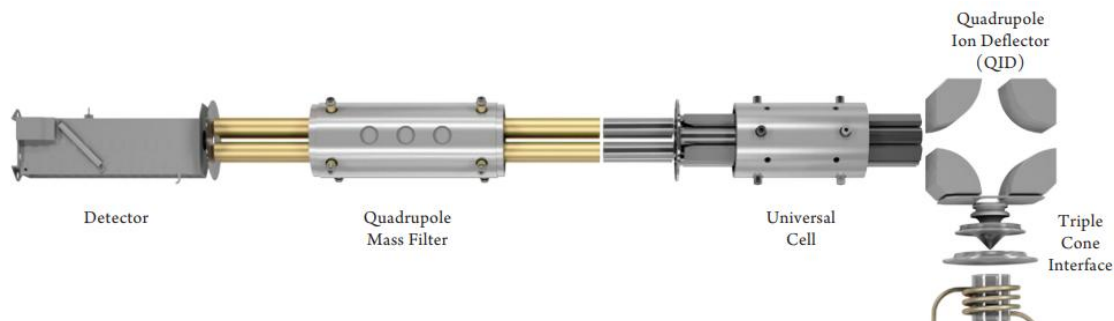
Η βασική αρχή της περιλαμβάνει την παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση, την επιτάχυνση και το διαχωρισμό τους βάσει του λόγου μάζας-φορτίο  $m/z$ . Τα ιόντα προσκρούουν στον ανιχνευτή ο οποίος παράγει, αναλογικά με την ποσότητα, ηλεκτρονικό σήμα και έτσι μπορεί να ληφθεί το φάσμα μάζας, ένα γράφημα με την ένταση του σήματος στον  $y$  άξονα, και την τιμή  $m/z$  στον  $x$  άξονα.

### 1.7.1 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευμένου πλάσματος (ICP-MS)

Στην παρούσα εργασία για την ποσοτικοποίηση του νικελίου που προσλήφθηκε από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα. Συγκριμένα, το διάλυμα που προκύπτει από τα χωνευμένα-διαλυτοποιημένα με π. νιτρικό οξύ κύτταρα, εισάγεται με πνευματικό εκνεφωτή όπου παράγεται αερόλυμα. Μετά την εξάλειψη των μεγάλων σταγονιδίων, το λεπτόκοκκο αερόλυμα κατευθύνεται στον πυρσό στον οποίο βρίσκεται το υψηλής θερμοκρασίας επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (6000-10000K), όπου ατομοποιείται και ιονίζεται. Στη συνέχεια, το αέριο περνάει σταδιακά από τρεις μεταλλικούς κώνους με μικρή οπή, εκ των οποίων ο πρώτος είναι υδρόψυκτος, και η πίεση πέφτει από τα  $\approx 760$  Torr σε επίπεδα  $<10^{-4}$  Torr τα οποία απαιτούνται για τη λειτουργία του φασματόμετρου μάζας. Τα ιόντα εστιάζονται μέσω φακών εστίασης και εκτρέπονται  $90^\circ$ , ώστε να απομακρυνθούν ουδέτερα άτομα και φωτόνια από τη διαδρομή των ιόντων προς τον ανιχνευτή. Ύστερα, τα ιόντα εισέρχονται σε θάλαμο συγκρούσεων όπου μπορεί να υπάρξει ροή He που διασπάει μοριακά ιόντα όπως  $Ar_2^+$  τα οποία αποτελούν ισοβαρικές παρεμποδίσεις. Έπειτα τα ιόντα διαχωρίζονται στον τετραπολικό αναλυτή μάζας βάσει του λόγου  $m/z$ . Τέλος, φθάνουν στον



ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή ο οποίος δίνει σήμα ανάλογα με την ποσότητα των ιόντων και λαμβάνεται το γράφημα έντασης/χρόνου για κάθε  $m/z$ <sup>[24][25]</sup>.



Εικόνα 4: Εσωτερική διάταξη του φασματόμετρου μάζας ICP-MS NexION 300X (PerkinElmer)<sup>[26]</sup>.

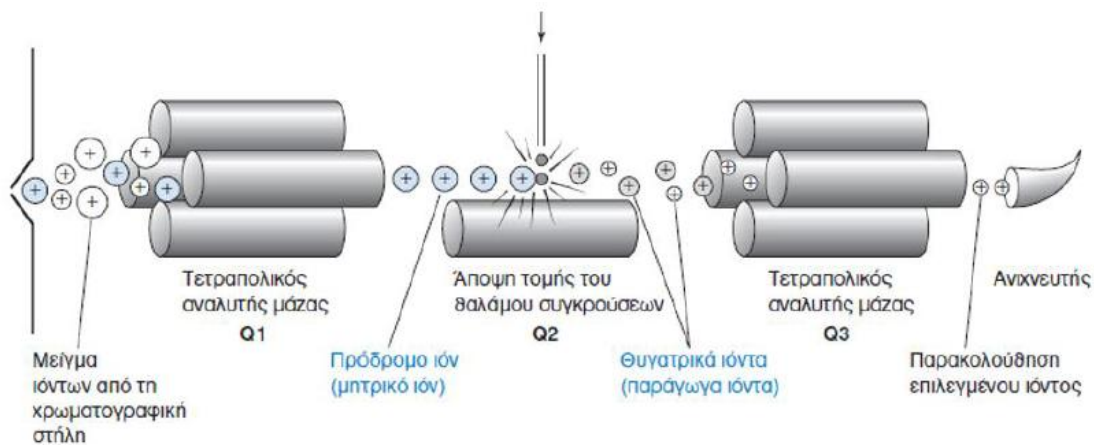
### 1.7.2 Αναλυτής μάζας τετράπολου

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών είναι ο συνηθέστερος διαχωριστής μάζας διότι έχει μικρό κόστος και διαστάσεις και είναι μηχανικά ανθεκτικός. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους οι οποίες διαρρέονται από ρεύμα και δρουν σαν ηλεκτρόδια. Σε αυτές εφαρμόζεται ένα σταθερό δυναμικό DC και ένα υψίσυχνο εναλλασσόμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητας RF. Το κάθε διαγώνιο ζεύγος ράβδων είναι ηλεκτρικά συνδεδεμένο και συνδέεται στον θετικό ή αρνητικό πόλο της πηγής με μεταβλητή τάση DC και AC με διαφορά φάσης  $180^{\circ}$  μεταξύ τους. Κατά τη λήψη του φάσματος μάζας, τα δυναμικά αυξάνονται διατηρώντας σταθερό τον λόγο τους DC/AC και το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται επιτρέπει τη διέλευση συγκεκριμένου  $m/z$  προς τον ανιχνευτή κάθε φορά, με τα υπόλοιπα ιόντα να προσκρούουν στις ράβδους και να εξουδετερώνονται. Συνήθως η διαχωριστική ικανότητα ενός τέτοιου διαχωριστή είναι περίπου  $0.3 m/z$ <sup>[24][25]</sup>.

### 1.7.3 Υψηλής απόδοσης χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (RP-HPLC-MRM)

Στην HPLC-MRM ανάλυση χρησιμοποιείται ένα φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου σε MRM mode για μεγαλύτερη επιλεκτικότητα και ευαισθησία. Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο  $Q_1$ , από το οποίο η διέλευση επιτρέπεται μόνο για

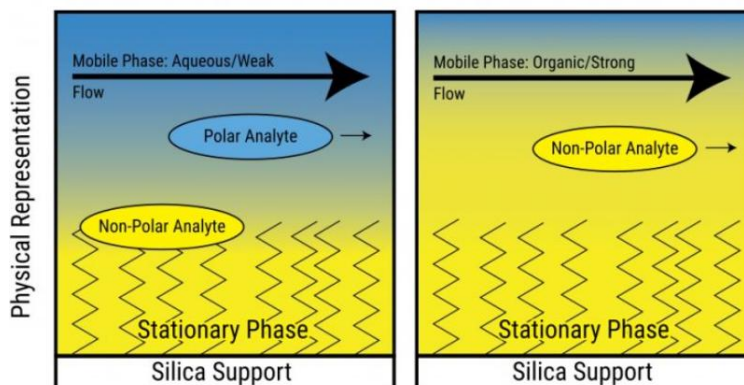
συγκεκριμένο  $m/z$ , το πρόδρομο ιόν. Έπειτα, στο στάδιο  $Q_2$ , στο θάλαμο συγκρούσεων, το πρόδρομο ιόν συγκρούεται με άτομα  $N_2$  ή  $Ar$  και πραγματοποιείται θραυσματοποίηση. Τέλος, τα θραύσματα διαχωρίζονται στο τετράπολο  $Q_3$ , από το οποίο διέρχεται προς τον ανιχνευτή ένα  $m/z$  – θραύσμα (προϊόν ιόν). Πολλές φορές ο αναλύτης στο δείγμα συνυπάρχει με προσμίξεις που έχουν ίδιο  $m/z$  μετά τον ιοντισμό, οι οποίες όμως έχουν άλλη δομή, επομένως τα θραύσματα τους έχουν διαφορετικά  $m/z$ . Έτσι επιτυγχάνεται εκλεκτικότητα και επειδή το  $Q_1$  επιτρέπει τη διέλευση μόνο σε μία συγκεκριμένη τιμή  $m/z \pm 0.3$  και όχι τη διαδοχική διέλευση μεγάλου εύρους  $m/z$ , τα ιόντα του αναλύτη που φθάνουν στον ανιχνευτή είναι περισσότερα καθιστώντας την τεχνική ευαίσθητη<sup>[25]</sup>.



Εικόνα 5: Φασματομέτρο μάζας τριπλού τετράπολου σε λειτουργία MRM<sup>[25]</sup>.

Η χρωματογραφία που πραγματοποιήθηκε στη παρούσα εργασία είναι αντίστροφης φάσης RP-HPLC με βαθμιδωτή έκλυση. Η στατική φάση είναι άπολη και κατακρατεί περισσότερο τις πιο άπολες ενώσεις. Η εκλουστική ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται με τη μείωση της πολικότητας. Επομένως, στο χρωματογράφημα πρώτα εκλύονται οι πιο πολικές ενώσεις, και έπειτα με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης εξέρχονται και οι άπολες<sup>[25]</sup>.

## Reverse Phase Gradient Elution

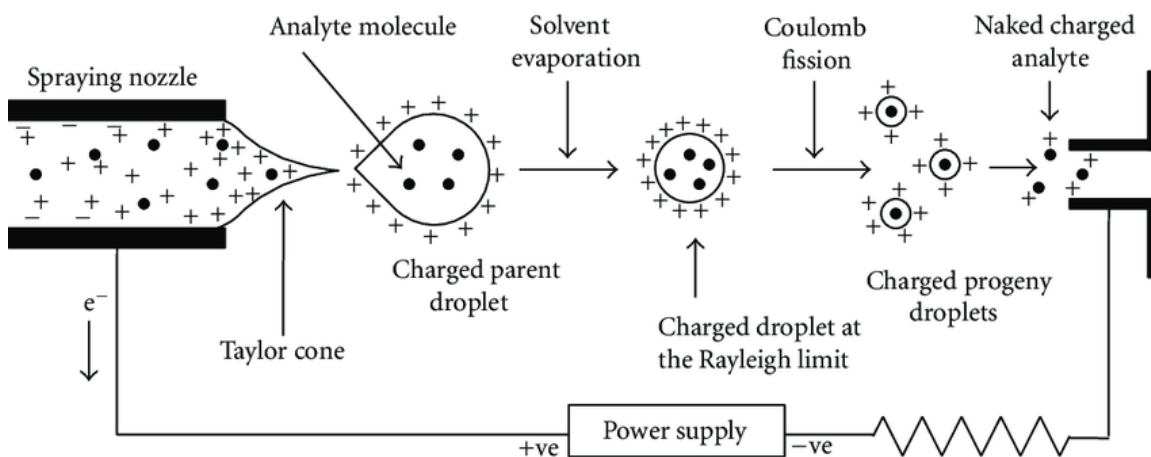


Εικόνα 6: Η εκλουστική ισχύ της κινητής φάσης στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης<sup>[27]</sup>.

### 1.7.4 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ο ηλεκτροψεκασμός μαζί με τη φασματομετρία μάζας αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1984 από τον John B. Fenn και άλλους, ο οποίος κέρδισε το βραβείο Nobel Χημείας το 2002. Είναι μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάλυσης βιολογικών μορίων μεγάλου μοριακού βάρους<sup>[28]</sup>.

Το υγρό δείγμα διέρχεται με ροή μερικών  $\mu\text{L}/\text{min}$  από ατσάλινο τριχοειδή εκνεφωτή ο οποίος βρίσκεται σε διαφορά δυναμικού μερικών kV ως προς τη μεταλλική σπή-είσοδο του φασματομέτρου μάζας. Το φορτισμένο υγρό όταν εξέρχεται από τον τριχοειδή δημιουργεί έναν κώνο ο οποίος κορυφώνεται σε νήμα και όταν οι απωστικές δυνάμεις των ομοφορισμένων μορίων ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση, δηλαδή στο όριο Rayleigh, παράγεται λεπτόκοκκο αερόλυμμα με συχνότερη διάμετρο σταγονιδίων  $\approx 1.5 \mu\text{m}$ <sup>[29]</sup>. Τα ιόντα δεν παράγονται κατά τον ηλεκτροψεκασμό αλλά προϋπάρχουν, και για αυτό, στο δείγμα γίνεται ρύθμιση του pH ή προσθήκη κατιόντων. Αναλόγως το φορτίο του αναλύτη, επιλέγεται θετικό ή αρνητικό δυναμικό στον τριχοειδή. Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος και τα φορτισμένα σωματίδια υποβοηθούμενα από αέριο  $\text{N}_2$  χάνουν το διαλύτη τους λόγω εξάτμισης και εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού προκαλεί ελάχιστη θραυσματοποίηση των ενώσεων, η οποία όμως μπορεί να αυξηθεί σε επόμενο στάδιο μέσω κρούσεων.



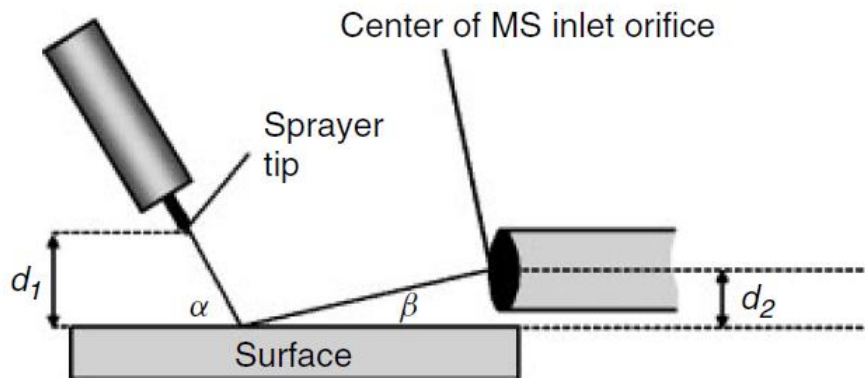
Εικόνα 7: Διεργασίες παραγωγής φορτισμένου αερολύματος με ηλεκτροψεκασμό<sup>[29]</sup>.

### 1.7.5 Ambient τεχνικές ιοντισμού

Οι ambient τεχνικές ιοντισμού, προσφέρουν τη δυνατότητα άμεσης ανάλυσης σε κοινά δείγματα σε θερμοκρασία και πίεση δωματίου και η προετοιμασία του δείγματος είναι ελάχιστη έως και μηδενική. Η απλότητα της διάταξης τους ευνοεί τη δημιουργικότητα και τις παραλλαγές σε ένα ερευνητικό περιβάλλον. Η ανάλυση είναι γρήγορη και η λήψη του φάσματος γίνεται σε πραγματικό χρόνο. Για αυτό μια τέτοια τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για high throughput ανάλυση<sup>[30]</sup>.

Η πρώτη δημοσίευση έγινε το 2004 με την τεχνική εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό (desorption electrospray ionization-DESI) η οποία περιλαμβάνει ηλεκτροψεκασμό υπό γωνία προς μια επιφάνεια με δείγμα. Η κρούση των φορτισμένων σωματιδίων του διαλύτη παράγει αερόλυμα με φορτισμένο αναλύτη που εισάγεται στο φασματομέτρο μάζας. Το φάσμα που λαμβάνεται είναι παρόμοιο με αυτό του συμβατικού ESI<sup>[31]</sup>.

Έπειτα, το 2006 ακολούθησε η δημοσίευση της τεχνικής εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (desorption sonic spray ionization-DeSSI) η οποία διαφέρει από την DESI στο ότι δεν χρησιμοποιείται υψηλό δυναμικό για να πραγματοποιηθεί ηλεκτροψεκασμός, αλλά ένας υπερηχητικός εκνεφωτής που έχει τη δυνατότητα να εκτινάξει ιοντισμένα μόρια φαρμάκων απευθείας από συνηθισμένα χάπια εμπορίου<sup>[32]</sup>. Μετέπειτα η τεχνική μετανομάστηκε σε EASI (Easy Ambient Sonic-Spray Ionization) και παρουσιάστηκε η δυνατότητα ανάλυσης μορίων απευθείας από την επιφάνεια πλακιδίου TLC<sup>[33]</sup>.

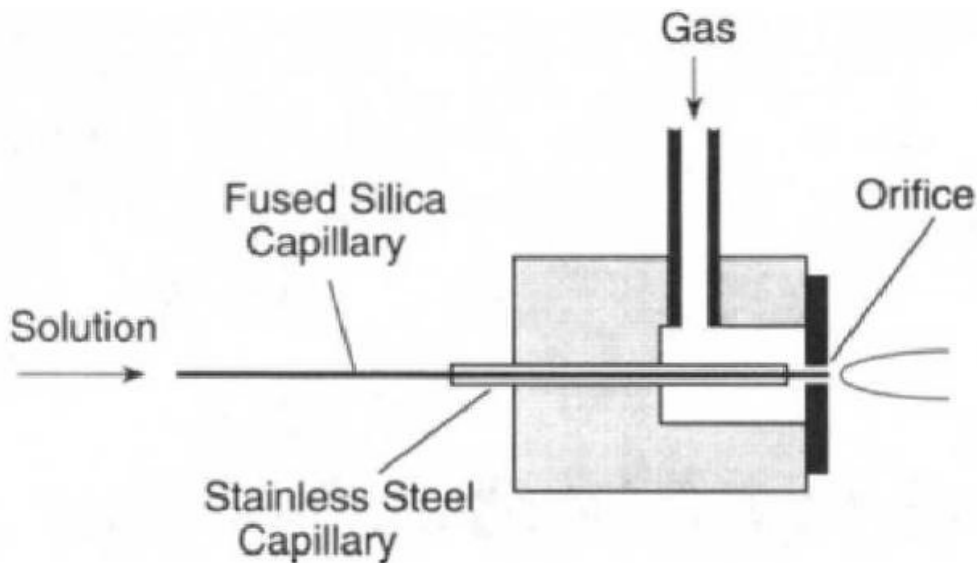


Term	Definition
$\alpha$	Incident angle
$\beta$	Collection angle
$d_1$	Tip-to-surface distance
$d_2$	MS inlet-to-surface distance

Εικόνα 8: Η γενικευμένη διάταξη της πηγής DESI & EASI MS, με τις γεωμετρικές παραμέτρους<sup>[34]</sup>.

### 1.7.6 Ιοντισμός με υπερηχητική εκνέφωση – Sonic Spray Ionization (SSI)

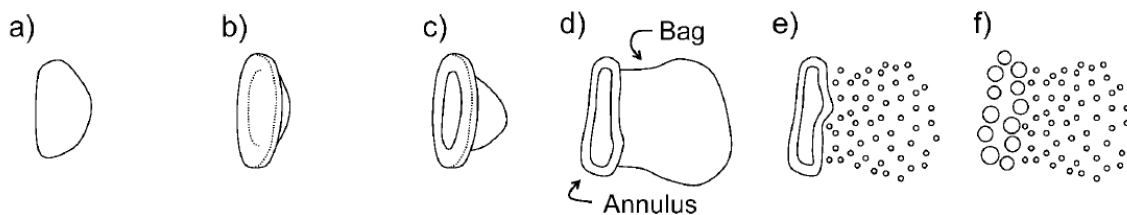
Ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης πρωτοαναφέρθηκε από τον Hirabayashi et al. το 1994<sup>[35]</sup>. Η ανακάλυψη έγινε τυχαία. Πιθανότατα, ενώ το δυναμικό υψηλής τάσης ήταν απενεργοποιημένο εν άγνοια τους να παρατηρήθηκαν ιόντα με την αύξηση της πίεσης του αερίου του εκνεφωτή. Η ανίχνευση των ιόντων γίνεται όταν η ταχύτητα του αερίου εκνεφωσης είναι μεγαλύτερη από κάποιο όριο και μεγιστοποιείται όταν είναι ίση με την ταχύτητα του ήχου, δηλαδή ταχύτητα 1 Mach, και η ένταση μειώνεται με περαιτέρω αύξηση της πίεσης-ταχύτητας.



Εικόνα 9: Η διάταξη της πηγής ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης του Hirabayashi et al.<sup>[35]</sup>.

Το διάλυμα ρέει μέσα από τριχοειδή σωλήνα από τηγμένη πυριτία εσωτερικής διαμέτρου 0,1 mm, ο οποίος είναι εύκαμπτος και στηρίζεται/κατευθύνεται μέσω ενός μεγαλύτερου ατσάλινου τριχοειδή σωλήνα. Η άκρη του τριχοειδή σωλήνα εξέχει κατά 0,6 mm από την οπή του εκνεφωτή και ομοαξονική ροή αερίου N<sub>2</sub> προκαλεί εκνέφωση του διαλύματος.

Ένας μηχανισμός που εξηγεί τη δημιουργία φορτισμένου αεροζόλ προτάθηκε από τους Zilch et al. με τη σχάση της σταγόνας νερού να παίρνει τη μορφή σακούλας-στεφάνης<sup>[36]</sup>. Παρατηρήθηκε μέσω μακροφωτογραφίας ότι με την υπερηχητική εκνέφωση, τα αρχικά σταγονίδια που είχαν διάμετρο 10-100 μm διασπάστηκαν περαιτέρω με τελική διάμετρο 2-3 μm. Τα φορτισμένα σταγονίδια ήταν περισσότερα από αυτά που αναμένονται από την τυχαία κατανομή των φορτίων με τα θετικά φορτία να υπερτερούν τα αρνητικά.

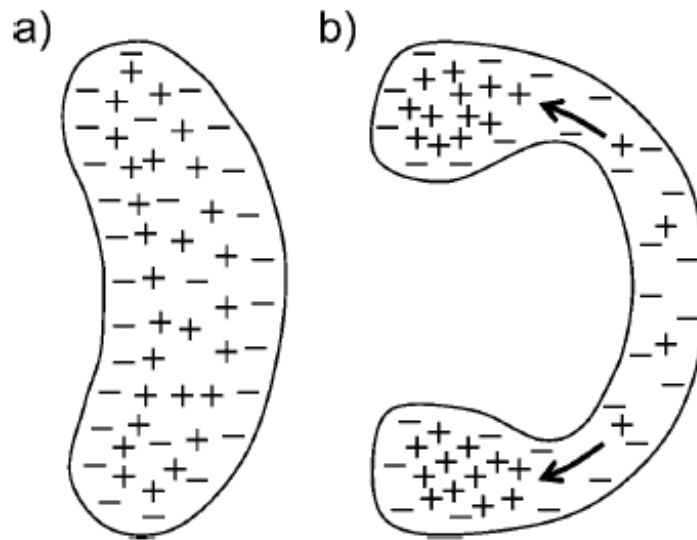


Εικόνα 10: Αεροδυναμική σχάση σταγόνας με το μηχανισμό σακούλας-στεφάνης<sup>[36]</sup>.

Η ταχύτητα του αερίου είναι πολύ υψηλότερη από του σταγονιδίου και δημιουργούνται αεροδυναμικές δυνάμεις με αποτέλεσμα την επιτάχυνση και την παραμόρφωση του σταγονιδίου. Αρχικά, η σταγόνα είναι πεπλατυσμένη και δημιουργείται ένα κοίλωμα στο κέντρο της, το οποίο μεγαλώνει σχηματίζοντας σακούλα με μία στεφάνη στη βάση της. Η σακούλα σχάζεται παράγοντας μικρά σταγονίδια ενώ η στεφάνη παράγει κάποια σταγονίδια μεγαλύτερης διαμέτρου.

Μία σταγόνα με αρχική ακτίνα 10  $\mu\text{m}$  φθάνει τα 80  $\mu\text{m}$  πριν σχαστεί, με το πάχος της σακούλας να είναι μόλις 25 nm. Τα επιφανειακά αρνητικά φορτία  $\text{OH}^-$  συσσωρεύονται στη σακούλα και απωθούν τα θετικά φορτία με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό της στεφάνης σε θετικά φορτία, προκαλώντας έτσι διαχωρισμό φορτίων. Μετά τη διάσπαση της σακούλας, τα μικρά σταγονίδια θα έχουν περίσσεια αρνητικού φορτίου και τα μεγαλύτερα που προκύπτουν από τη στεφάνη, θετικό φορτίο.

Τα μόρια του νερού είναι ηλεκτρικά δίπολα και στη διεπιφάνεια υγρού-αερίου η πλειοψηφία τους είναι στραμμένη με το αρνητικό φορτίο  $\delta^-$  προς το αέριο και το  $\delta^+$  προς το εσωτερικό του υγρού προσελκύοντας έτσι επιφανειακά  $\text{OH}^-$  και φορτίζοντας την έτσι αρνητικά. Το επιφανειακό δυναμικό του νερού θεωρείται ότι είναι  $\approx +0.10 \text{ V}^{[37]}$ .

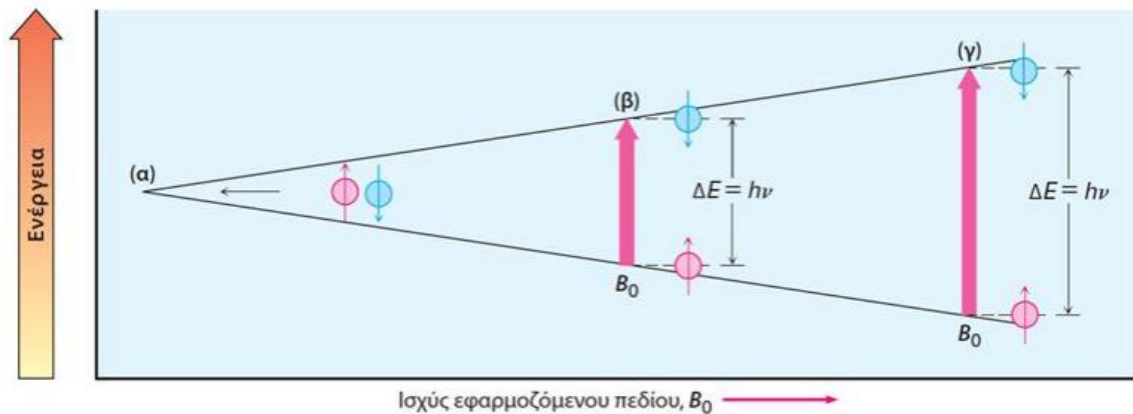


Εικόνα 11: Διαχωρισμός φορτίων λίγο πριν τη σχάση της σακούλας<sup>[36]</sup>.

## 1.8 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μία από τις ισχυρότερες τεχνικές για τον προσδιορισμό της δομής μιας ένωσης ή της σύστασης ενός δείγματος. Οι πληροφορίες που παρέχει, συμπληρώνουν αυτές που δίνει η φασματομετρία μάζας, καλύπτοντας τα μειονεκτήματα η μία της άλλης.

Κάθε πυρήνας με περιττό αριθμό πρωτονίων και/ή περιττό αριθμό νετρονίων περιέχει πυρηνικό σπιν, μία μαγνητική ιδιότητα. Παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$ , οι πυρήνες με σπιν προσανατολίζονται είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα στο  $B_0$ , επομένως δημιουργούνται 2 ενεργειακές καταστάσεις με χαμηλότερης ενέργειας τον παράλληλο προσανατολισμό. Αυξάνοντας την ισχύ του  $B_0$  οι 2 καταστάσεις σχάζονται περισσότερο. Αν οι πυρήνες ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης ενέργειας, τότε οι πυρήνες χαμηλότερης ενεργειακής κατάστασης απορροφούν ενέργεια, αναστρέφεται το σπιν τους αντιπαράλληλα στο  $B_0$  και επιτυγχάνεται ο πυρηνικός συντονισμός.

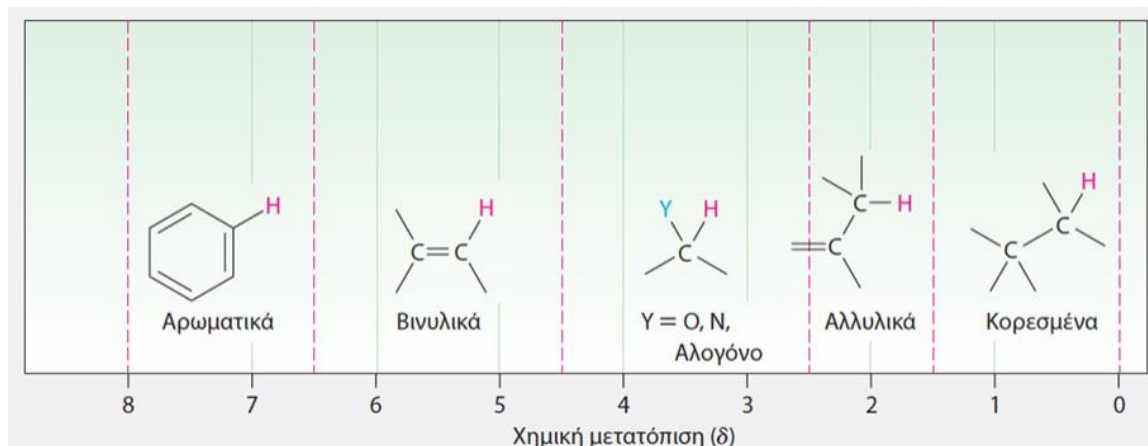


Εικόνα 12: Η σχέση των ενεργειακών καταστάσεων σπιν πυρήνων σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο  $B_0$ <sup>[38]</sup>.

Η τοπική ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε κάθε πυρήνα, δημιουργεί ένα τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίπαράλληλο με το  $B_0$  και επειδή κάθε πυρήνας σε ένα μόριο βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο δεν είναι το ίδιο. Επομένως, κάθε πυρήνας διεγείρεται σε ελαφρώς



διαφορετική ενέργεια, οπότε μετρώντας αυτές τις διαφοροποιήσεις λαμβάνεται πληροφορία για το ηλεκτρονικό περιβάλλον του κάθε ατόμου που μελετάται στο μόριο<sup>[38][39]</sup>.



Εικόνα 13: Οι βασικές περιοχές απορρόφησης ανάλογα με τον τύπο πρωτονίου<sup>[38]</sup>.

Στην παρούσα εργασία τα λιπιδικά εκχυλισματα των κυττάρων τοποθετούνται σε μαγνητικό πεδίο 9.4 Tesla όπου οι πυρήνες  $^1\text{H}$  απορροφούν ακτινοβολία συχνότητας  $\approx 400$  MHz. Μελετάται κυρίως η απορρόφηση των βινυλικών πρωτονίων έναντι των μεθυλενικών ή των πρωτονίων του  $\alpha$ -άνθρακα των λιπαρών οξέων και έτσι εξάγεται πληροφορία για την ακορεστότητα του δείγματος. Στα δείγματα που περιέχουν εκχύλισμα από *Chlamydomonas reinhardtii* έχει προστεθεί και ίση ποσότητα πρότυπης ένωσης, επομένως κανονικοποιώντας τη μάζα κάθε δείγματος, ο λόγος της ολοκλήρωσης της βινυλικής κορυφής έναντι της πρότυπης κορυφής είναι ενδεικτικός της ακορεστότητας του δείγματος ανά μονάδα μάζας.

## 1.9 Στόχος διατριβής

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο συνδυασμός αναλυτικών τεχνικών φασματομετρίας μάζας και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για τη μελέτη της επίδρασης των  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$  και  $\text{Se}^{6+}$  στην ακορεστότητα των λιπιδίων μικροαλγών *Chlamydomonas reinhardtii* και *Chlorella sorokiniana*. Η χρήση διάφορων τεχνικών για την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων επιτρέπει τη σύγκριση των μετρήσεων, καθώς και ενδείξεις για την εγκυρότητα της κάθε μεθόδου που χρησιμοποιείται. Κάθε τεχνική προσθέτει τα δικά της αποτελέσματα ώστε να υπάρχει ολιστική προσέγγιση στα συμπεράσματα, όσο είναι δυνατόν, για την επίδραση που ασκεί η αυξημένη συγκέντρωση, στη προκειμένη περίπτωση, των  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  στο λιπιδικό προφίλ των συγκεκριμένων οργανισμών. Έτσι, μελλοντικά, εφόσον οι μέθοδοι έχουν συγκριθεί και αναπτυχθεί ικανοποιητικά, δύναται να γίνουν στοχευμένες αναλύσεις, εξοικονομώντας χρόνο με κάποια από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

## Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός

#### Φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

- *NexION 300X ICP-MS*, με χρήση του λογισμικού *Syngistix*, *Perkin Elmer*
- Dewar με υγρό αργό (Ar)
- Γυάλινος ομόκεντρος πνευματικός εκνεφωτής *Type C*, *Meinhard*
- Κυκλωνικός θάλαμος εκνέφωσης, *Meinhard*

#### Φασματόμετρο μάζας τετραπολικής ιοντικής παγίδας συζευγμένο με πηγή ESI/SSI

- *LCQ Advantage*, με χρήση του λογισμικού *Xcalibur*, *Thermo Finnigan*
- Υάλινος εκνεφωτής, *Glass expansion*
- Αέριο N<sub>2</sub> από γεννήτρια, *Peak Scientific*

#### Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

- *400 MHz NMR Bruker*, με χρήση του λογισμικού *TopSpin*
- Σωλήνες δείγματος εσωτερικής διαμέτρου 5mm
- Φούρνος στους 100<sup>0</sup>C για απομάκρυνση ακετόνης από πλυμένους σωλήνες

#### Φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου συζευγμένο με πηγή ESI και σύστημα HPLC

- *Triple Quad 3500*, *SCIEX* με σύστημα *HPLC ExionLC*, με χρήση λογισμικού *Analyst*
- Στήλη *HPLC C18*, *50x2.0mm*, *Synergi 4 μm Fusion-RP 80 Å*.

#### Επιπρόσθετος εργαστηριακός εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο *UV-1800*, *Shimadzu*
- *Shaker*, *Edmund Bühler*
- Αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών (0.1 mg, ± 0.2 mg) *Kern ABT Sigma-Aldrich*
- Αναλυτικός ζυγός 2 δεκαδικών (0.01 g, ±0.01 g) *Kern S72*
- *Reax 2000* vortex shaker, *Heidolph*
- Φυγόκεντρος *durafuge 200*, *Precision*
- Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου *Gilson* (Vmax 2 μL, 100 μL, 1000 μL, 5000 μL)
- Φίλτρα σύριγγας *Whatman Spartan*
- Υάλινη σύριγγα 500 μL *Hamilton*

## 2.2 Παρασκευή διαλυμάτων - Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων

Ως θρεπτικό υλικό για τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* και *Chlorella sorokiniana* χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα TAP. Η παρασκευή 1 L διαλύματος πραγματοποιείται με τα εξής :

- 2.42 g Tris Base
- 1mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ( $K_2HPO_4$  0.5993 M,  $KH_2PO_4$  0.4027M)
- 1mL διάλυμα ιχνοστοιχείων *Hutner's\**
- 10mL διάλυμα A ( $NH_4Cl$  0.7478 M,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0406 M,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.0340 M)
- 1mL Οξικό οξύ

Το pH ρυθμίζεται στο 7.0-7.2 με προσθήκη αραιού διαλύματος HCl. Τα διαλύματα: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, διάλυμα ιχνοστοιχείων *Hutner's* και διάλυμα A παρασκευάζονται σε σχετικά μεγάλη ποσότητα ώστε να υπάρχει διαθέσιμο stock στο εργαστήριο για την πιο άμεση παρασκευή του θρεπτικού TAP.

Πίνακας 1: Σύσταση διαλύματος ιχνοστοιχείων *Hutner's*

<u>compound</u>	<u>amount</u>	<u>water</u>
EDTA disodium salt	5 g	25 mL
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	2,2 g	10 mL
$H_3BO_3$	1,14 g	20 mL
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	0,506 g	5 mL
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,161 g	5 mL
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,157 g	5 mL
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	0,110 g	5 mL
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,499 g	5 mL
<b>*Final Volume = 100mL</b>		

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται με φυγοκέντριση για την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Washing Buffer) για τη πλύση και επαναδιασπορά της μάζας άλγης που βρίσκεται στο κάτω μέρος του δοχείου. Το διάλυμα αποτελείται από :

- 150 mM NaCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O
- 20 mM Tris Base

Μετά από 2 εκπλύσεις πραγματοποιείται νέα φυγοκέντριση απομακρύνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και γίνεται νέα απαναδιασπορά της άλγης σε ελάχιστο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (Storage Buffer) το οποίο αποτελείται από:

- 0.8 M σουκρόζη
- 50 mM NaCl
- 50 mM Tris Base

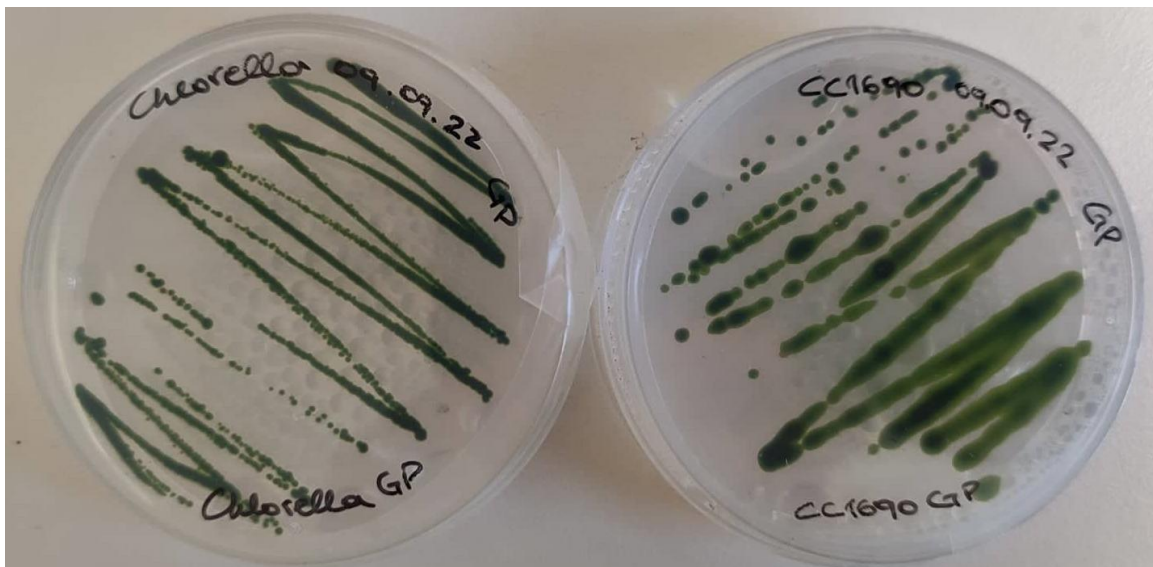
Το pH των 2 διαλυμάτων ρυθμίζεται στο 7 με προσθήκη αραιού διαλύματος HCl και το διάλυμα χρησιμοποιείται κρύο με σκοπό να ελαχιστοποιηθούν οι αλλοιώσεις στα άλγη πριν την αποθήκευση τους στην κατάψυξη στους -18°C.

### 2.3 Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

- Νιτρικό οξύ >68%, *Trace analysis grade, Fisher Chemical*
- Πρότυπο μονοστοιχειακό διάλυμα Ni<sup>2+</sup> 10000 ppm σε 4% HNO<sub>3</sub>, *CPI International Peak Performance*
- Μεθανόλη, MeOH, *Chromasolv for HPLC, ≥ 99,9%, Sigma Aldrich*
- Χλωροφόρμιο, CHCl<sub>3</sub> ≥ 99,8%, *Fisher Chemical*
- Δευτεριωμένοχλωροφόρμιο, CDCl<sub>3</sub> 99.8%, *deuteron*
- Τερεφθαλικός διμεθυλεστέρας, DMT 99.9%, *Fluka*
- Ακετονιτρίλιο ACN, *Chromasolv for HPLC, >99.9 %, Sigma Aldrich*
- Διμεθυλομεθαναμίδιο, DMF, *ACS reagent, ≥99.8 %, Honeywell*
- Φορμικό αμμώνιο, ≥ 99,9%, *Sigma Aldrich*
- Ισοπροπανόλη, ISO, HPLC grade, *Acros Organics*
- Άλας Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, *Sigma Aldrich*
- Άλας AsHNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 99.0% *Chem Service*
- Άλας Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> >98%, *Fluka*

## 2.4 Ανάπτυξη κυττάρων

Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αυξημένες τοξικές συγκεντρώσεις μετάλλων ή μεταλλοειδών τείνουν να βρίσκονται σε κατάσταση στρες. Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται πιο αργά και η μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων είναι μικρότερη από αυτή των καλλιέργειών που έχουν αναπτυχθεί χωρίς κάποια τοξική συγκέντρωση μετάλλου. Όταν η καλλιέργεια φθάσει στη μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων τότε ο αριθμός των νεκρών κυττάρων θεωρείται μεγάλος και το περιβάλλον αποκτάει έναν επιπλέον παράγοντα επιβάρυνσης. Έτσι, για να μελετηθεί η επίδραση του στρες μόνο από την προσθήκη του μετάλλου/μεταλλοειδούς, τα κύτταρα πρέπει να συλλέγονται στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, ώστε η παραγωγή βιομάζας να είναι αρκετή χωρίς να επικρατεί συσσώρευση νεκρών κυττάρων. Επομένως, κρίνεται αναγκαίο πριν την ανάπτυξη των κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα, να προηγηθεί η κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης για να γίνει στο επόμενο στάδιο η συλλογή των κυττάρων τη σωστή χρονική στιγμή.



Εικόνα 14: Στερεές καλλιέργειες *Chlorella sorokiniana* & *Chlamydomonas reinhardtii* (TAP medium με 1.5% άγαρ) σε τριβλία πέτρι.

### 2.4.1 Κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης φωτομετρικά

Για την κατασκευή των καμπυλών ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι σωλήνες με συνολικό όγκο θρεπτικού υγρού 5 mL μαζί με τις κατάλληλες ποσότητες  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$ . Μετά την αποστείρωση ( $120^{\circ}\text{C}$  για 20΄) έγινε προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  υγρής αξενικής καλλιέργειας (περιέχει έναν οργανισμό χωρίς επιμολύνσεις μέσω παρατήρησης από οπτικό μικροσκόπιο) σε κάθε σωλήνα. Για κάθε συνθήκη ανάπτυξης υπήρχαν 3 σωλήνες-επαναλήψεις και η παρακολούθηση της ανάπτυξης γινόταν φωτομετρικά κάθε 12 ώρες καταγράφοντας την οπτική πυκνότητα φωτομετρικά με ακτίνα 750 nm, ένα μήκος κύματος όπου δεν απορροφάει κάποια χρωστική των κυττάρων, επομένως η αύξηση της απορρόφησης ευθύνεται στην αύξηση της σκέδασης που προκαλείται από τον αυξανόμενο αριθμό κυττάρων. Πριν από τη μέτρηση στο φωτόμετρο αναδεύονται με vortex για ομογενοποίηση και τοποθετούνται στην οπτική διαδρομή του οργάνου χάρη σε ειδικό προσαρμογέα για σωλήνες αντί για κυψελίδες. Το πώμα τους αποτελείται από βαμβάκι μέσα σε γάζα που σφινώνει στο άνοιγμα του σωλήνα και καλύπτεται με αλουμινοχαρτό. Έτσι, υπάρχει παροχή  $\text{CO}_2$  από την ατμόσφαιρα για τη φωτοσύνθεση και παράλληλα παρεμπόδιση κάθε σωματιδίου να φθάσει στην καλλιέργεια και να την επιμολύνει. Οι σωλήνες βρισκόνταν σε πλάγια θέση ώστε τα κύτταρα να ακτινοβολούνται ικανοποιητικά συνεχώς και αναδεύονταν διαρκώς ( $\approx 150 \text{ rpm}$ ) για να αιωρούνται στο θρεπτικό υγρό. Η θερμοκρασία κυμαινόταν από  $23\text{-}26^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 15 (αριστερά): Οι καλλιέργειες στους σωλήνες για το σχεδιασμό των καμπυλών ανάπτυξης. (δεξιά): Οι καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.



## 2.4.2 Ανάπτυξη κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα

Για την ανάπτυξη των κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα, προστέθηκαν 150 mL θρεπτικού διαλύματος TAP σε κωνικές φιάλες των 250 mL για τα control κύτταρα, για τα treated κύτταρα προστέθηκε και η κατάλληλη ποσότητα μετάλλου/μεταλλοειδούς από πυκνό πρότυπο διάλυμα. Μετά την αποστείρωση έγινε εμβολιασμός της κάθε κωνικής φιάλης με το θρεπτικό διάλυμα με 0.1 mL υγρής αξενικής καλλιέργειας κυττάρων. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν υπό συνεχή φωτισμό και ανάδευση και συλλέχθηκαν στο τέλος της λογαριθμικής φάσης βάσει της καμπύλης ανάπτυξης. Η συλλογή έγινε με φυγοκέντριση για την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού σε δοχεία των 200 mL. Για την έκπλυση και επαναδιασπορά της μάζας άλγης που βρίσκεται στο κάτω μέρος του δοχείου χρησιμοποιήθηκε Washing Buffer. Τέλος, έγινε νέα επαναδιασπορά της άλγης σε ελάχιστο όγκο Storage Buffer και το πυκνό μίγμα χωρίστηκε σε όγκους του 0.5 mL και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη.

## 2.5 Χώνευση κυττάρων και ποσοτικοποίηση νικελίου

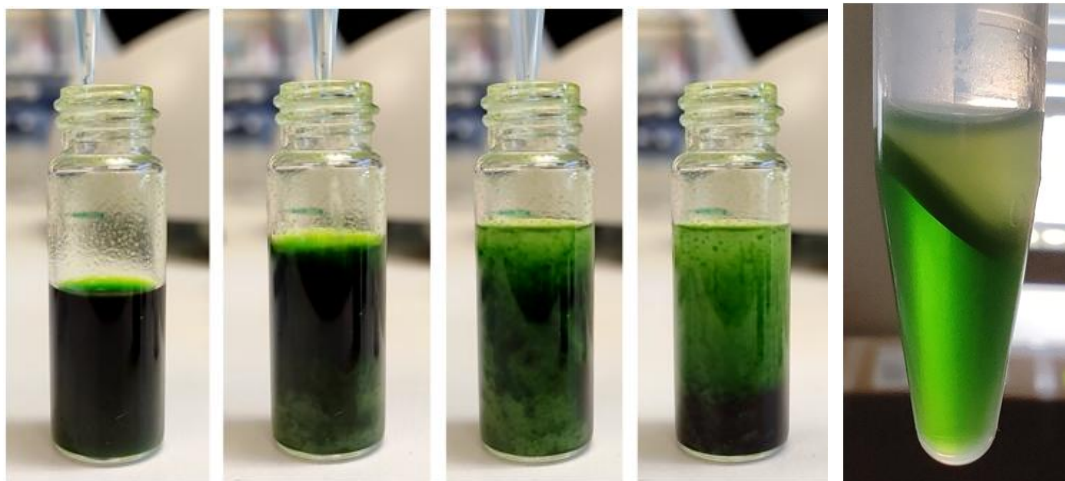
Για την ποσοτικοποίηση της πρόσληψης του νικελίου στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε χώνευση των κυτταρικών δειγμάτων από το εργαστήριο του κ.Λυδάκη. Συγκεκριμένα, σε γνωστή ποσότητα λυοφιλιωμένων κυττάρων  $\approx 100$  mg από κάθε συνθήκη ανάπτυξης, έγινε προσθήκη 2 mL π. $\text{HNO}_3$  (>68% w/w, Trace analysis grade) και τα δείγματα αφέθηκαν για 24 h για να πραγματοποιηθεί η διαλυτοποίηση. Την επόμενη μέρα παρατηρήθηκε ελάχιστο αιώρημα σε μερικά δείγματα επομένως η διαλυτοποίηση υποβοηθήθηκε με ελαφριά θέρμανση μαζί με υπέρηχους για άλλες 2 ώρες περίπου. Τέλος, τα δείγματα αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό σε τελικό όγκο 50 mL με τελική συγκέντρωση 4%  $\text{HNO}_3$ . Για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα νικελίου σε 4%  $\text{HNO}_3$  με συγκεντρώσεις 10, 100, 200, 500 και 1000 ppb.



## 2.6 Εκχύλιση λιπιδίων και προετοιμασία δείγματος για λήψη φασμάτων NMR

Η εκχύλιση των λιπιδίων βασίστηκε στη μέθοδο των Folch et al<sup>[40][41]</sup>. Τα προς ανάλυση δείγματα αποψύχονται, αναδεύονται για ομογενοποίηση με τη χρήση του vortex και πραγματοποιείται φυγοκέντριση με σκοπό την απομάκρυνση του storage buffer με τη βοήθεια μιας πιπέτας Paster ή Gilson. Στη συνέχεια γίνονται 3 κύκλοι έκπλυσης με 1mL υπερκάθαρου νερού κάθε φορά, ανάδευση με vortex, φυγοκέντριση και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Έπειτα, στο υγρό συσσωμάτωμα γίνεται πρώτα προσθήκη 1.4 mL MeOH και μετά 0.7 mL CHCl<sub>3</sub> (αναλογία 2:1) και το μείγμα αναδεύεται για ομογενοποίηση και διάλυση των στερεών. Σε περίπτωση που προστεθεί πρώτα το CHCl<sub>3</sub>, η εκχύλιση δεν πραγματοποιείται διότι το συσσωμάτωμα των κυττάρων είναι υγρό από τις εκπλύσεις με υπερκάθαρο νερό και τα κύτταρα δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τον διαλύτη για να εκχυλιστούν. Ακολουθεί προσθήκη 1 mL NaCl 2M και δημιουργούνται 2 φάσεις. Ο διαχωρισμός των φάσεων μπορεί να επιτευχθεί και χωρίς την παρουσία άλατος αλλά η υψηλή ιοντική ισχύς βοηθάει στον πιο εύκολο διαχωρισμό, στην ελαχιστοποίηση της ποσότητας νερού που παραμένει και στη μείωση των απωλειών λιπιδίων που περνάνε στην πάνω φάση (νερό –μεθανόλη) .

Με φυγοκέντριση οι φάσεις διαχωρίζονται αποτελεσματικά και με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας με βελόνα απομακρύνεται προσεκτικά η κάτω φάση που έχει σκούρο πράσινο χρώμα η οποία περιέχει κυρίως λιπίδια. Ο διαλύτης του δείγματος (κυρίως CHCl<sub>3</sub>) αφαιρείται υπό ελαττωμένη πίεση για περίπου 2 ώρες. Το στερεό πλέον δείγμα επαναδυναμείται σε 0.7 mL CDCl<sub>3</sub> και μεταφέρεται ποσοτικά σε σωλήνα NMR των 5 mm για τη λήψη φάσματος <sup>1</sup>H. Μετά το πέρας της μέτρησης, το υγρό μεταφέρεται από το σωλήνα δείγματος NMR σε υάλινο φιαλίδιο και ο διαλύτης εξατμίζεται είτε υπό ελαττωμένη πίεση είτε με ροή αζώτου. Έπειτα, το στερεό δείγμα φυλλάσσεται στην κατάψυξη.



Εικόνα 16 (αριστερά) : Διαδοχικές φωτογραφίες κατά τη προσθήκη του υδατικού διαλύματος NaCl στο οργανικό μείγμα MeOH/CHCl<sub>3</sub>. Προκαλείται ο άμεσος σχηματισμός 2 φάσεων με κατακρήμνιση του CHCl<sub>3</sub>.

Εικόνα 17 (δεξιά) : Το μείγμα μετά τη φυγοκέντριση, η κάτω φάση αποτελείται κυρίως από λιπίδια σε CHCl<sub>3</sub>, η πάνω φάση αποτελείται από H<sub>2</sub>O/NaCl/MeOH και τα πολικά συστατικά του κυττάρου και στη διεπιφάνεια σχηματίζεται στρώμα αδιάλυτων συστατικών, κυρίως πρωτεΐνες.

## 2.7 Προετοιμασία δείγματος για HPLC-MRM

Για την ανάλυση HPLC-MRM, τα στερεά εκχυλίσματα λιπιδίων από τα οποία έχει ήδη ληφθεί φάσμα <sup>1</sup>H, επαναδιαλύονται σε ≈1 mL διαλύτη CHCl<sub>3</sub>/MeOH με αναλογία 1:4<sup>[42]</sup>. Κάθε δείγμα φιλτράρεται με φίλτρο συμβατό στους οργανικούς διαλύτες, (*Whatman, Spartan* με αναγεννημένη κυτταρίνη) και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη του οργάνου.

## 2.8 Προετοιμασία δείγματος για EASI-MS

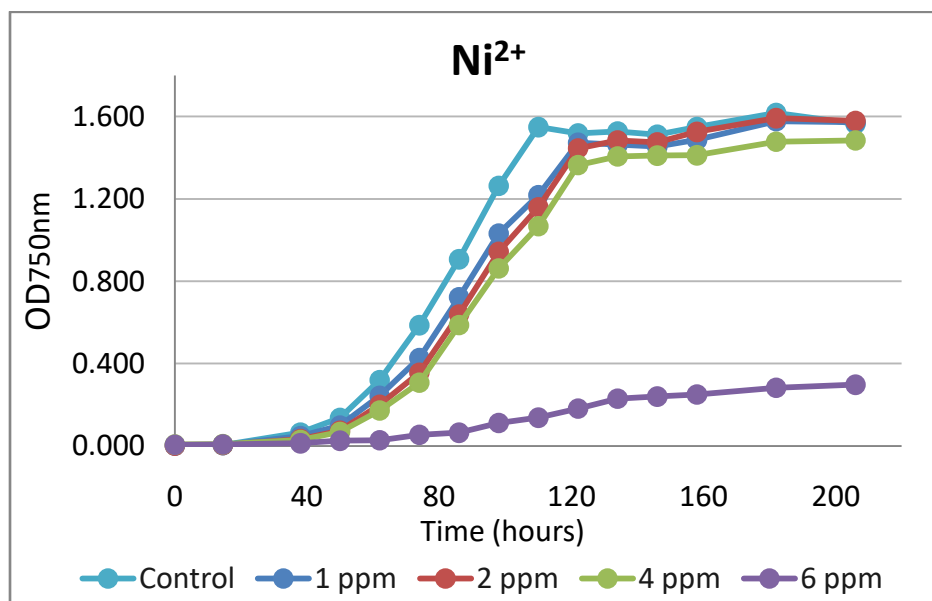
Για την ανάλυση EASI-MS, τα δείγματα κυττάρων πλένονται με υπερκάθαρο νερό με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε και στη προετοιμασία των δειγμάτων για εκχύλιση λιπιδίων, χρησιμοποιώντας όμως πολύ μικρότερη ποσότητα κυττάρων καθώς η ευαισθησία του MS είναι τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή του NMR. Το πλύσιμο αποσκοπεί στην αποφυγή της καταστολής ιονισμού των αναλυτών από τα άλατα και τη σουκρόζη που προϋπάρχουν από το storage buffer. Στο τελευταίο

πλύσιμο, σκόπιμα δεν αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του νερού, ώστε τα κύτταρα να επαναιωρηθούν σε μικρή ποσότητα νερού. Κάθε φορά γινόταν λήψη 1 μL από το πυκνό μίγμα και τοποθετούνταν ως μικρή σταγόνα πάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου και αφέθηκε να εξατμιστεί το νερό κάτω από συνθήκες περιβάλλοντος για περίπου μισή ώρα πριν την ανάλυση EASI-MS. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν 3 κηλίδες κυττάρων, ώστε να γίνουν οι 3 επαναλήψεις των μετρήσεων.

## Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα - Συζήτηση

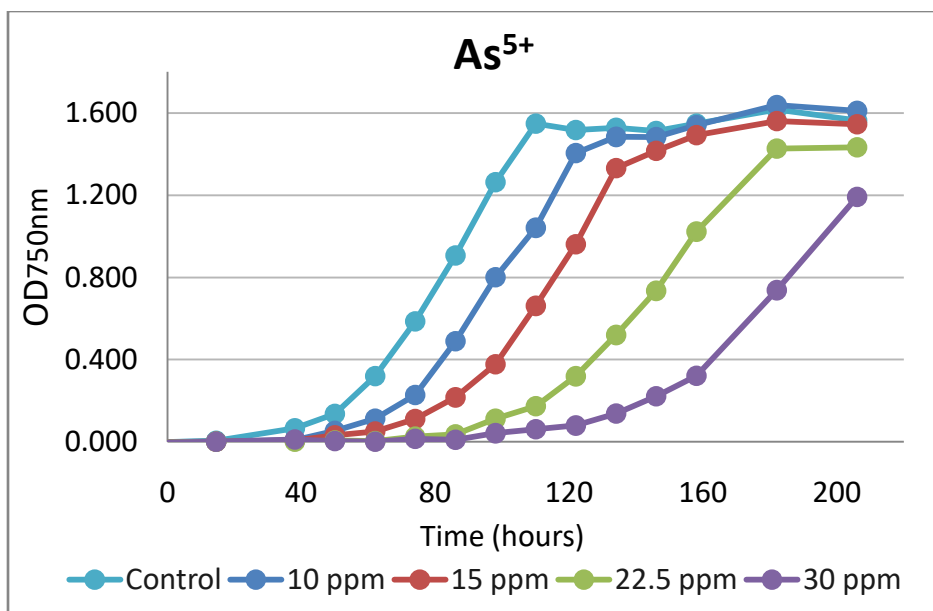
### 3.1 Εκτίμηση της ανάπτυξης *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσία $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{As}^{5+}$ , $\text{Se}^{6+}$

Τα κύτταρα που έχουν αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό TAP, χωρίς κάποια προσθήκη μετάλλων/μεταλλοειδών, έχουν την πιο γρήγορη ανάπτυξη φθάνοντας στο υψηλότερο πλατό οπτικής πυκνότητας σε περίπου 100 ώρες ( $\approx 4$  ημέρες). Έπειτα, με αύξηση της συγκέντρωσης των  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  παρατηρείται κάποια αυξανόμενη χρονική καθυστέρηση (lag time) στην ανάπτυξη των κυττάρων τα οποία φθάνουν το πλατό απορρόφησης καθυστερημένα και με μικρότερες τιμές, που συνεπάγεται μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας. Οπτικά, στο τέλος των μετρήσεων, οι καλλιέργειες είχαν έντονα πράσινο χρώμα εκτός από αυτές των υψηλότερων συγκεντρώσεων που είχαν απλώς χλωρό χρώμα λόγω του μικρότερου πληθυσμού άλγεων.



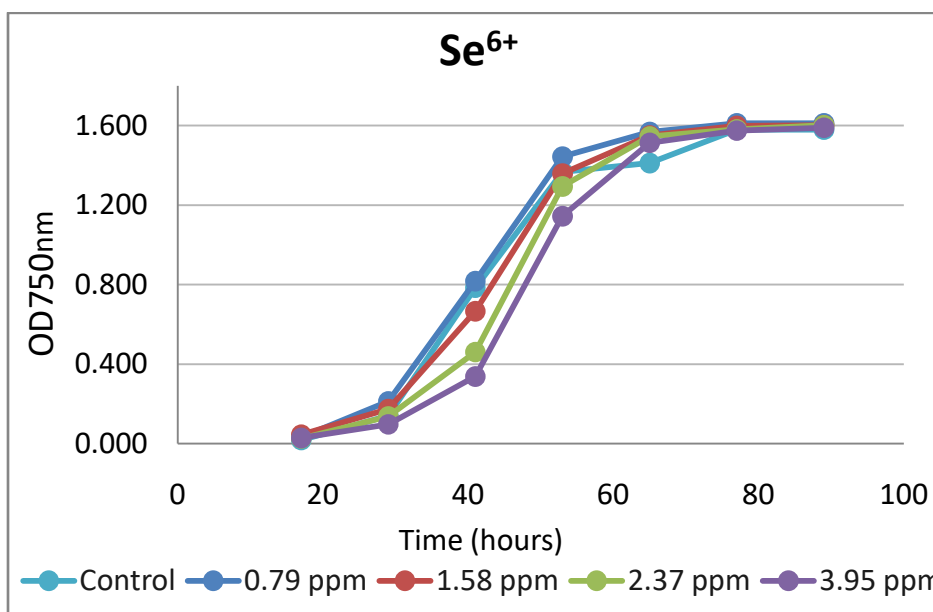
Εικόνα 18: Καμπύλη ανάπτυξης *Chlamydomonas reinhardtii* σε 1, 2, 4, 6 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  συγκριτικά με Control κύτταρα.

Οι συγκεντρώσεις 1, 2 και 4 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  έχουν ασθενή επίδραση στην ανάπτυξη, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση των 6 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  η οποία έχει αξιοσημείωτη τοξικότητα δείχνοντας ότι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι απαγορευτικές-θανατηφόρες για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων.



Εικόνα 19: Καμπύλη ανάπτυξης *Chlamydomonas reinhardtii* σε 10, 15, 22.5, 30 ppm  $As^{5+}$  συγκριτικά με Control κύτταρα.

Στην περίπτωση του  $As^{5+}$  η παρεμπόδιση της ανάπτυξης φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση 30 ppm επιτρέπει την παραγωγή σχετικά μεγάλης συγκέντρωσης βιομάζας με σημαντική όμως καθυστέρηση σε σύγκριση με τα control κύτταρα.



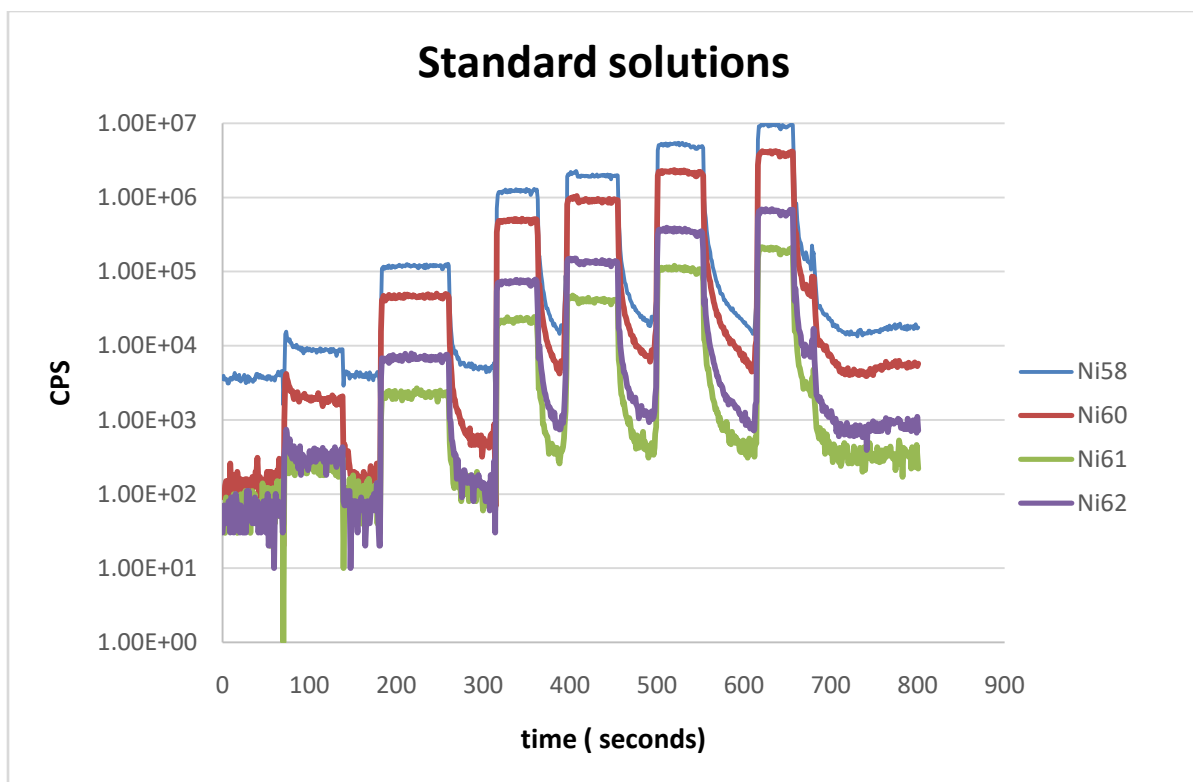
Εικόνα 20: Καμπύλη ανάπτυξης *Chlamydomonas reinhardtii* σε 0.79, 1.58, 2.37, 3.95 ppm  $Se^{6+}$  συγκριτικά με Control κύτταρα.

Οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις  $\text{Se}^{6+}$  στις οποίες αναπτύχθηκαν τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* είχαν τη μεγαλύτερη τοξικότητα συγκριτικά με τα άλλα δύο στοιχεία. Η συγκέντρωση 3.95 ppm φαίνεται να μην επιτρέπει τη παραγωγή αξιόλογης συγκέντρωσης βιομάζας, παρόλα αυτά στην ανάπτυξη των κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα λήφθηκε ικανοποιητική ποσότητα για τις αναλύσεις.

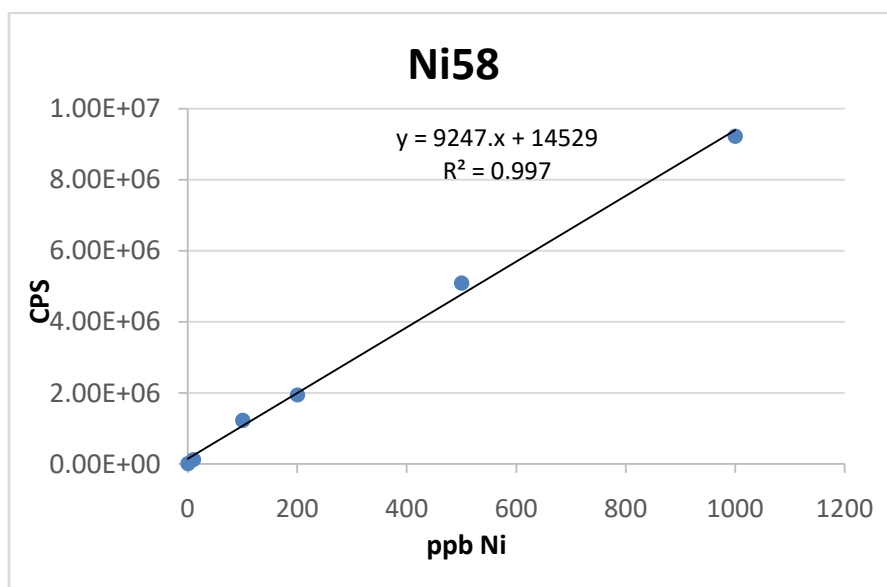
### 3.2 Ποσοτικοποίηση Ni σε κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις $\text{Ni}^{2+}$ με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευμένου πλάσματος (ICP-MS)

Στη παρούσα εργασία, εφόσον μελετάται η επίδραση που έχει η ανάπτυξη παρουσία  $\text{Ni}^{2+}$  στο λιπιδικό προφίλ των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*, κρίνεται ενδιαφέρουσα η ποσοτικοποίηση του μετάλλου που βιοαπορροφάει το κύτταρο σε κάθε συνθήκη.

Το κύριο ισότοπο του νικελίου (68,1% αφθονία), το  $^{58}\text{Ni}$ , συχνά έχει ισοβαρικές παρεμποδίσεις όπως  $^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ . Για αυτό τον λόγο, στο παρόν πείραμα, παρακολουθούνται και τα υπόλοιπα ισότοπα  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{61}\text{Ni}$ ,  $^{62}\text{Ni}$  με αφθονίες 26.2%, 1.1% και 3,6% αντίστοιχα. Εφόσον επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αμελητέων παρεμποδίσεων, τα τελικά αποτελέσματα υπολογίζονται βάσει πρότυπης καμπύλης για το πιο άφθονο ισότοπο.



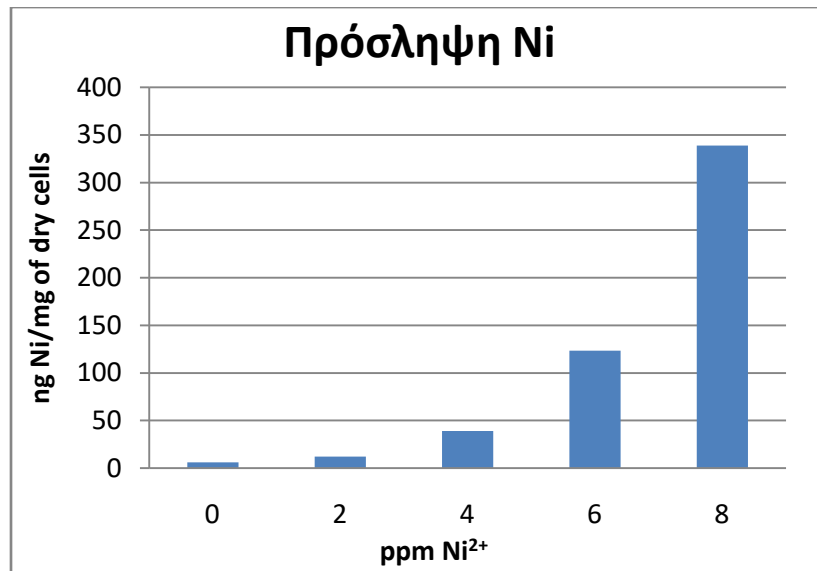
Εικόνα 21: Απόκριση ανιχνευτή (counts per second-cps) συναρτήση του χρόνου για κάθε ισότοπο  $Ni^{2+}$  για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 10, 100, 200, 500 και 1000 ppb  $Ni^{2+}$ . Μεταξύ κάθε προτύπου, εισάγεται υπερκάθαρο νερό.



Εικόνα 22: Καμπύλη βαθμονόμησης  $^{58}Ni$  βάσει πρότυπων διαλυμάτων με ικανοποιητική γραμμικότητα.

Πίνακας 2: δεδομένα και υπολογισμοί βάσει πρότυπης καμπύλης. Ο όγκος του δείγματος ήταν 50mL.

Δείγμα	avg. CPS-Ni <sup>58</sup>	mg δείγματος	ng/mL	ng/50mL	ng/mg κυττάρων
control	321701	156.4	19.0	953.8	6.1
2 ppm Ni <sup>2+</sup>	358210	94.5	23.0	1151.2	12.2
4 ppm Ni <sup>2+</sup>	1010450	120.3	93.5	4677.6	38.9
6 ppm Ni <sup>2+</sup>	2469445	101.9	251.3	12566.0	123.3
8 ppm Ni <sup>2+</sup>	5234382	81.2	550.3	27515.1	338.9



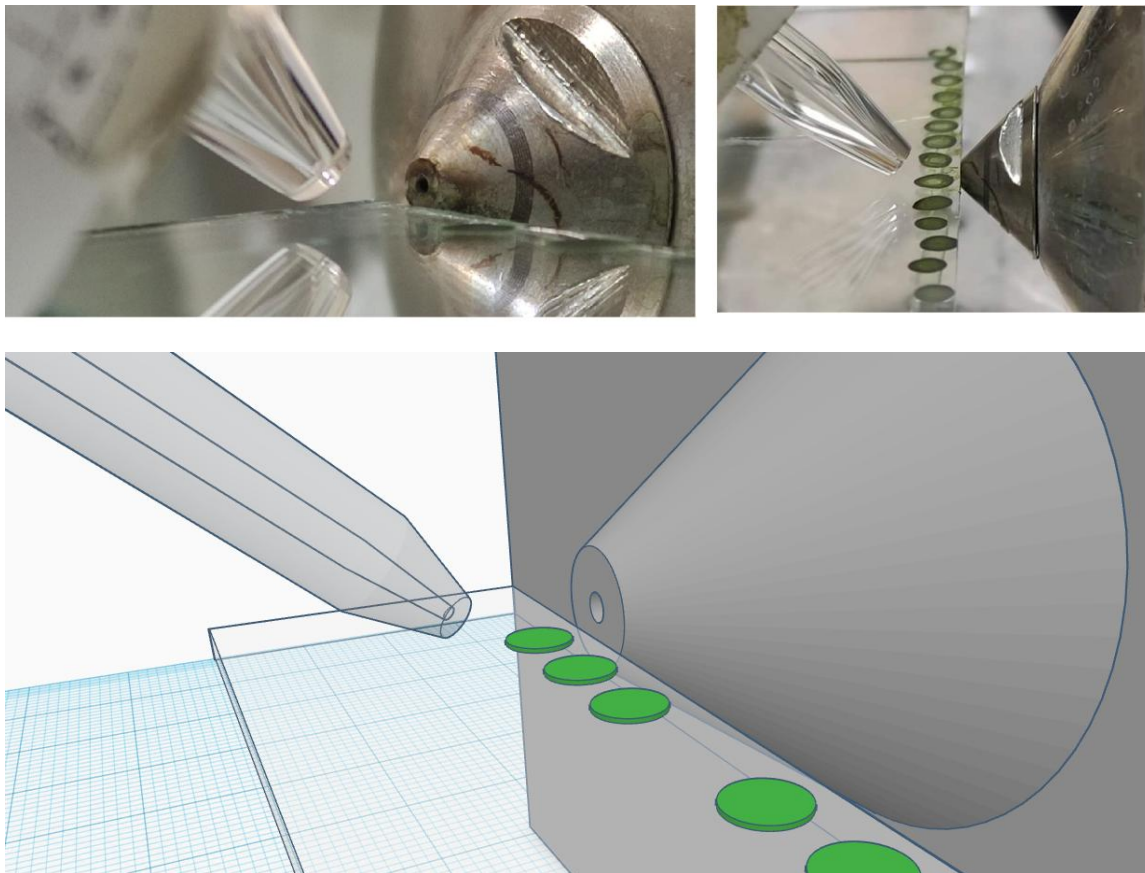
Εικόνα 23: Ποσότητα νικελίου σε ng ανά mg λυοφιλοποιημένων κυττάρων καλλιεργημένων σε θρεπτικό υλικό με Ni<sup>2+</sup>.

Τα αποτελέσματα δείχνουν εκθετική αύξηση πρόσληψης νικελίου με την αύξηση της συγκέντρωσης στο θρεπτικό διάλυμα. Οι μετρήσεις βιοαπορρόφησης του Se<sup>6+</sup> και As<sup>5+</sup> από τα *Chlamydomonas reinhardtii* έχουν πραγματοποιηθεί από άλλα μέλη της ερευνητικής ομάδας.



### 3.3 Απευθείας ανάλυση μεμβρανικών λιπιδίων σε κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* με φασματομετρία μάζας εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (EASI-MS)

Η συγκεκριμένη τεχνική που έχει αναπτυχθεί και στο εργαστήριο μας, επιτρέπει τη γρήγορη και σχετικά απλή ανάλυση ορισμένων πολικών λιπιδίων σε άθικτα κύτταρα. Τα φάσματα που λαμβάνονται είναι παρόμοια με αυτά από πηγή ESI, το οποίο όμως απαιτεί την εκχύλιση των λιπιδίων και το φιλτράρισμα του κάθε δείγματος.

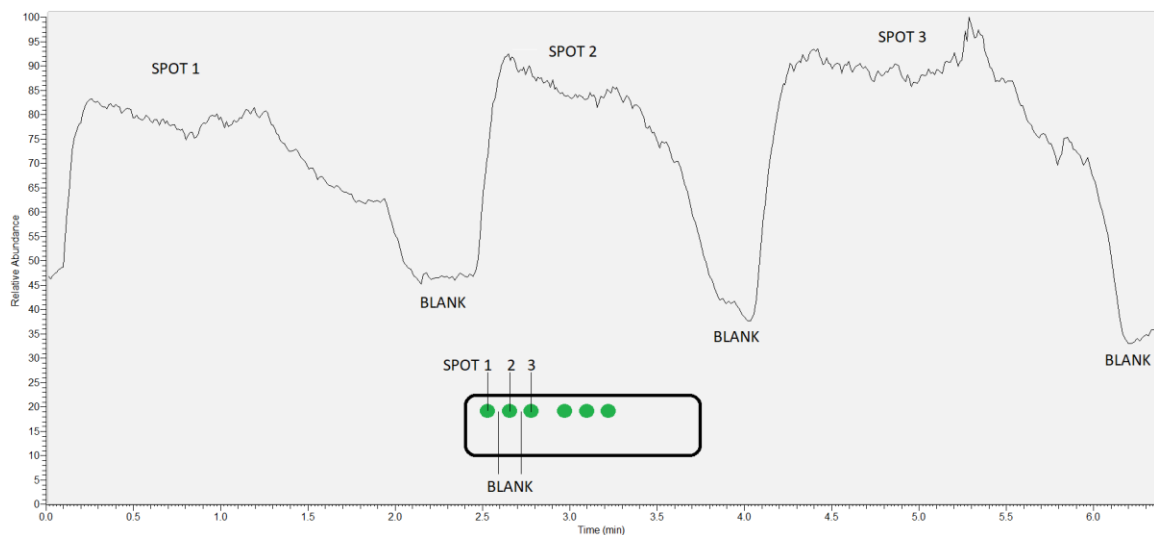


Εικόνα 24: Η πειραματική διάταξη EASI-MS. Ο εκνεφωτής παράγει αερόλυμα διαλύτη/αζώτου και υπό γωνία σημαδεύεται η κηλίδα κυττάρων όπου πραγματοποιείται εκχύλιση/εκρόφηση με τους αναλύτες να κατευθύνονται στην οπή του οργάνου. Στο στένεμα του εκνεφωτή, η ταχύτητα του  $N_2$  είναι μεγάλη και προκαλεί αεροδυναμική σχάση στη ροή του διαλύτη.

Ο γυάλινος εκνεφωτής που χρησιμοποιήθηκε είναι εμπορικά διαθέσιμος για χρήση σε ICP-MS. Ο διαλύτης για τη λιπιδική ανάλυση είναι μίγμα ACN:DMF 1:1 v/v σε

χαμηλή ροή 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Το αέριο εκνέφωσης  $\text{N}_2$  σε πίεση 5 bar παρέχεται από γεννήτρια αζώτου.

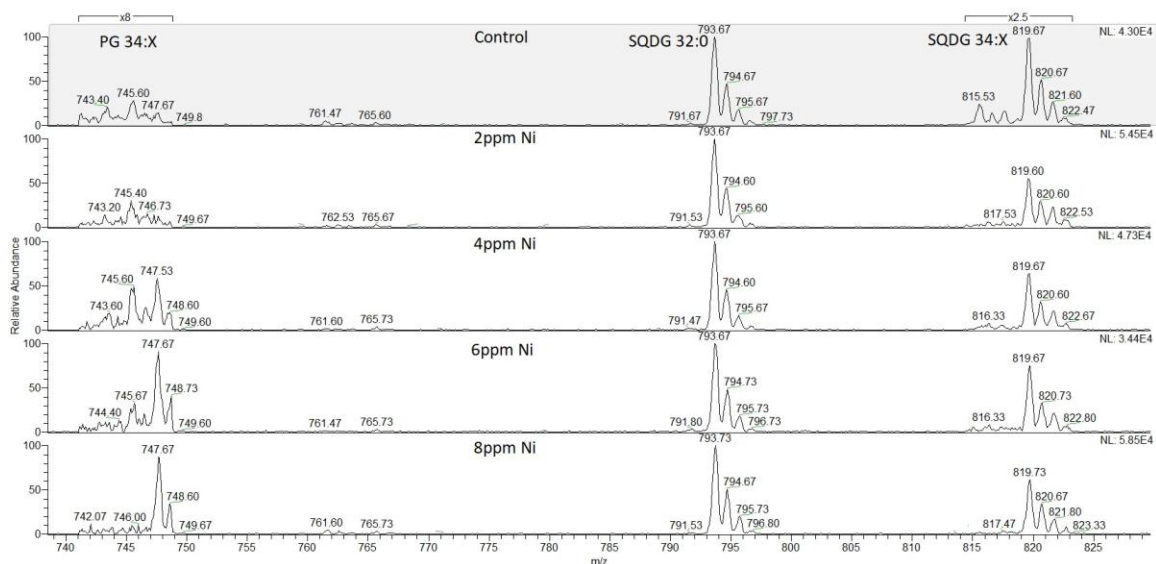
Κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές και μόνο η σχετική ποσοτικοποίηση των λιπιδίων είναι δυνατή διότι δεν έχει προστεθεί κάποιο εσωτερικό πρότυπο. Επίσης, η ποσότητα των κυττάρων στο κάθε δείγμα δεν είναι γνωστή. Η κηλίδα δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη στην γυάλινη πλάκα, καθώς όταν το νερό από τις σταγόνες εξατμίζεται, τα κύτταρα τείνουν να συγκεντρώνονται στις άκρες σχηματίζοντας έναν δακτύλιο. Επίσης, η διάταξη είναι αρκετά ευαίσθητη στις γεωμετρικές αλλαγές.



Εικόνα 25: Συνολική ένταση σήματος κατά την ανάλυση συναρτήση χρόνου ενός δείγματος με 3 επαναλήψεις. Το σήμα ελαττώνεται καθώς ο διαλύτης εκνέφωσης απομακρύνει τα κύτταρα από την υάλινη πλάκα. Ενδιάμεσα από κάθε επανάληψη, το αερόλυμα στοχεύεται σε καθαρή υάλινη περιοχή.

Πίνακας 3: Τιμές  $m/z$  λιπιδίων του *Chlamydomonas reinhardtii* που εμφανίζονται στον αρνητικό ιοντισμό βάσει παλαιότερης εργασίας, που εκπονήθηκε στο εργαστήριο από διατριβή Μαυρουδάκη Λεωνίδα<sup>[45]</sup>.

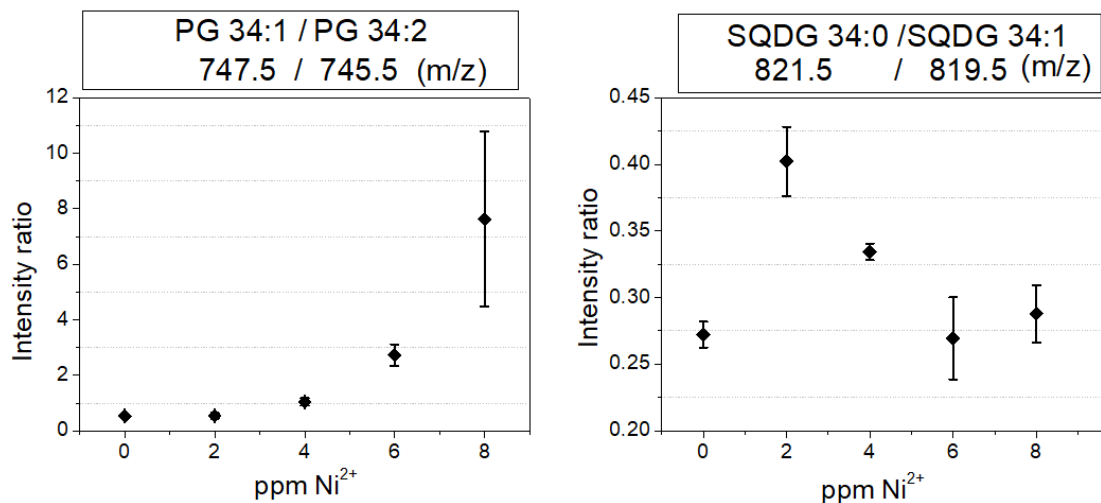
Experimental m/z	Theoretical m/z	Adduct	Identified Species
741.5	741.47	[M-H] <sup>-</sup>	PG(18:3/16:1)
743.5	743.49	[M-H] <sup>-</sup>	PG(18:3/16:0)
745.5	745.50	[M-H] <sup>-</sup>	PG(18:2/16:0)
747.5	747.52	[M-H] <sup>-</sup>	PG(18:1/16:0)
761.5	761.45	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(14:2/16:0)
791.5	791.50	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(16:0/16:1)
793.5	793.51	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(16:0/16:0)
815.5	815.50	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(18:3/16:0)
817.5	817.51	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(18:2/16:0)
819.5	819.53	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(18:1/16:0)
821.5	821.55	[M-H] <sup>-</sup>	SQDG(18:0/16:0)



Εικόνα 26: Μεγεθυμένα διαδοχικά φάσματα μάζας control κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* και καλλιεργημένων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ni<sup>2+</sup> σε αρνητικό ιοντισμό με την τεχνική EASI-MS με έμφαση στις κορυφές των λιπιδίων.

Η κύρια ομάδα λιπιδίων που εμφανίζονται στον αρνητικό ιοντισμό είναι η σουλφοκινοβοσυλοδιακυλογλυκερόλη SQDG και δευτερεύουσα η φωσφατιδογλυκερόλη, PG. Με αύξηση της συγκέντρωσης του Ni<sup>2+</sup>, στο εύρος 815.5-821.5 m/z, η κύρια αλλαγή που εμφανίζεται είναι η απότομη μείωση της κορυφής 815.5 m/z του πολυακόρεστου SQDG (34:3). Στο εύρος 741.5-747.5 m/z, η σχετική

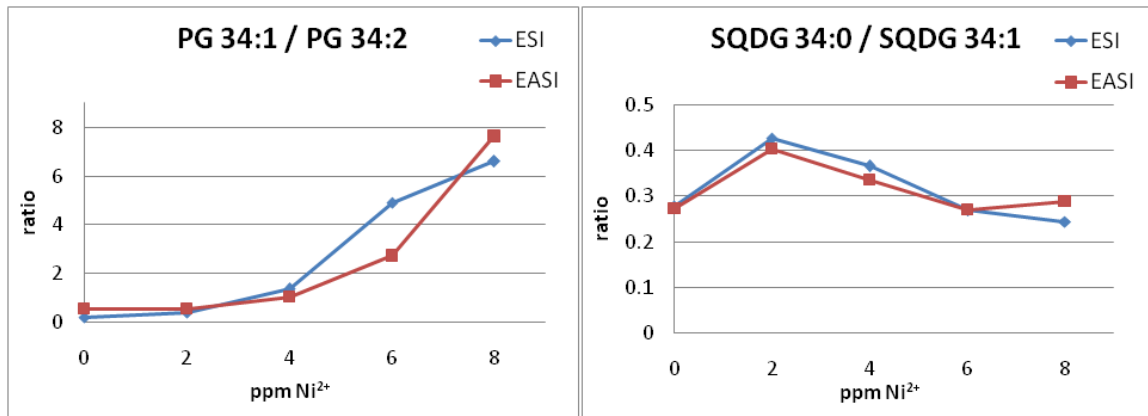
αύξηση της έντασης της κορυφής 747.5 m/z του πιο κορεσμένου είδους PG (34:1) είναι θεαματική με αύξηση της συγκέντρωσης του Ni<sup>2+</sup>.



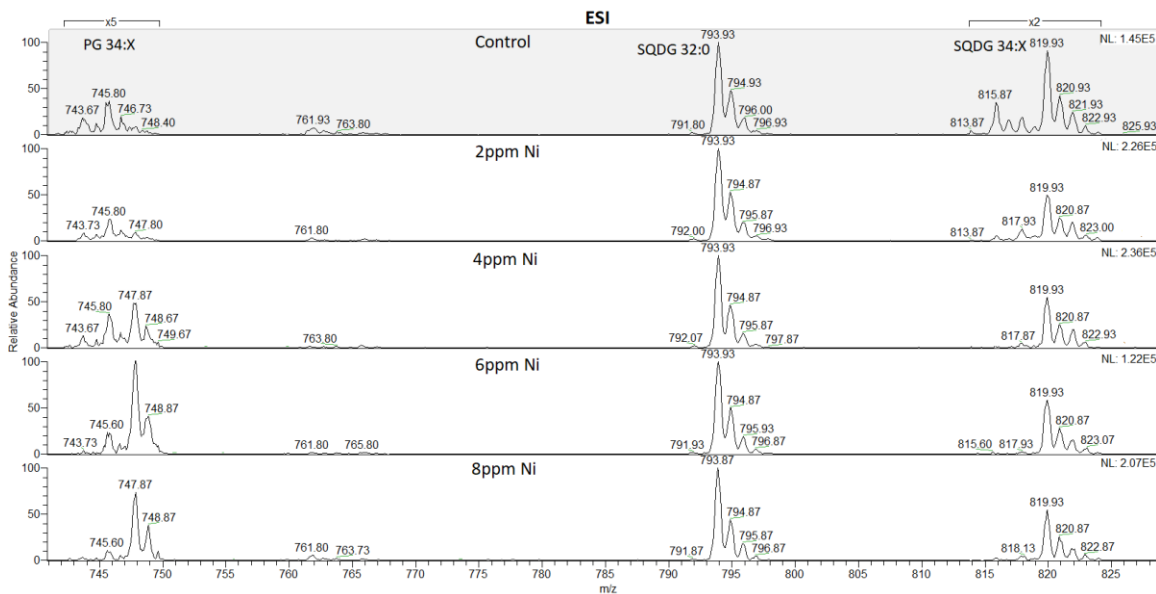
Εικόνα 27: Οι λόγος εντάσεων των PG 34:1/34:2 και SQDG 34:0/34:1 με  $\pm 1.96$  SD (τυπική απόκλιση βάσει των 3 τεχνικών επαναλήψεων).

Από τα παραπάνω, φαίνεται και σχεδιαγραμματικά (εικόνα 27) η σχετική ενίσχυση του ακόρεστου PG 34:2 έναντι του λιγότερο ακόρεστου PG 34:1 με αύξηση της συγκέντρωσης με Ni<sup>2+</sup>. Το σφάλμα του λόγου στα 8 ppm Ni<sup>2+</sup> είναι μεγάλο διότι η κορυφή 745.5 m/z έχει πολύ μικρό S/N (λόγος σήματος προς θόρυβο). Στην περίπτωση των δύο διαδοχικών SQDG οι σχετικές εντάσεις δεν αλλάζουν αξιοσημείωτα επομένως δεν υπάρχει κάποια τάση- συσχέτιση της αναλογίας με τη συγκέντρωση Ni<sup>2+</sup>.

Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και στη περίπτωση που τα δείγματα υποστούν εκχύλιση με τον ίδιο διαλύτη ACN:DMF 1:1 v/v και το εκχύλισμα αναλυθεί χρησιμοποιώντας την πηγή ηλεκτροψεκασμού ESI για εισαγωγή του δείγματος στο MS.



Εικόνα 28: Οι λόγιοι εντάσεων των PG 34:1/34:2 και SQDG 34:0/34:1 βάσει ESI και EASI.



Εικόνα 29: Μεγεθυμμένα διαδοχικά φάσματα μάζας εκχυλίματος control κυτάρων *Chlamydomonas reinhardtii* και κυτάρων καλλιεργημένων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ni σε αρνητικό ιοντισμό με την τεχνική ESI-MS με έμφαση στις κορυφές των λιπιδίων.

Πίνακας 4: Βασικοί παράμετροι του οργάνου με τις δυο πηγές. Ο ηλεκτροψεκασμός απαιτεί υψηλή τάση και βοηθητικές ροές N<sub>2</sub>.

	ESI	EASI
Source Voltage (kV):	4.02	0.02
Source Current (uA):	0.29	0.14
Sheath Gas Flow Rate (l/min):	49.71	-0.15
Aux/Sweep Gas Flow Rate (l/min):	4.13	-0.22
Capillary Voltage (V):	-80.73	-4.69
Capillary Temp (C):	300.00	300.40
Tube Lens Voltage (V, set po	-95.00	-15.00

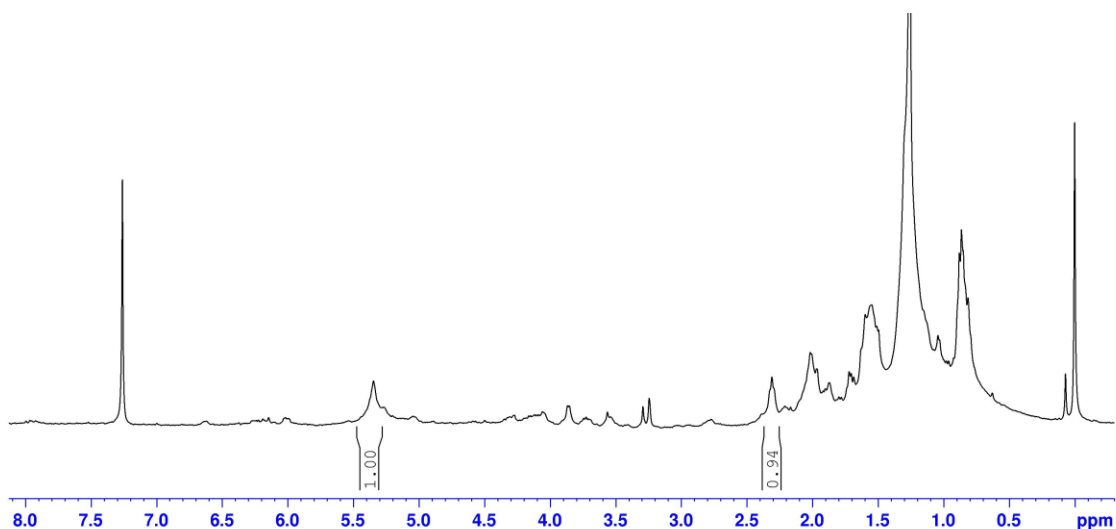
Τα παραπάνω αποτελούν σημαντική ένδειξη για την μείωση της ακορεστότητας των μεμβρανικών λιπιδίων, βάσει των συγκεκριμένων PG και SQDG, με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης σε Ni<sup>2+</sup>. Για αυτό τον λόγο, έγιναν επιπλέον μετρήσεις με HPLC-MS με τη μέθοδο MRM και με NMR, ώστε να επιβεβαιωθεί και να ποσοτικοποιηθεί αυτό το φαινόμενο. Οι μετρήσεις με την τεχνική EASI-MS για τα *Chlamydomonas reinhardtii* που έχουν καλλιεργηθεί παρουσία Se<sup>6+</sup> και As<sup>5+</sup> έχουν πραγματοποιηθεί από άλλα μέλη της ερευνητικής ομάδας.

### 3.4 Προσδιορισμός ακορεστότητας λιπιδίων των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Από τις πρώτες μετρήσεις EASI-MS, υπάρχουν ενδείξεις ότι το λιπιδικό προφίλ των *Chlamydomonas reinhardtii* τείνει να γίνεται πιο κορεσμένο όταν αναπτύσσονται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $\text{Ni}^{2+}$ . Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν λόγους συγκεκριμένων κορεσμένων/ακόρεστων πολικών μεμβρανικών λιπαρών και έτσι δεν μπορεί να εξαχθεί ένα συμπέρασμα για την ακορεστότητα του συνολικού λιπιδικού προφίλ των κυττάρων. Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για την ανάλυση λιπών και εύκολα προσδιορίζεται η συνολική ακορεστότητα του δείγματος. Στις πρώτες δοκιμές που έγιναν, λήφθηκε φάσμα  $^1\text{H}$  με την τεχνική HR-MAS (high-resolution magic angle spinning) διότι δεν απαιτείται προετοιμασία δείγματος και η ποσότητα κυττάρων που απαιτείται για τη μέτρηση είναι ελάχιστη.

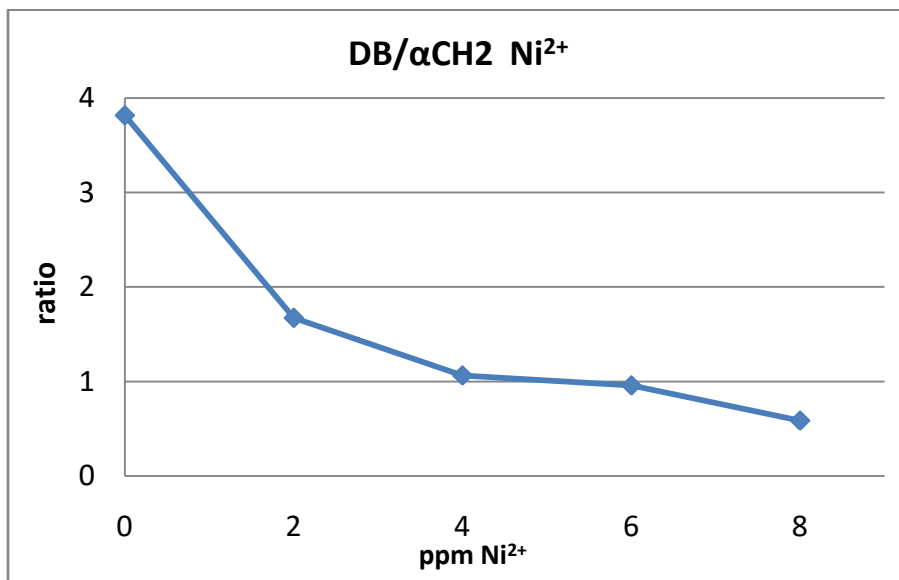
Γενικά, στα φάσματα  $^1\text{H}$  με  $\text{CDCl}_3$ , εμφανίζεται πάντα κορυφή στα 7.26 ppm από τα ίχνη  $\text{CHCl}_3$  που υπάρχουν. Τα πρωτόνια του νερού από τα ίχνη υγρασίας εμφανίζονται στα 1.56 ppm και το τετραμέθυλοσιλάνιο, TMS, που υπάρχει συνήθως στο διαλύτη για βαθμονόμηση, απορροφάει στα 0 ppm. Σε κάποια φάσματα εμφανίζεται μια οξεία κορυφή στα 2.17 ppm η οποία προέρχεται από τα υπολείμματα ακετόνης από το πλύσιμο των σωλήνων<sup>[46]</sup>.

Μικρή ποσότητα control και κυττάρων καλλιεργημένων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $\text{Ni}^{2+}$  λυοφιλοποιήθηκε και  $\approx 2$  mg ξηρής σκόνης κυττάρων από κάθε δείγμα προστέθηκε στον κατάλληλο ρότορα μαζί με 12  $\mu\text{L}$   $\text{CDCl}_3$  για τη λήψη φάσματος  $^1\text{H}$  με HR-MAS.



Εικόνα 30: Ενδεικτικό φάσμα HR-MAS  $^1\text{H}$  *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 4 ppm  $\text{Ni}^{2+}$  με ολοκληρώσεις για υπολογισμό  $\text{DB}/\alpha\text{CH}_2$ .

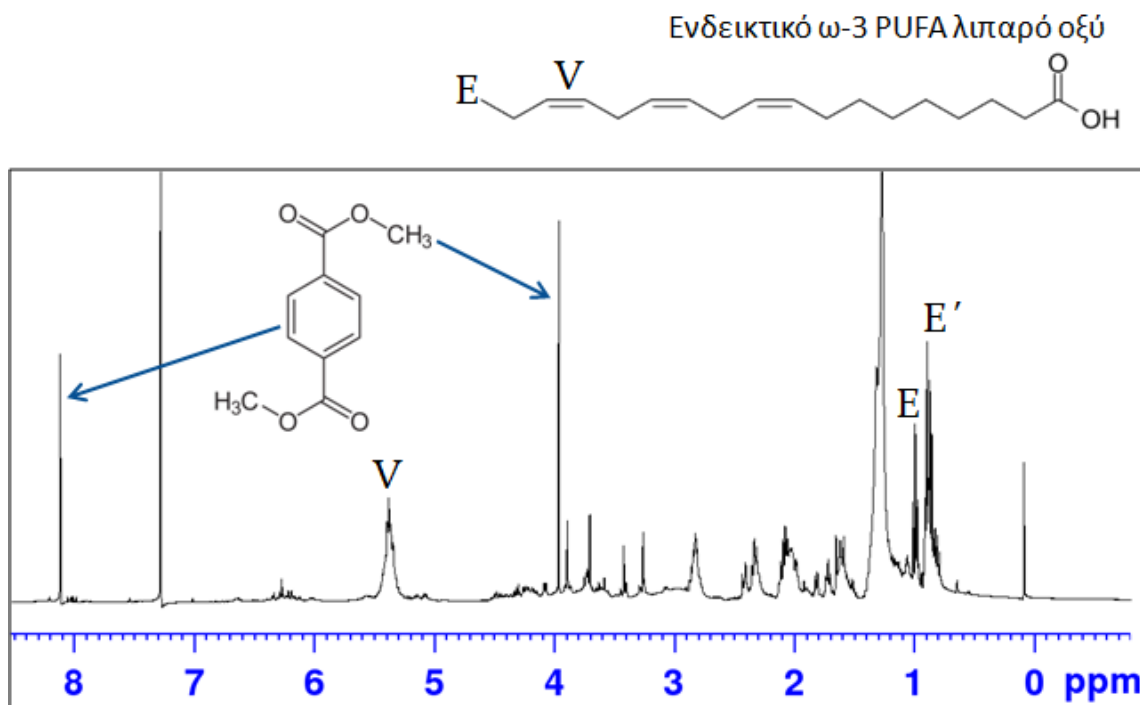
Τα πρωτόνια των διπλών δεσμών (DB) όλων των λιπιδίων του δείγματος απορροφούν στα 5.35 ppm και τα πρωτόνια του  $\alpha$ -άνθρακα ( $\alpha\text{CH}_2$ ), δηλαδή του πρώτου άνθρακα της αλειφατικής αλυσίδας του κάθε λιπαρού οξέος από τη πλευρά του καρβοξυλίου, απορροφούν στα 2.3 ppm. Ολοκληρώνοντας τις δύο κορυφές και υπολογίζοντας τον λόγο  $\text{DB}/\alpha\text{CH}_2$  μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για τη συνολική ακορεστότητα των λιπαρών των κυττάρων. Για λόγους ευκολίας, σε κάθε φάσμα  $^1\text{H}$  η τιμή της ολοκλήρωσης της κορυφής των διπλών δεσμών ορίζεται σαν 1,000.





Εικόνα 31: Σχεδιαγραμματικά η μείωση του λόγου  $DB/\alpha CH_2$  με την αυξανόμενη συγκέντρωση  $Ni^{2+}$ .

Από το παραπάνω διάγραμμα (εικόνα 31), φαίνεται πως η σχετική ένταση της κορυφής των διπλών δεσμών ελαττώνεται σημαντικά με την παρουσία  $Ni^{2+}$ . Το στρες που προκαλείται στα κύτταρα από τα συγκεκριμένα κατιόντα προκαλεί μείωση στον βαθμό ακορεστότητας των λιπιδίων. Επίσης, εφόσον τα πρωτόνια του κάθε διπλού δεσμού είναι 2 και τα πρωτόνια του  $\alpha CH_2$  είναι επίσης 2 (αναλογία 1:1), ο λόγος  $DB/\alpha CH_2$  θα μπορούσε να ταυτιστεί με τον μέσο αριθμό διπλών δεσμών ανά λιπαρό οξύ. Το πρόβλημα στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η ύπαρξη επιπλέον συστατικών στο δείγμα που απορροφούν σε αυτές τις περιοχές καθώς η μέτρηση γίνεται σε όλο το κύτταρο χωρίς να έχει προηγηθεί απομόνωση των λιπαρών. Παρόλα αυτά, οι ενδείξεις για κορεσμό των λιπαρών είναι ισχυρές και για αυτό γίνονται περαιτέρω μετρήσεις με μεγαλύτερη ακρίβεια με συμβατικό υγρής κατάστασης, NMR σε σχετικά καθαρό εκχύλισμα λιπαρών από τα κύτταρα.



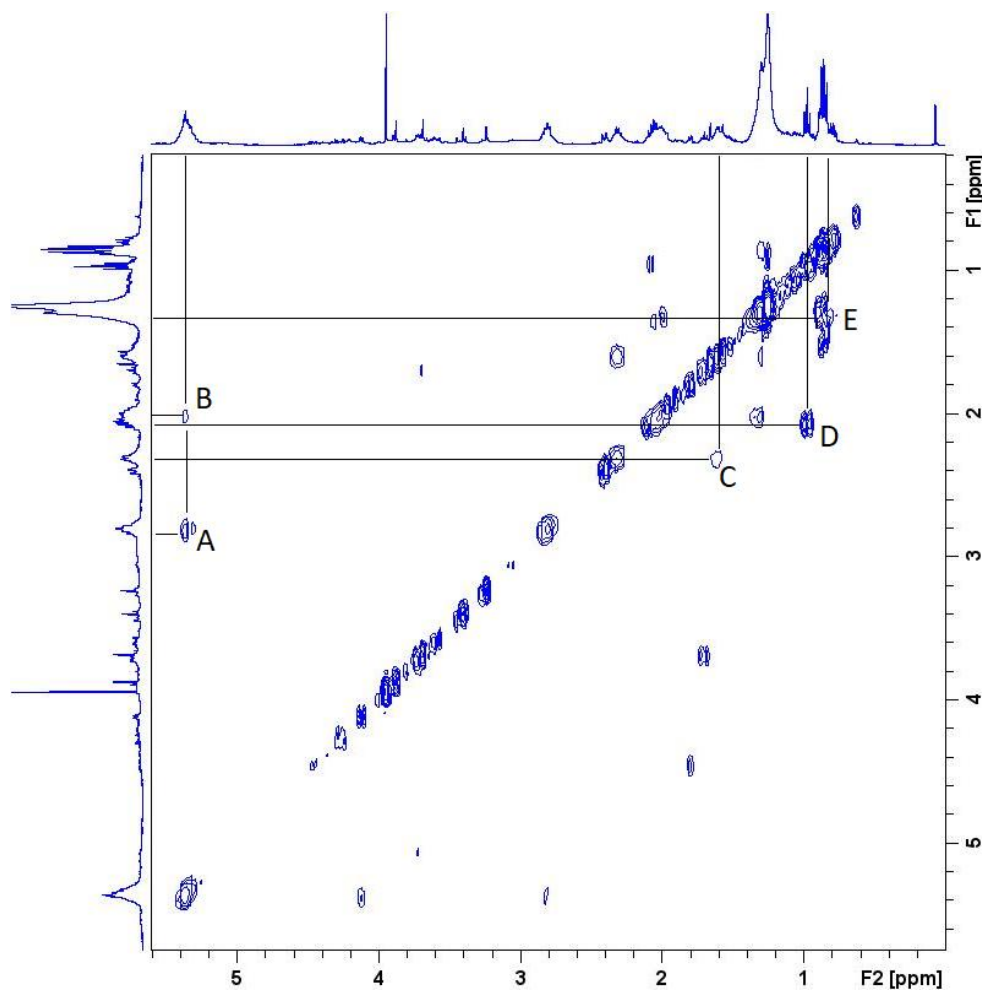
Εικόνα 32: Φάσμα  $^1H$  λιπιδικού εκχυλίσματος control κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε  $CDCl_3$  μαζί με DMT για ποσοτικοποίηση, αντιστοίχιση κορυφών σε πρωτόνια ενός ενδεικτικού λιπαρού οξέος.

Τα φάσματα που λήφθηκαν με συμβατικό NMR υγρής φάσης, έχουν σημαντικά μεγαλύτερη ανάλυση με στενές κορυφές. Με πρώτη ματιά, το δείγμα-εκχύλισμα

φαίνεται να περιέχει κυρίως λιπαρά. Η αντιστοίχιση κάθε πρωτονίου των λιπαρών οξέων στις κορυφές γίνεται βάσει βιβλιογραφίας και χημικής μετατόπισης. Για επιπλέον επιβεβαίωση γίνεται λήψη 2-D φασμάτων<sup>[47][48]</sup>.

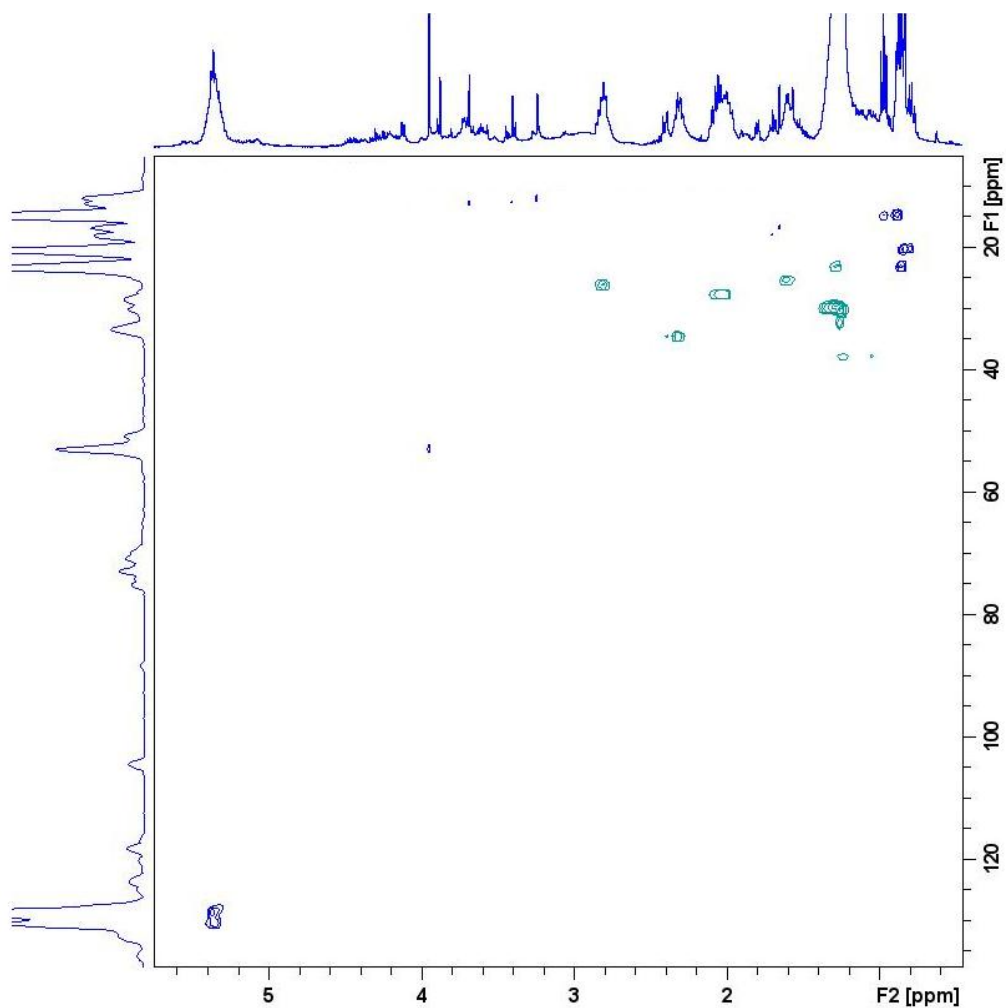
Πίνακας 5: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών πρωτονίων των λιπαρών οξέων.

Θέση πρωτονίων	Περιοχή απορ. (ppm)
-HC=CH-	5.35
-HC=CHCH <sub>2</sub> HC=CH-	2.8
-COCH <sub>2</sub> -	2.3
-HC=CHCH <sub>2</sub> -	2.05
-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	1.6
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	1.25
-CH <sub>3</sub> ω-3	0.97
-CH <sub>3</sub>	0.86



Εικόνα 33: Φάσμα COSY λιπιδικού εκχυλίσματος control κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* με επισημασμένες τις κύριες κορυφές.

Το φάσμα COSY (εικόνα 32) δείχνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών πρωτονίων. Το σήμα A και B υποδεικνύει ότι τα πρωτόνια στα 5.35 ppm είναι γειτονικά με τα πρωτόνια στα 2.8 και 2.05 ppm. Βάσει της ανάθεσης που έχει γίνει αυτό είναι λογικό διότι τα πρωτόνια των διπλών δεσμών είναι δίπλα στα  $\text{-HC=CHCH}_2\text{HC=CH-}$  των PUFA και στα  $\text{-HC=CHCH}_2\text{-}$ . Το σήμα C αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ  $\text{-COCH}_2\text{-}$  και  $\text{-COCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ . Τα  $\text{-CH}_3$  των  $\omega$ -3 απορροφούν σε ελαφρώς υψηλότερες τιμές ppm από τα υπόλοιπα  $\text{-CH}_3$  καθώς ο διπλός δεσμός μεταξύ τρίτου-τέταρτου άνθρακα αν και σχετικά μακριά, τα αποπροστατεύει. Στα  $\omega$ -3, τα πρωτόνια μεταξύ διπλού δεσμού και των  $\text{-CH}_3$  αποπροστατεύονται εντονότερα και για αυτό απορροφούν στα 2.1 ppm βάσει σήματος COSY D, ενώ τα πρωτόνια δίπλα στα υπόλοιπα  $\text{-CH}_3$  εμφανίζονται στα 1.25 ppm, όπως φαίνεται και από το σήμα E.



Εικόνα 34: Φάσμα HSQC λιπιδικού εκχυλίσματος control κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*.

Το 2-D HSQC (εικόνα 33) δίνει πληροφορίες για τον τύπο του άνθρακα που είναι συνδεδεμένος με το κάθε πρωτόνιο. Βάσει χημικής μετατόπισης του άνθρακα συμπεραίνεται το χημικό του περιβάλλον και ανάλογα αν το σήμα είναι πράσινο ή μπλε, τότε ο άνθρακας αυτός είναι ενωμένος με 2 ή με 1 ή 3 πρωτόνια αντίστοιχα ( $\text{CH}_2$  /  $\text{CH}$  /  $\text{CH}_3$ ).

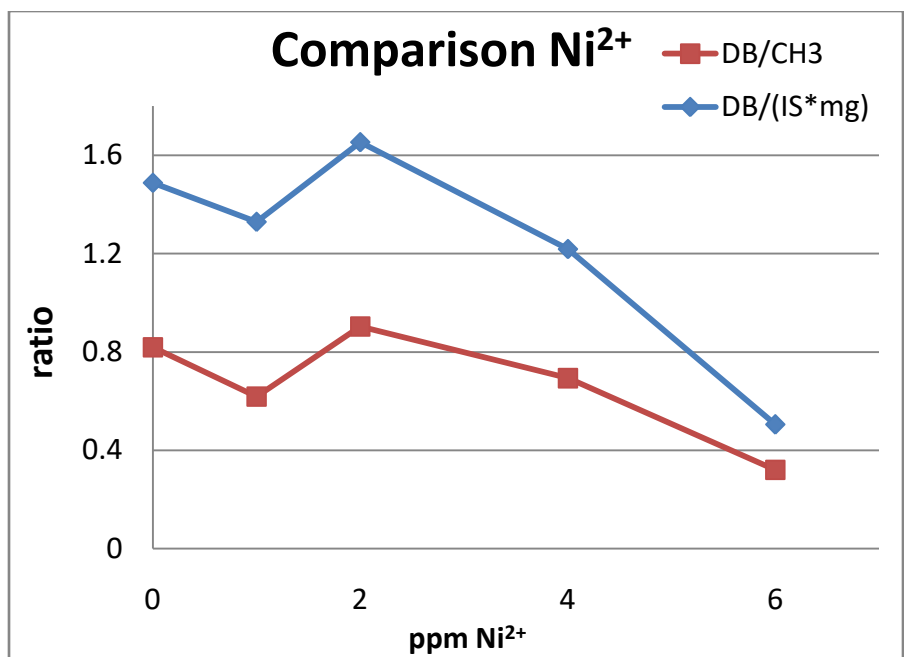
Πίνακας 6: Συσχέτιση βασικών κορυφών  $^1\text{H}$  με κορυφές  $^{13}\text{C}$ .

Θέση πρωτονίων	Περιοχή απορ. (ppm)	HSQC- $^{13}\text{C}$ (ppm)
-HC=CH-	5.35	129
-HC=CHCH <sub>2</sub> HC=CH-	2.8	26
-COCH <sub>2</sub> -	2.3	34
-HC=CHCH <sub>2</sub> -	2.05	27
-COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	1.6	25
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	1.25	23/30/32/37
-CH <sub>3</sub> ω-3	0.97	15
-CH <sub>3</sub>	0.86	15/20/23

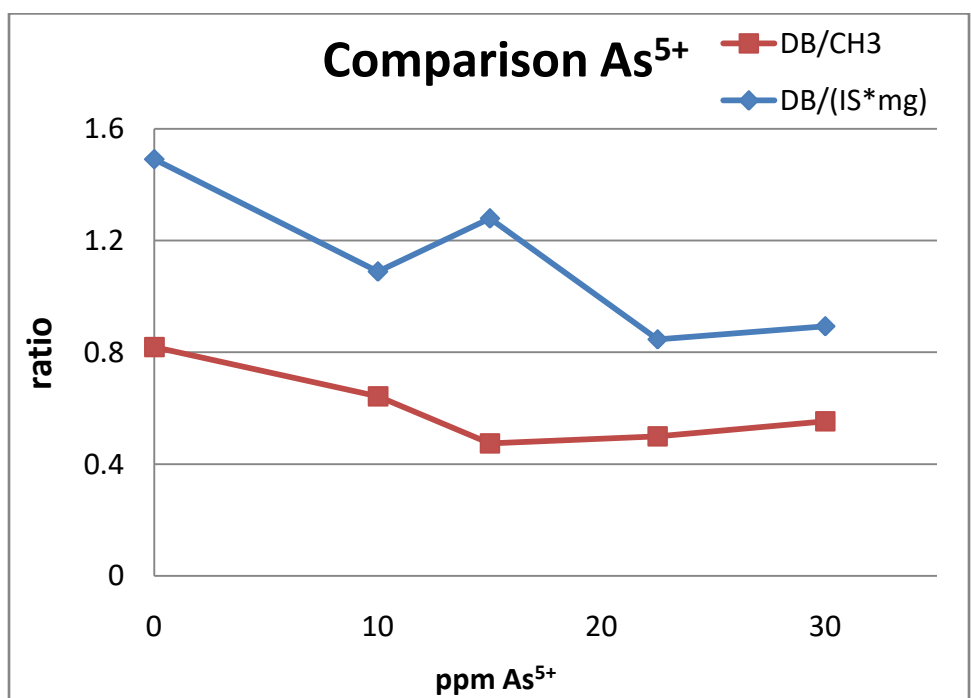
Στον διαλύτη έχει προστεθεί γνωστή ποσότητα τερεφθαλικού διμεθυλεστερά, DMT, ένα αδρανές μόριο που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία NMR για ποσοτική ανάλυση. Έχει 4 ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια που εμφανίζονται στα 8.1 ppm και 6 μεθυλενικά πρωτόνια που απορροφούν στα 3.95 ppm. Η ολοκλήρωση γίνεται στη κορυφή στα 8.1 ppm καθώς σε εκείνο το εύρος δεν απορροφούν πρωτόνια του δείγματος. Κάθε δείγμα που είναι έτοιμο προς ανάλυση, περιέχει ίση ποσότητα πρότυπης ένωσης αλλά όχι ίση μάζα εκχυλίσματος. Επομένως, κανονικοποιώντας τη μάζα κάθε δείγματος, ο λόγος της ολοκλήρωσης της βινυλικής κορυφής έναντι της πρότυπης κορυφής είναι ενδεικτικός της ακορεστότητας του δείγματος ανά μονάδα μάζας.

Για τον υπολογισμό της ακορεστότητας βάσει ολοκληρώσεων χωρίς τη χρήση προτύπου, μπορεί να αξιοποιηθούν οι κορυφές των συνολικών μεθυλενικών πρωτονίων (δηλαδή αθροίζοντας τα -CH<sub>3</sub> των ω-3 με τα υπόλοιπα -CH<sub>3</sub>). Δεν χρησιμοποιήθηκε η κορυφή των αCH<sub>2</sub> όπως είχε γίνει στα αποτελέσματα των πειραμάτων με *HR-MAS* καθώς σε εκείνη την περιοχή φάνηκε να υπάρχει επιπλέον απορρόφηση από άλλα πρωτόνια.

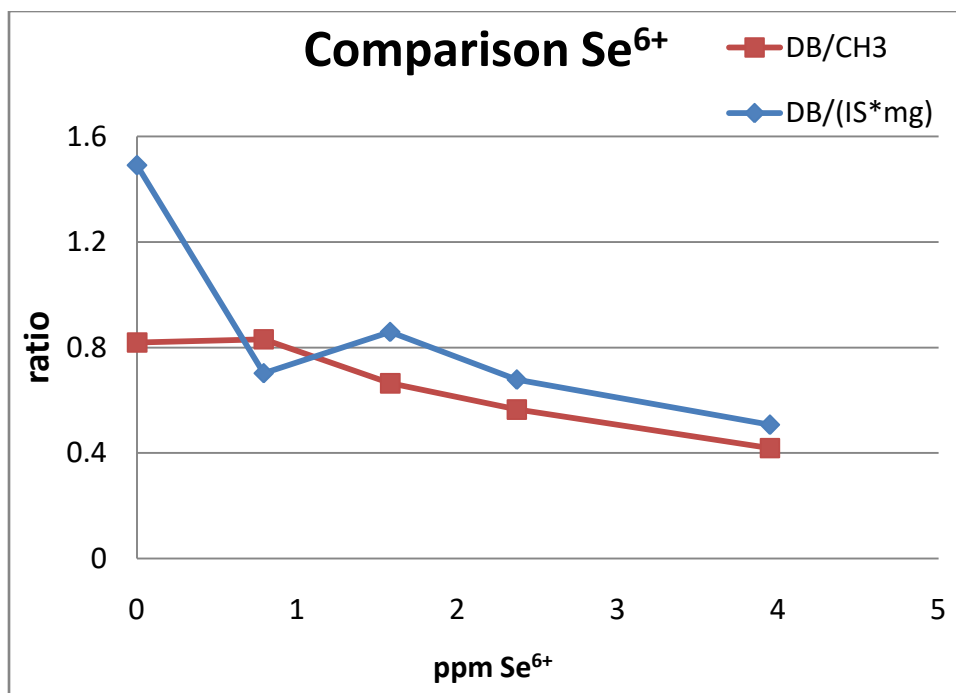
Παρακάτω δίνονται σε διάγραμμα οι λόγοι DB/CH<sub>3</sub> και DB/(IS\*mg) μαζί ώστε να συγκριθούν οι δύο τρόποι και να εξαχθεί συμπέρασμα για κάθε δείγμα.



Εικόνα 35: Συγκριτικό διάγραμμα των δύο μεθόδων υπολογισμού της ακορεστότητας για τα control *Chlamydomonas reinhardtii* και των καλλιεργημένων παρουσία Ni<sup>2+</sup>.



Εικόνα 36: Συγκριτικό διάγραμμα των δύο μεθόδων υπολογισμού της ακορεστότητας για τα control *Chlamydomonas reinhardtii* και των καλλιεργημένων παρουσία As<sup>5+</sup>.



Εικόνα 37: Συγκριτικό διάγραμμα των δύο μεθόδων υπολογισμού της ακορεστότητας για τα control *Chlamydomonas reinhardtii* και των καλλιεργημένων παρουσία  $Se^{6+}$ .

Τα αποτελέσματα δείχνουν την τάση του λιπιδικού προφίλ των κυττάρων να γίνεται πιο κορεσμένο με την αύξηση της συγκέντρωσης των  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  στο θρεπτικό διάλυμα. Οι δύο μέθοδοι υπολογισμού της ακορεστότητας σε γενικές γραμμές έχουν συμφωνία μεταξύ τους. Για τον υπολογισμό ακορεστότητας βάσει πρότυπης ένωσης, το κύριο σφάλμα οφείλεται στην ελάχιστη ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε, με αποτέλεσμα η ζύγιση να έχει σημαντικό σφάλμα λόγω του ζυγού ή μη ολοκληρωμένης ξήρανσης. Στον υπολογισμό βάσει ολοκληρώσεων χωρίς πρότυπο, το κύριο σφάλμα είναι η ύπαρξη επιμολύνσεων ή άλλων συστατικών που απορροφούν στις ίδιες περιοχές που εξετάζονται.

Η εκχύλιση ήταν αποτελεσματική και σχετικά γρήγορη αλλά δεν είναι δυνατόν να απομονώσει πλήρως μόνο τα λιπαρά. Άλλωστε φαίνεται και από το χρώμα του δείγματος ότι έχουν εκχυλιστεί και οι χρωστικές του κυττάρου, το οποίο είναι αναμενόμενο λόγω πολικότητας αυτών των ενώσεων.

Πιθανότατα, ο υπολογισμός βάσει πρότυπης ένωσης να είναι προτιμότερος όταν το δείγμα έχει αρκετή μάζα και δεν είναι απόλυτα καθαρό. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία και ακριβέστερη ποσοτικοποίηση αυτού του βιολογικού φαινομένου, η καλλιέργεια

των κυττάρων σε κάθε συνθήκη θα πρέπει να γίνει 3 φορές, ώστε τα διαγράμματα να περιλαμβάνουν σφάλματα για κάθε συνθήκη.

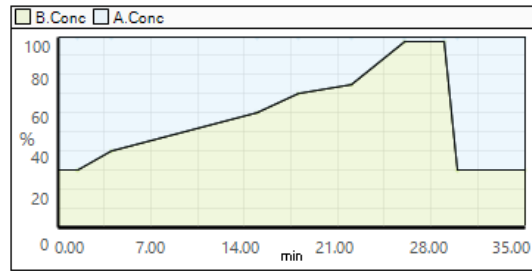
### 3.5 Ανάλυση λιπιδικού εκχυλίσματος κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* με υψηλής απόδοσης χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με φασματομετρία μάζας παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (RP-HPLC-MRM)

Τα λιπιδικά εκχυλίσματα μετά την ανάλυση NMR, αναλύονται με HPLC-MS/MS με MRM. Με αυτό τον τρόπο αναλύεται περαιτέρω η σύσταση του εκχυλίσματος και μπορούν να ληφθούν ποσοτικές πληροφορίες για κάθε λιπίδιο που υπάρχει στη λίστα των MRM (παράρτημα). Για κάθε λιπίδιο υπάρχουν δύο τιμές  $m/z$  που περνούν από  $Q_1$  και  $Q_3$  αντίστοιχα, η πρώτη είναι η μορφή  $[M+NH_4]^+$  και η δεύτερη είναι ένα χαρακτηριστικό θραύσμα (προϊόν ιόν). Το κατιόν  $NH_4^+$  προκύπτει από το φορμικό αμμώνιο, που έχει προστεθεί στη κινητή φάση. Σε σύγκριση με το EASI-MS, η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα του πειράματος είναι υψηλότερη, καθώς λόγω χρωματογραφίας τα μόρια διαχωρίζονται και ο ανιχνευτής λειτουργεί σε MRM mode και όχι σε full scan. Βέβαια η συνολική διαδικασία είναι πιο χρονοβόρα σε σχέση με του EASI-MS.

Τα λιπίδια διαχωρίζονται με άπολη στήλη  $C_{18}$ . Παρατηρείται ότι για λιπίδια ίδιας κατηγορίας και μεγέθους, ο χρόνος έκλουσης μικραίνει σημαντικά με την αύξηση των διπλών δεσμών. Οι αλειφατικές αλυσίδες που περιέχουν διπλούς δεσμούς έχουν κεκαμένη γεωμετρία και έρχονται σε μικρότερη επαφή με την αλειφατική στατική φάση  $C_{18}$ , από ότι οι κορεσμένες γραμμικές αλυσίδες, επομένως αλληλεπιδρούν λιγότερο άρα ο χρόνος κατακράτησης είναι μικρότερος.

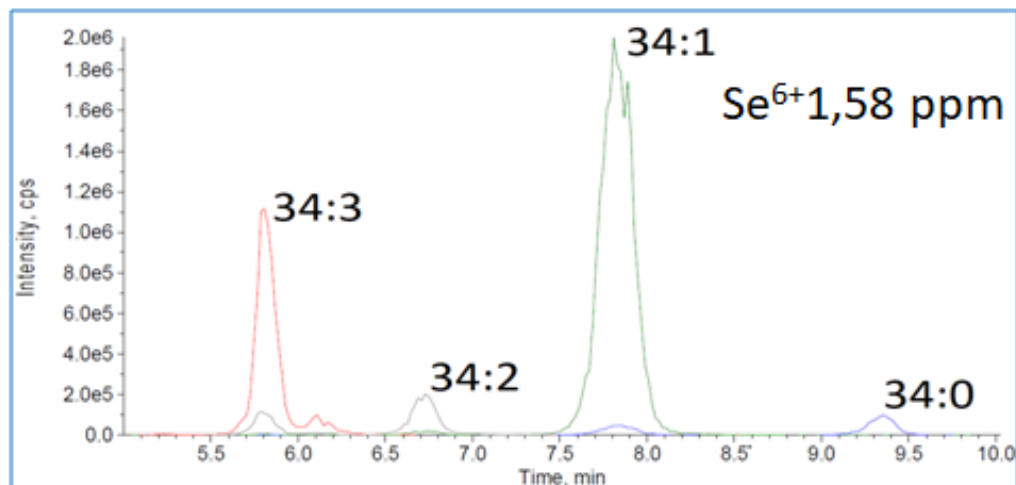
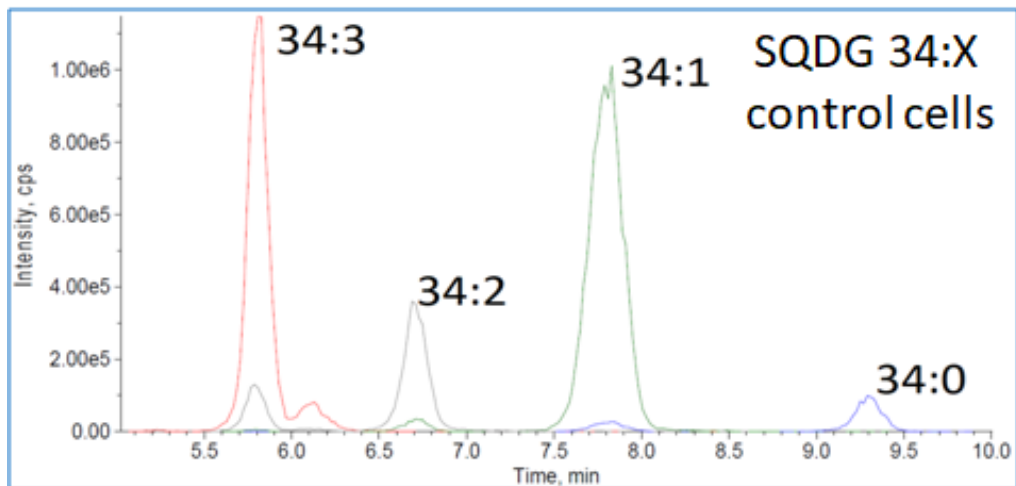
Η βαθμιδωτή έκλυση των λιπιδίων έγινε με την ανάμειξη 2 διαλυτών, Α και Β. Ο διαλύτης Α αποτελείται από ACN:H<sub>2</sub>O 60:40 και ο διαλύτης Β από IPA:ACN 90:10. Και οι δύο περιέχουν φορμικό αμμώνιο σε συγκέντρωση 10 mM.





Εικόνα 38: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κινητής φάσης σε A, B έναντι χρόνου. Στα τελευταία λεπτά η σύσταση της κινητής φάσης επανέρχεται στην αρχική ώστε η στήλη να εξισορροπηθεί.

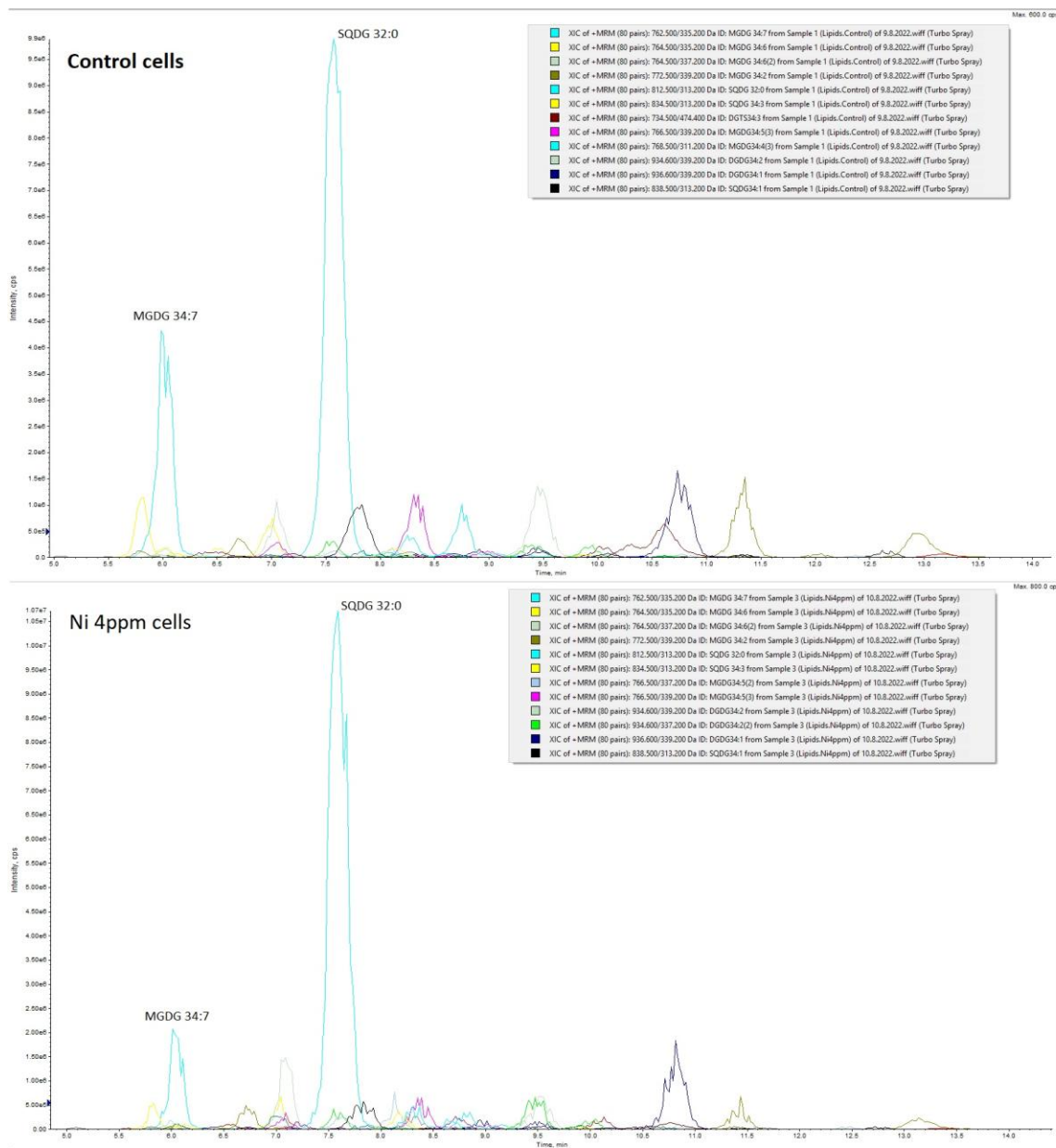
Η κινητή φάση με τη πάροδο του χρόνου γίνεται λιγότερο πολική αυξάνοντας την περιεκτικότητά της σε διαλύτη B, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η εκλουστική ισχύς. Η ροή της κινητής φάσης ορίστηκε στα 0,26 mL/min, ο όγκος δείγματος που εισάγεται είναι 2  $\mu$ L, η θερμοκρασία του φούρνου, όπου βρίσκεται η στήλη, ρυθμίζεται στους 45°C και η καταγραφή διαρκεί 35 min.



*Εικόνα 39: Χρωματογραφικές κορυφές SQDG 34:X control κυττάρων (πάνω) και με  $Se^{6+}$  1,58 ppm (κάτω). Παρατηρείται αυξημένος χρόνος κατακράτησης για τα λιγότερο ακόρεστα μόρια. Οι σχετικές εντάσεις των λιπιδίων επηρεάζονται παρουσία  $Se^{6+}$ .*

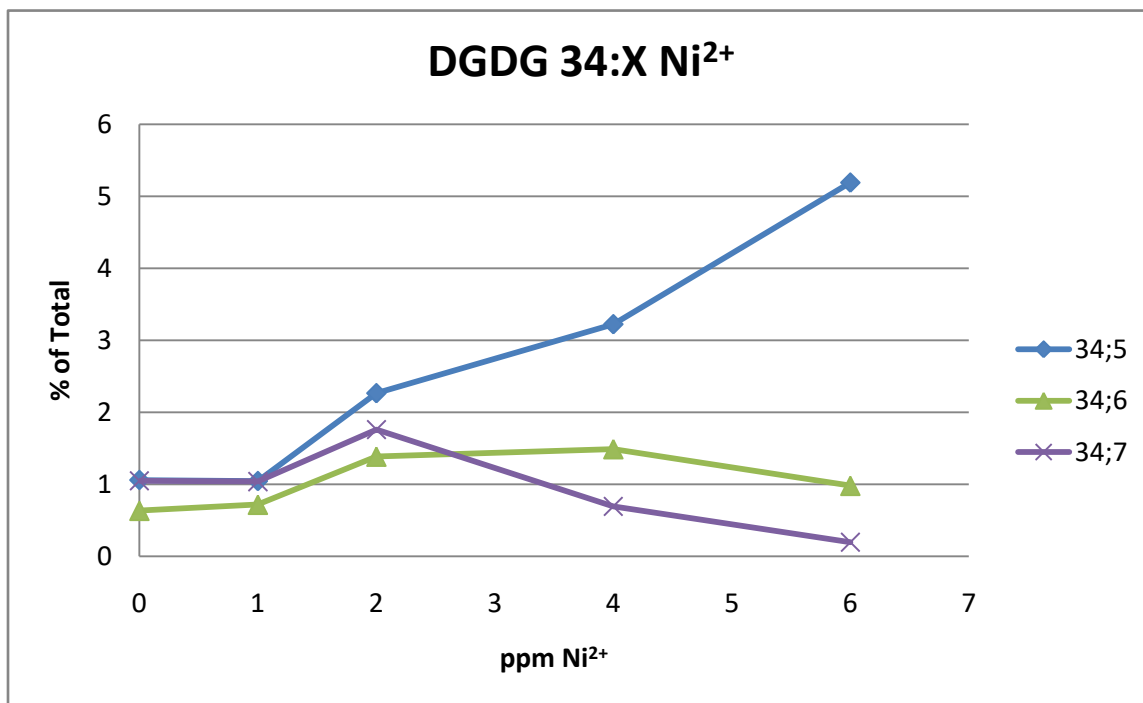
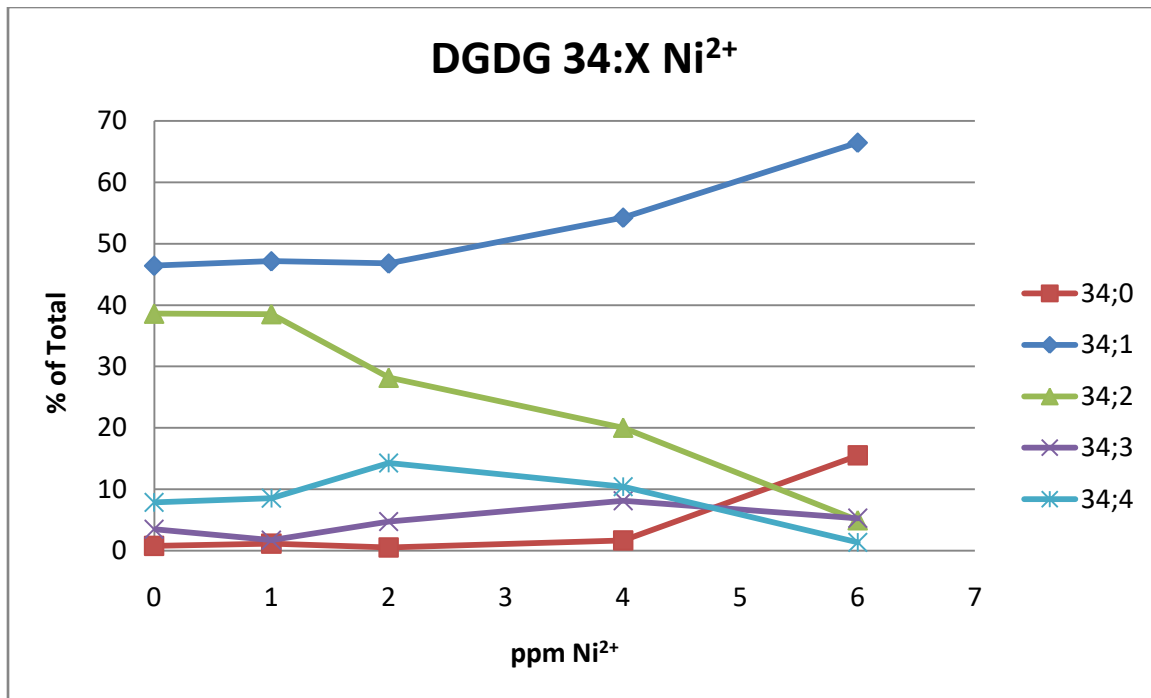
Αρκετές κορυφές φαίνεται να αποτελούνται από δύο λιπίδια που έχουν διαφορά έναν διπλό δεσμό, όπως συμβαίνει και στο παραπάνω επιλεγμένο τμήμα του χρωματογραφήματος (εικόνα 39) όπου όλες οι κορυφές, με εξαίρεση του SQDG 34:0, εμφανίζουν δεύτερη κορυφή διαφορετικού χρώματος κάτω από την κύρια. Το λιπίδιο που έχει έναν επιπλέον διπλό δεσμό, έχει 2 Da λιγότερο από το αντίστοιχο που έχει κορεσμένο δεσμό. Στατιστικά λόγω ισοτόπων, κάθε μόριο, ειδικά τα μεγάλα, εμφανίζουν κορυφή με  $m/z$  M+2, διότι κάποια τυχαίνει να περιέχουν 2  $^{13}C$ . Επίσης, επειδή η δομή των δυο κοντινών λιπιδίων είναι σχεδόν ίδια, θα εμφανίζουν παρόμοια θραύσματα, επομένως παρόλο που το φασματόμετρο ξεχωρίζει τα μόρια με MRM και είναι εκλεκτικό, στη συγκεκριμένη ιδιαίτερη περίπτωση το λογισμικό εκλαμβάνει την κορυφή M+2 σαν το λιπίδιο που περιέχει έναν διπλό δεσμό λιγότερο. Επίσης, το τετράπολο δεν είναι διαχωριστής μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Οι μεγαλύτερες κορυφές λιπιδίων στα χρωματογραφήματα (εικόνα 40) αντιστοιχούν στο SQDG 32:0 (16:0/16:0) και στο MGDG 34:7 (18:3/16:4) με χρόνο κατακράτησης 7.5 min και 6 min, αντίστοιχα. Με την αύξηση των συγκεντρώσεων των  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  παρατηρήθηκε η αύξηση της σχετική έντασης του κορεσμένου SQDG 32:0 έναντι του πολυακόρεστου MGDG 34:7. Η συγκεκριμένη παρατήρηση πιθανότατα να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία NMR, όπου συνολικά, το εκχύλισμα γινόταν συστηματικά πιο κορεσμένο με την αύξηση των συγκεντρώσεων των  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$ .

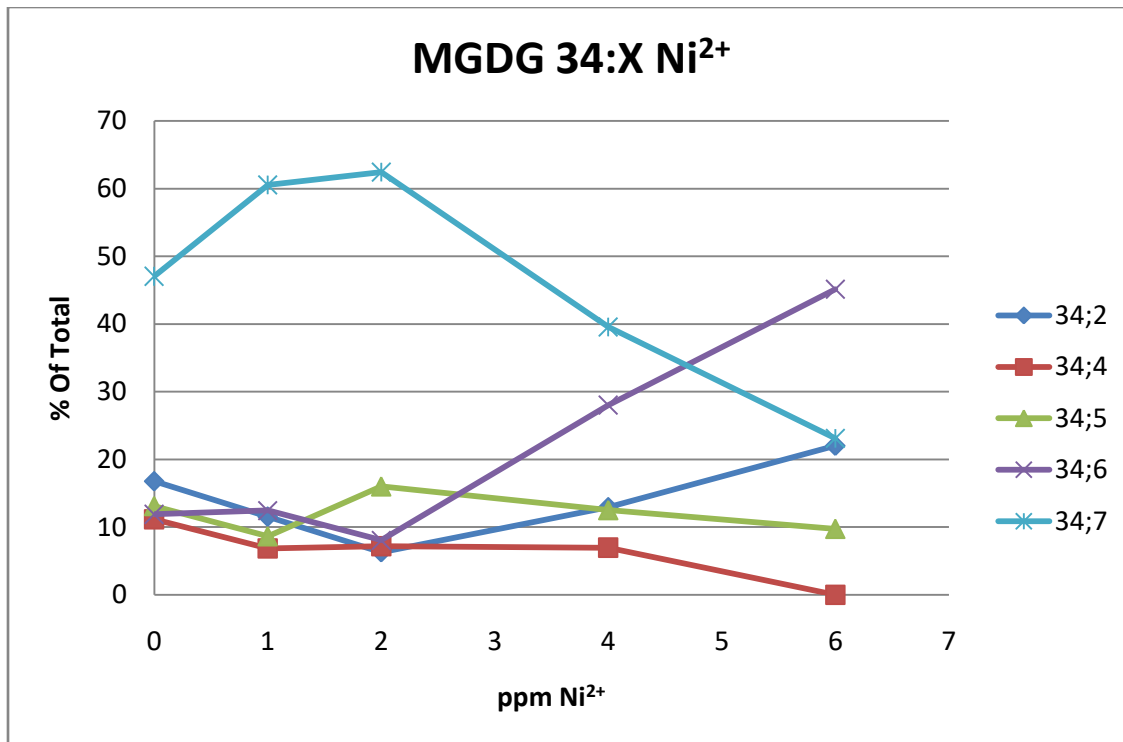


Εικόνα 40: HPLC χρωματογραφήματα λιπιδικού εκχυλίσματος *Chlamydomonas reinhardtii* με μεγένθυση στον άξονα Χ (Χρόνος Κατακράτησης) στην περιοχή ενδιαφέροντος για Control και κύτταρα καλλιεργημένα με 4 ppm  $Ni^{2+}$ .

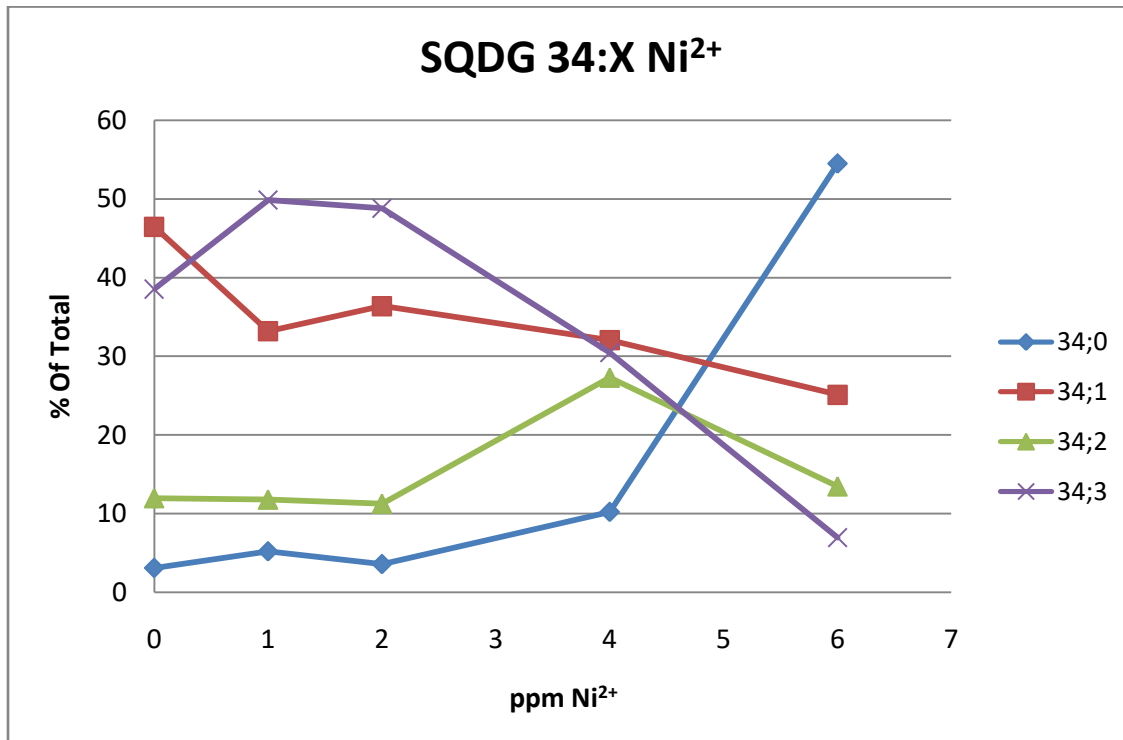
Τα λιπίδια που εμφανίζουν σημαντικές εντάσεις, ανήκουν στην ίδια κατηγορία και διαφέρουν μόνο στον αριθμό διπλών δεσμών επιλέγονται και οπτικοποιούνται για λόγους ευκολίας μέσω του λογισμικού, όπως έγινε με τα SQDG 34:X (εικόνα 38). Για να μελετηθεί ημιοσοτικά το κάθε δείγμα, τα ύψη των κορυφών αθροίζονται και κάθε κορυφή κανονικοποιείται. Έτσι, προσεγγιστικά υπολογίζεται η περιεκτικότητα επί τοις 100 κάθε λιπιδίου για την κατηγορία του.



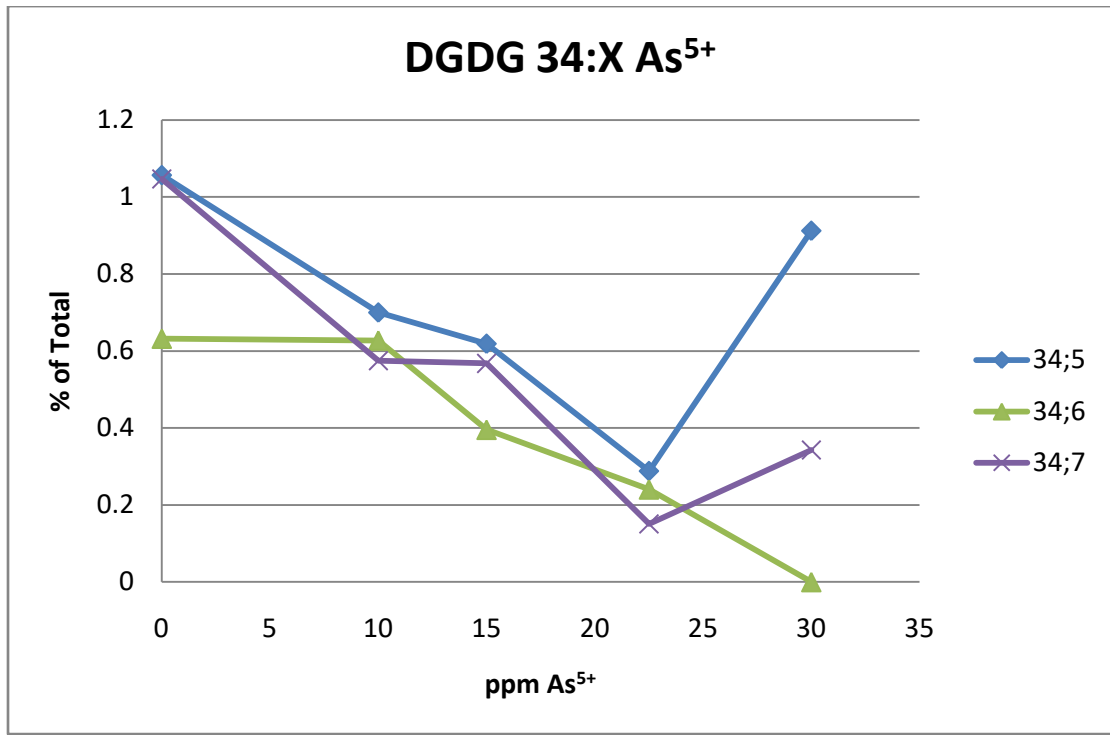
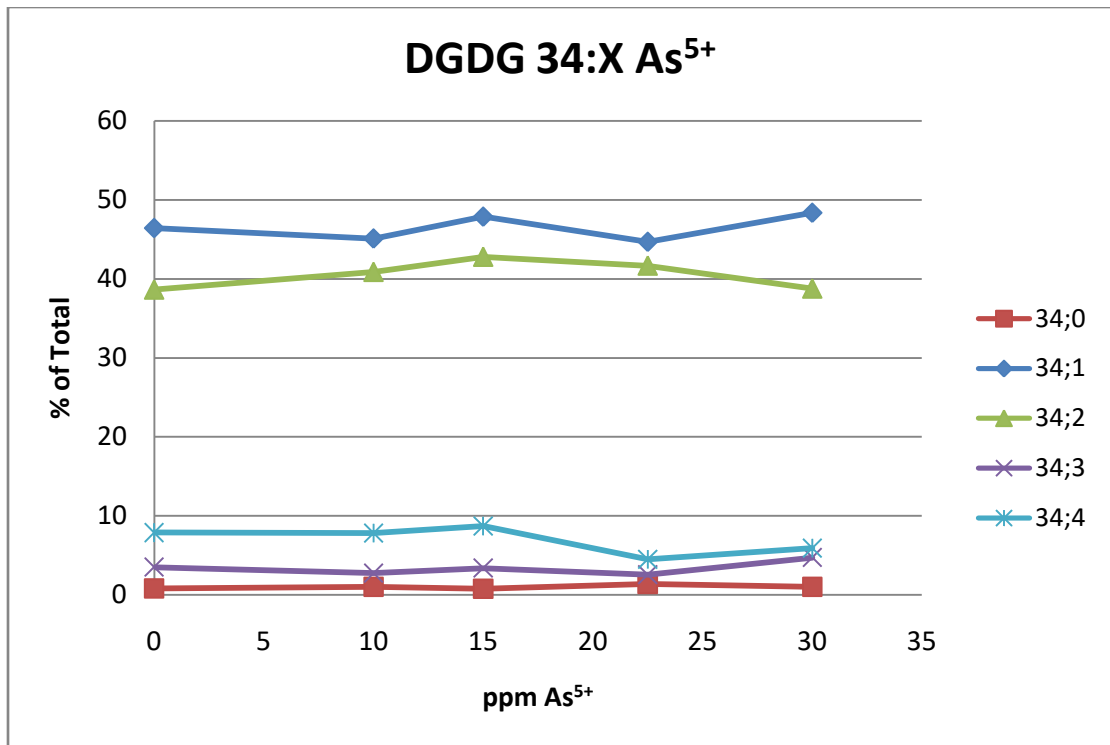
Εικόνα 41: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους DGDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) Ni<sup>2+</sup> και των control κυττάρων.



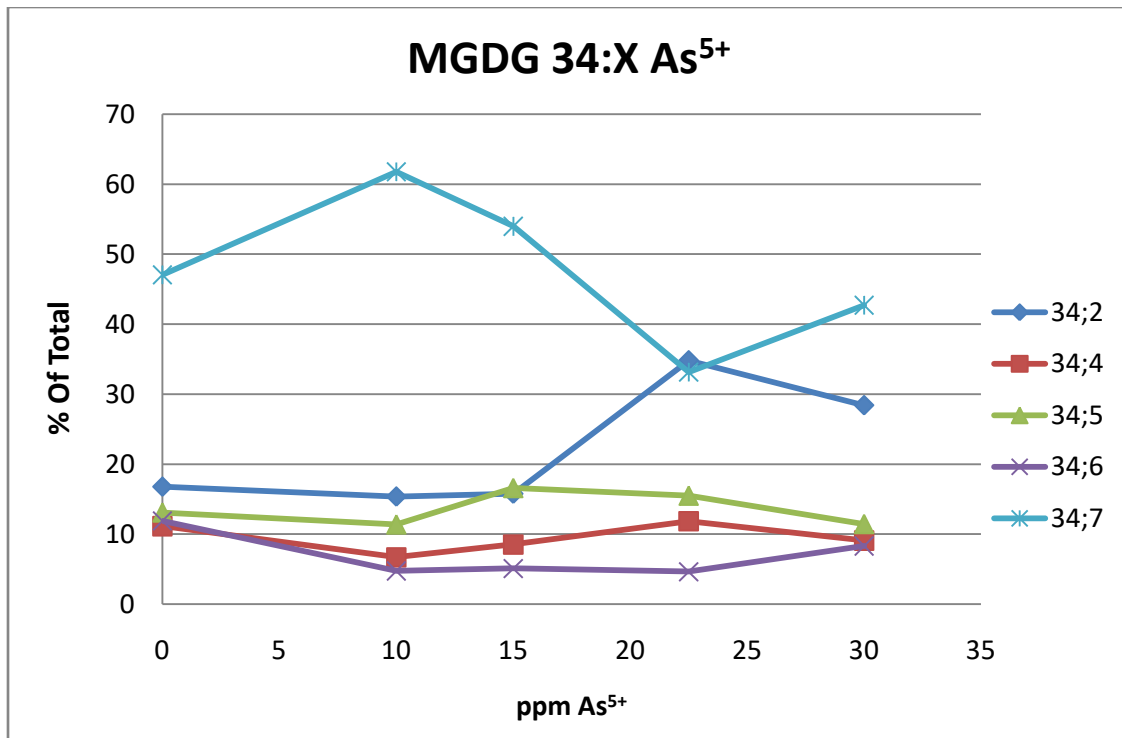
Εικόνα 41: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους MGDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) Ni<sup>2+</sup> και των control κυττάρων.



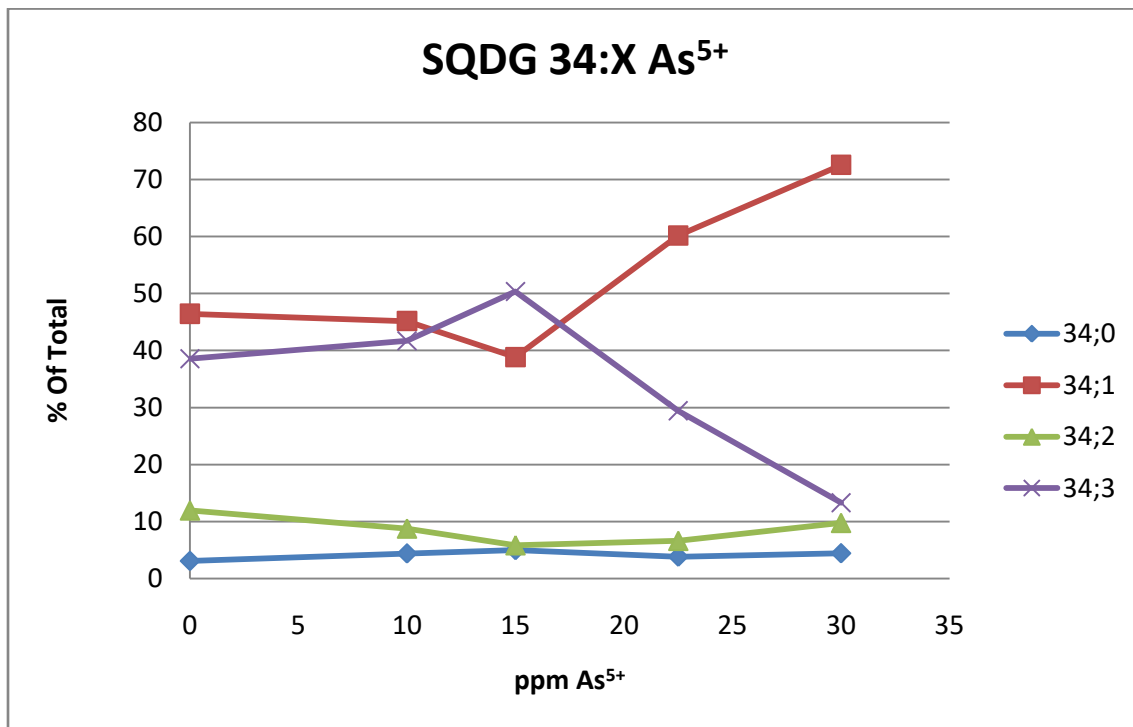
Εικόνα 42: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους SQDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) Ni<sup>2+</sup> και των control κυττάρων.



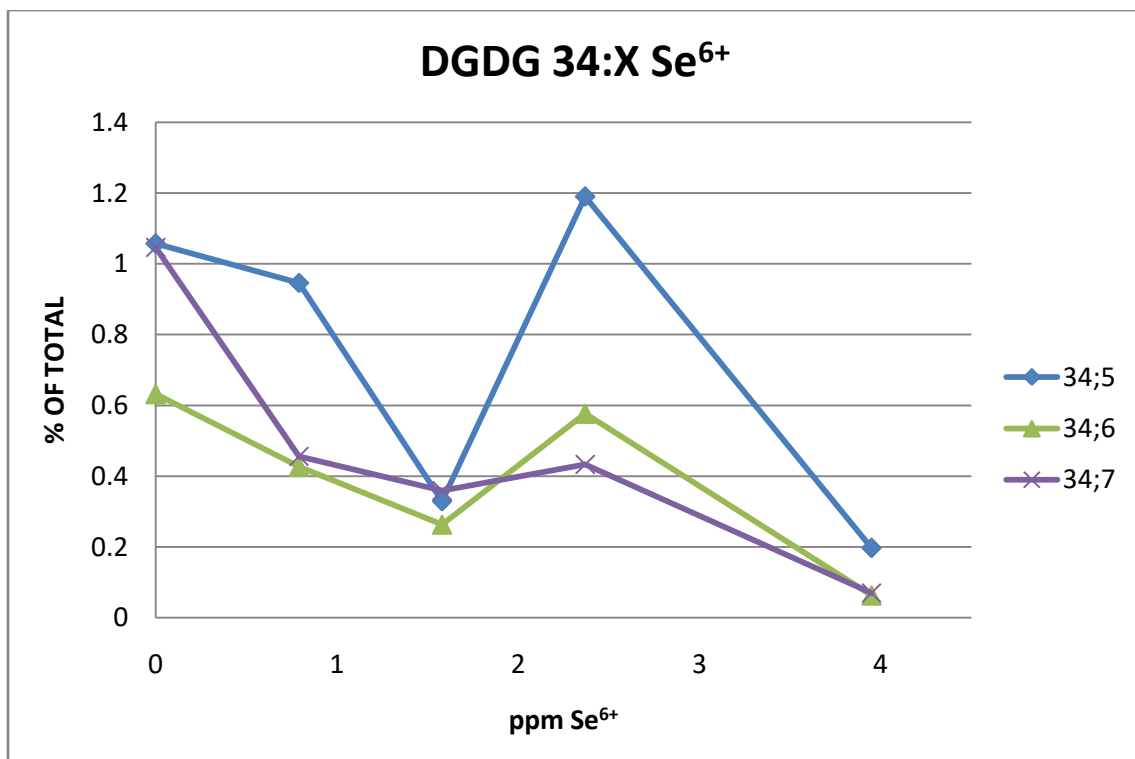
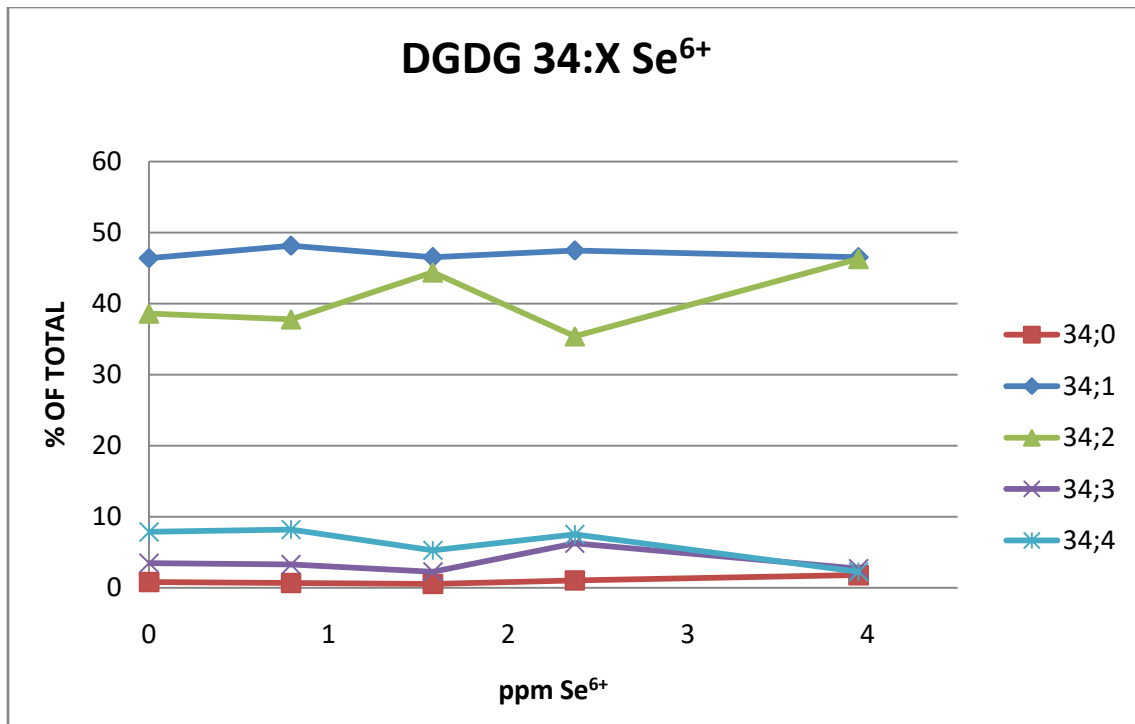
Εικόνα 43: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους DGDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) As<sup>5+</sup> και των control κυττάρων.



Εικόνα 44: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους MGDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) As<sup>5+</sup> και των control κυττάρων.

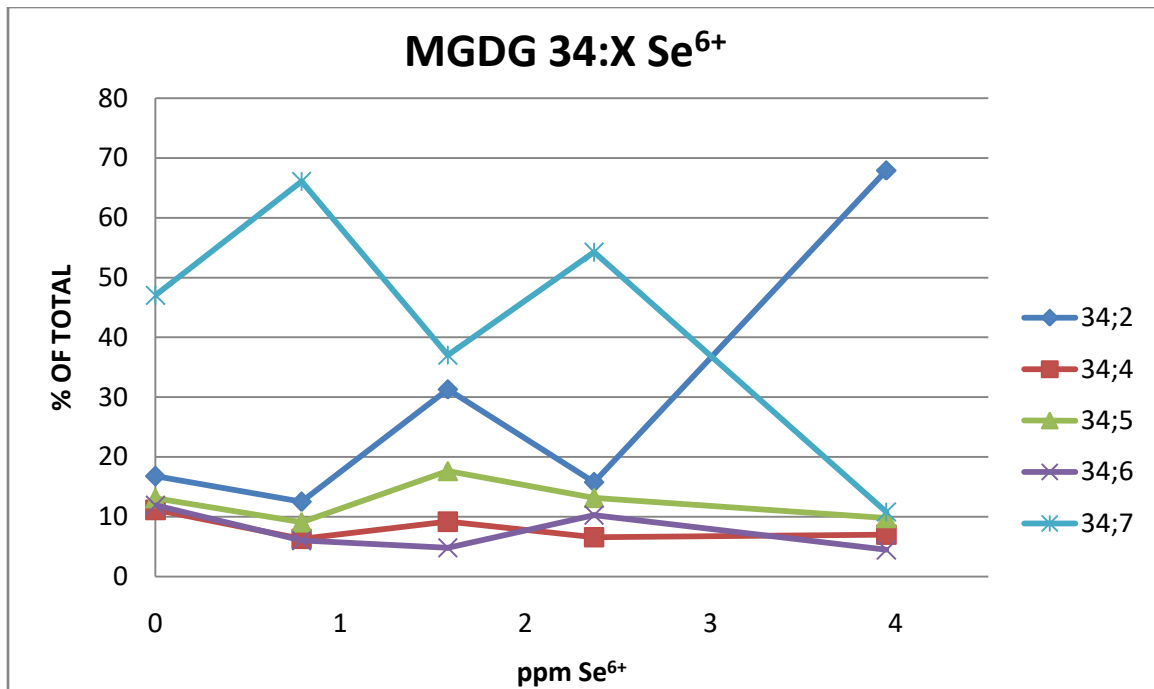


Εικόνα 45: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους SQDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) As<sup>5+</sup> και των control κυττάρων.

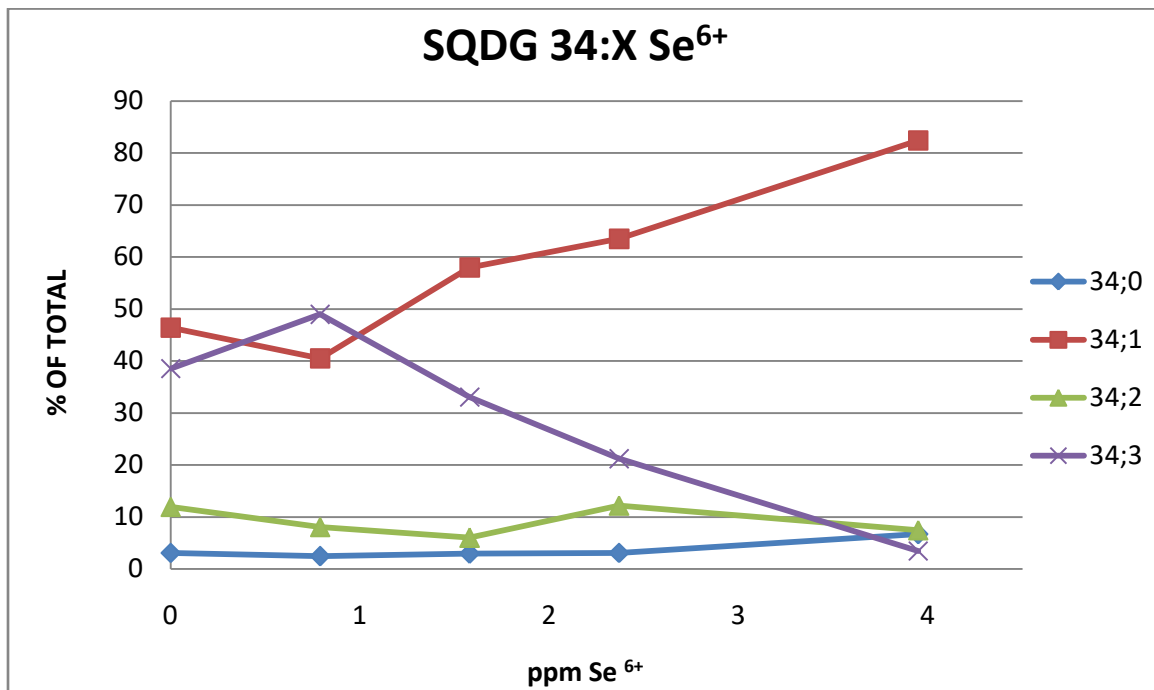


Εικόνα 46: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους DGDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) Se<sup>6+</sup> και των control κυττάρων.





Εικόνα 47: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους MGDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) Se<sup>6+</sup> και των control κυττάρων.



Εικόνα 48: Ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε είδους SQDG 34:X συναρτήσει της συγκέντρωσης της καλλιέργειας (ppm) Se<sup>6+</sup> και των control κυττάρων.

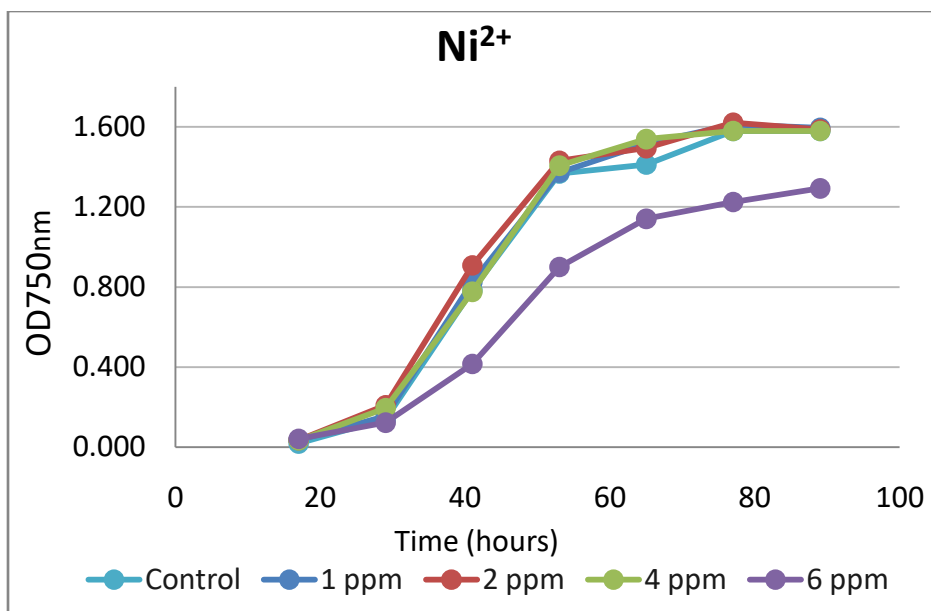
Είναι φανερό πως η επώαση με  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στις διάφορες κατηγορίες λιπιδίων όπως εξετάστηκε. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να βελτιωθούν κάνοντας την ποσοτικοποίηση βάσει προτύπων και επαναλαμβάνοντας όλη τη διαδικασία 3 φορές. Ο διαχωρισμός των ενώσεων μέσω της χρωματογραφίας είναι ικανοποιητικός. Επίσης, φαίνεται η επιτυχία της διαδικασίας της εκχύλισης στη σχετική απομόνωση των μεμβρανικών λιπαρών.

### 3.6 Εκτίμηση της ανάπτυξης κυττάρων *Chlorella sorokiniana* παρουσία $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{As}^{5+}$ , $\text{Se}^{6+}$

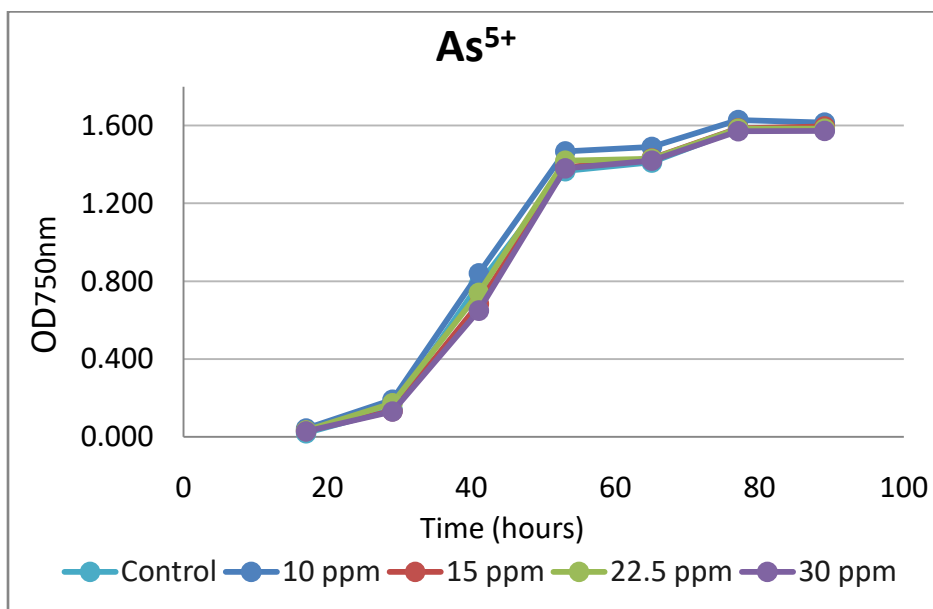
Τα κύτταρα *Chlorella sorokiniana* καλλιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα *Chlamydomonas reinhardtii* με σκοπό τη σύγκριση των δύο οργανισμών όσον αφορά την επίδραση των  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  στην ακορεστότητα των λιπιδίων τους.

Η ανάπτυξη των *Chlorella sorokiniana* ήταν ταχύτερη καθώς έφθανε σε πλατό απορρόφησης σε περίπου 80 ώρες ( $\approx 3$  ημέρες) σε σύγκριση με τα *Chlamydomonas reinhardtii* που χρειάζονταν περίπου 100 ώρες.

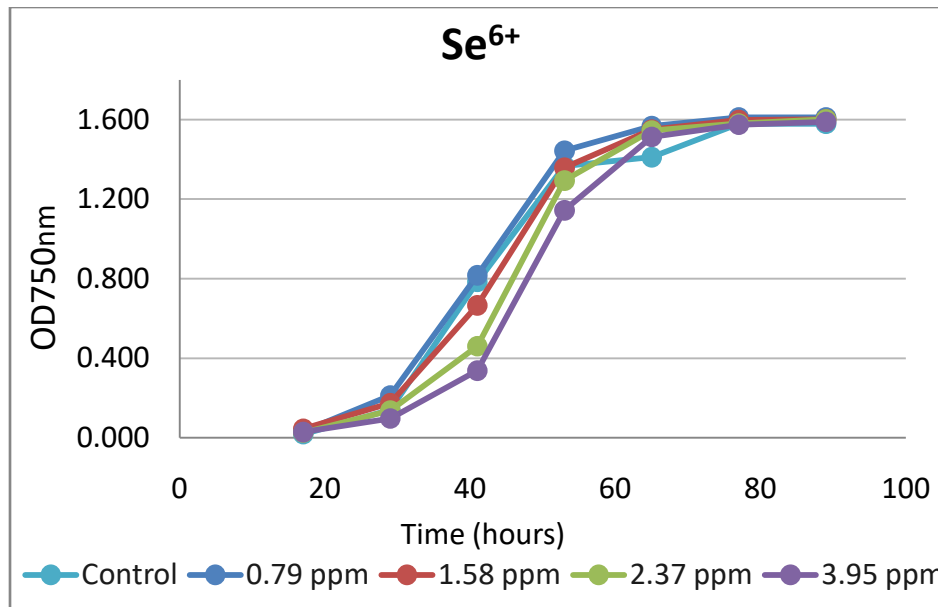
Σημαντική παρεμπόδιση της ανάπτυξης παρατηρήθηκε μόνο για τη συγκέντρωση των 6 ppm  $\text{Ni}^{2+}$ . Παρουσία  $\text{As}^{5+}$ , στις συγκεντρώσεις που σχεδιάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης, δεν παρατηρήθηκε κάποια μετρήσιμη μεταβολή. Τέλος, η αυξανόμενη συγκέντρωση  $\text{Se}^{6+}$  προκάλεσε αυξανόμενη χρονική καθυστέρηση (lag time) στην ανάπτυξη αλλά η τελική οπτική πυκνότητα στο πλατό της ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση ήταν ίδια με τις control συνθήκες.



Εικόνα 49: Καμπύλη ανάπτυξης *Chlorella sorokiniana* σε 1, 2, 4, 6 ppm Ni<sup>2+</sup> συγκριτικά με Control κύτταρα.

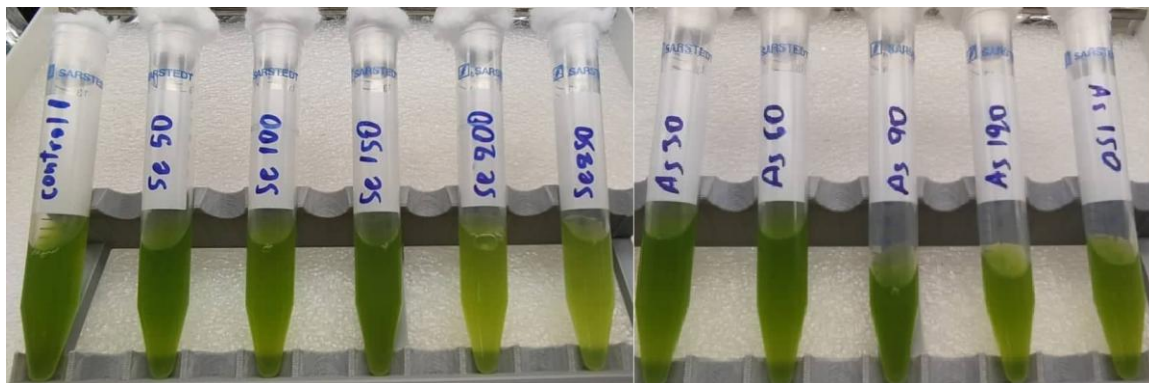


Εικόνα 50: Καμπύλη ανάπτυξης *Chlorella sorokiniana* σε 10, 15, 22.5, 30 ppm As<sup>5+</sup> συγκριτικά με Control κύτταρα.



Εικόνα 51: Καμπύλη ανάπτυξης *Chlorella sorokiniana* σε 0.79, 1.58, 2.37, 3.95 ppm  $Se^{6+}$  συγκριτικά με Control κύτταρα.

Εφόσον η ανάπτυξη της *Chlorella sorokiniana* στις συγκεντρώσεις  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  που μελετήθηκαν στο *Chlamydomonas reinhardtii* φάνηκε να μην είναι αρκετά υψηλές για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη τους, έγιναν νέες καλλιέργειες με σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις για την ποιοτική ανάλυση της ανάπτυξης τους.

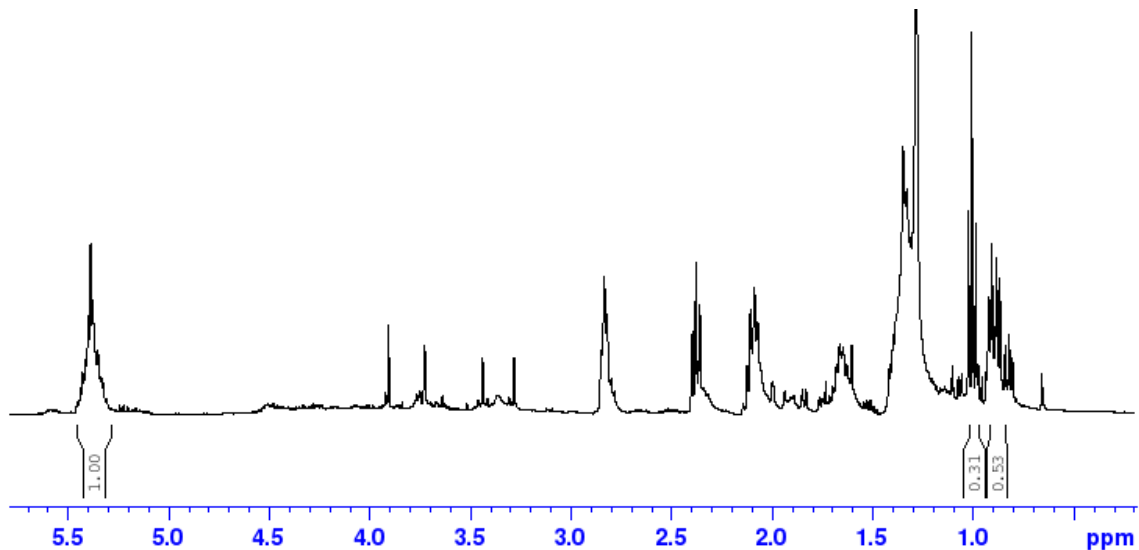


Εικόνα 52: Καλλιέργειες *Chlorella sorokiniana* με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 50, 100, 150, 200, 250  $\mu M$   $Se^{6+}$  (3.95, 7.90, 11.8, 15.8, 19.7 ppm  $Se^{6+}$ ) και 30, 60, 90, 120, 150 ppm  $As^{5+}$  από αριστερά προς τα δεξιά. Η παραγωγή βιομάζας στις υψηλότερες συγκεντρώσεις παρέμεινε ικανοποιητική.

Εν τέλει, για τις καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας των *Chlorella sorokiniana* πραγματοποιήθηκε μια περαιτέρω ανάπτυξη με τα στοιχεία  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  στη τριπλάσια συγκέντρωση από την υψηλότερη που είχαν αναπτυχθεί τα *Chlamydomonas reinhardtii* (30 ppm  $As^{5+}$  και 3.95 ppm  $Se^{6+}$ ), δηλαδή με 90 ppm  $As^{5+}$  και 11.8 ppm  $Se^{6+}$ .

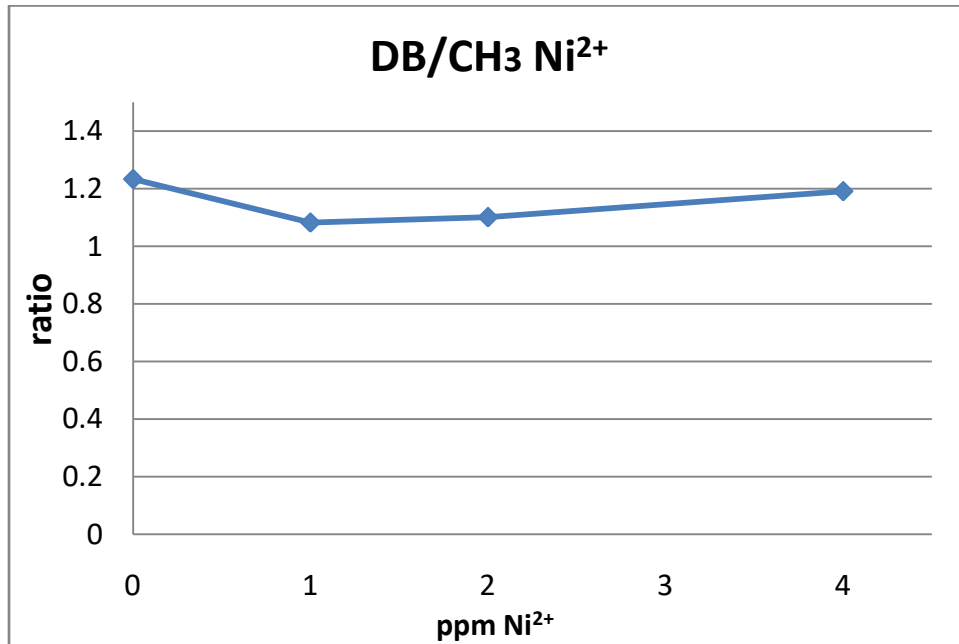
### 3.7 Προσδιορισμός ακορεστότητας εκχυλίσματος κυττάρων *Chlorella sorokiniana* με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Τα λιπίδια των κύτταρων *Chlorella sorokiniana* εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με NMR με τον ίδιο τρόπο με τα *Chlamydomonas reinhardtii*. Η μόνη διαφορά των 2 οργανισμών που παρατηρήθηκε στο πειραματικό μέρος ήταν η σχετική δυσκολία της επανααιώρησης της *Chlorella sorokiniana* με ανάδευση vortex έπειτα από τη φυγοκέντρωση. Πιθανότατα, λόγω του μικρότερου μεγέθους, τα κύτταρα σχηματίζουν σταθερότερο συσσωμάτωμα λόγω πυκνότερου πακεταρίσματος.

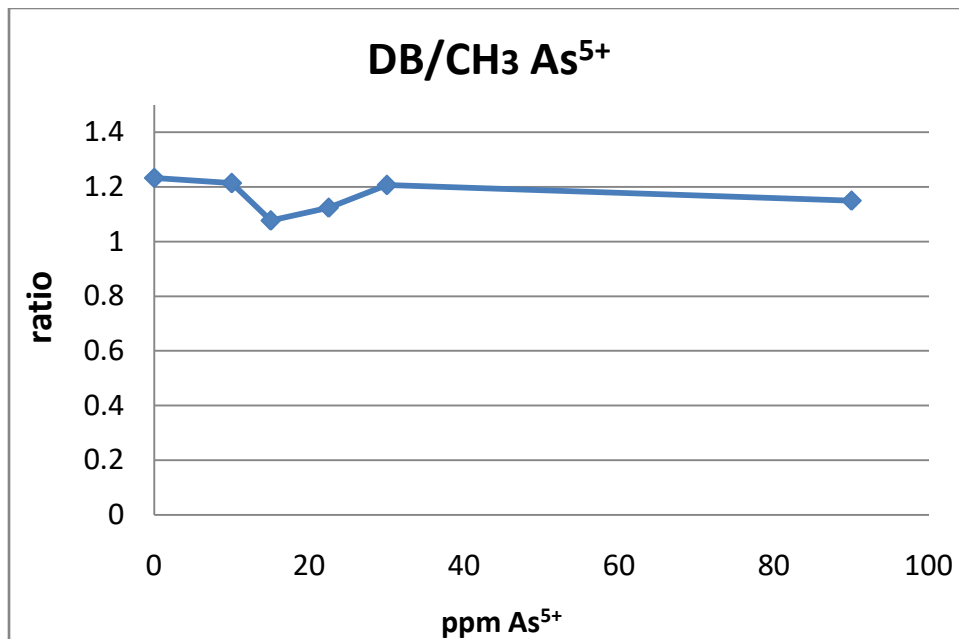


Εικόνα 52: Ενδεικτικό φάσμα  $^1H$  *Chlorella sorokiniana* επωασμένα σε 4 ppm  $Ni^{2+}$  με ολοκληρώσεις για υπολογισμό  $DB/CH_3$ .

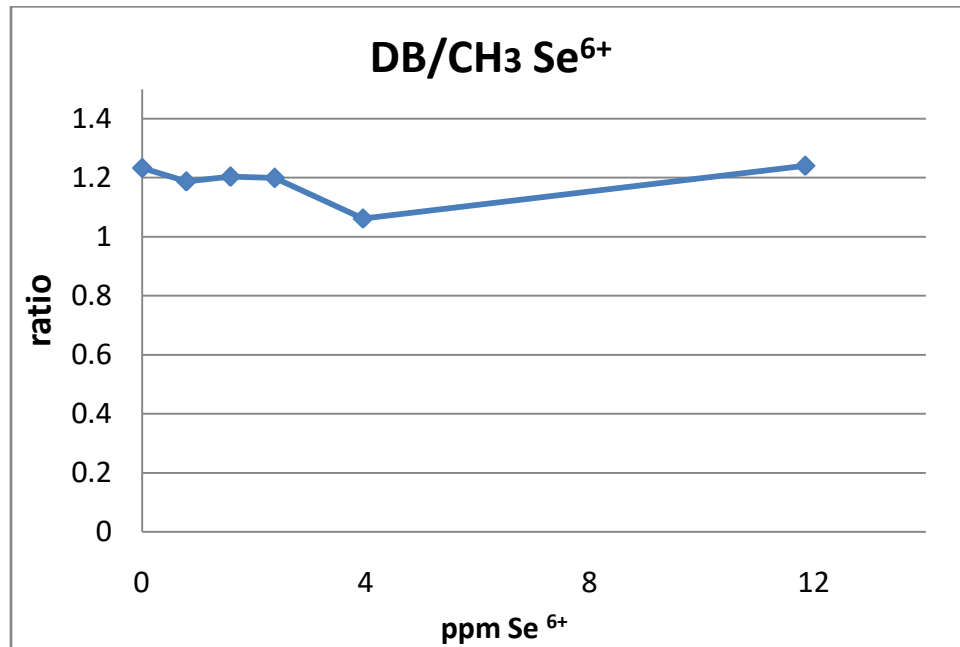
Τα φάσματα  $^1\text{H}$  που λήφθηκαν για κάθε καλλιέργεια έχουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους και για τον προσδιορισμό της ακορεστότητας των λιπιδίων υπολογίστηκε ο λόγος των ολοκληρώσεων των βινυλικών πρωτονίων έναντι των μεθυλενικών. Παρακάτω δίνονται σε διάγραμμα οι λόγοι  $\text{DB}/\text{CH}_3$  συναρτήσει της κάθε συνθήκης.



Εικόνα 54: Οι λόγοι  $\text{DB}/\text{CH}_3$  για κάθε συνθήκη καλλιέργειας με  $\text{Ni}^{2+}$  για το εκχύλισμα κυττάρων *Chlorella sorokiniana*.



Εικόνα 55: Οι λόγοι DB/CH<sub>3</sub> για κάθε συνθήκη καλλιέργειας με As<sup>5+</sup> για το εκχύλισμα κυττάρων *Chlorella sorokiniana*.



Εικόνα 56: Οι λόγοι DB/CH<sub>3</sub> για κάθε συνθήκη καλλιέργειας με Se<sup>6+</sup> για το εκχύλισμα κυττάρων *Chlorella sorokiniana*.

Η ακορεστότητα των λιπιδίων σε κάθε συνθήκη καλλιέργειας παραμένει πρακτικά ίδια ακόμη και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επίσης, φαίνεται πως το λιπιδικό προφίλ των κυττάρων *Chlorella sorokiniana* είναι πιο ακόρεστο από των *Chlamydomonas reinhardtii* καθώς οι λόγοι των ολοκληρώσεων DB/CH<sub>3</sub> είναι υψηλότεροι. Αυτό διαπιστώνεται και βιβλιογραφικά, καθώς σε εκείνες τις συνθήκες που καλλιεργήθηκαν, ο αριθμός ιωδίου για το βιοντίζελ που προκύπτει από τα λιπαρά των *Chlorella sorokiniana* και *Chlamydomonas reinhardtii* είναι  $\approx 90$  και  $\approx 65$  mg I<sub>2</sub>/100g, αντίστοιχα<sup>[49][50]</sup>.

## Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα – Μελλοντικοί στόχοι

### 4.1 Συμπεράσματα

- Η καλλιέργεια των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* με  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, έχει τοξική επίδραση στα κύτταρα μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξης τους και περιορίζοντας τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Σε αντίθεση, η *Chlorella sorokiniana* φάνηκε να είναι περισσότερο ανθεκτική στις υψηλές συγκεντρώσεις  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$ . Μάλιστα, στη περίπτωση που η επώαση γίνει παρουσία  $\text{As}^{5+}$  ή  $\text{Se}^{6+}$ , η παραγωγή βιομάζας είναι ικανοποιητική ακόμη και σε πενταπλάσιες μέγιστες συγκεντρώσεις από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Τα κύτταρα *Chlorella sorokiniana* αναπτύσσονται πιο γρήγορα από τα *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνθήκες εργαστηρίου σε TAP θρεπτικό διάλυμα, φθάνοντας στο πλατό ανάπτυξης σε  $\approx 80$  h έναντι  $\approx 100$  h.
- Από την ποσοτικοποίηση νικελίου σε χωνευμένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $\text{Ni}^{2+}$  με ICP-MS, παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της ποσότητας νικελίου ανά μονάδα μάζας λυοφιλιωμένων κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης, επομένως η βιοαπορρόφηση του νικελίου φαίνεται να αυξάνεται εκθετικά σε αυτές τις συνθήκες.
- Η τεχνική EASI-MS εφαρμόστηκε με επιτυχία για την απευθείας ανάλυση αρνητικά φορτισμένων μεμβρανικών λιπιδίων του *Chlamydomonas reinhardtii*. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκαν κυρίως αρνητικά φορτισμένα PG και SQDG, για τα οποία υπήρχε η σχετική μείωση των πολυακόρεστων λιπιδίων με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης με  $\text{Ni}^{2+}$ .



- Η τεχνική EASI-MS εμφάνισε παρόμοια φάσματα μάζας με τη συμβατική πηγή ESI του οργάνου για τα λιπίδια των *Chlamydomonas reinhardtii*. Κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής EASI είναι η ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, η ευελιξία που προσφέρει και ο διαχωρισμός φορτίων χωρίς τη χρήση δυναμικού υψηλής τάσης.
- Με τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR με την τεχνική HR-MAS σε κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* μπορεί να προσδιοριστεί ως ένα βαθμό η συνολική ακορεστότητα των λιπιδίων. Παρατηρήθηκε η σχετική μείωση της ολοκλήρωσης των βινυλικών πρωτονίων έναντι των πρωτονίων του α-άνθρακα των λιπαρών οξέων με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης  $\text{Ni}^{2+}$ .
- Με τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR υγρής φάσης σε εκχύλισμα λιπιδίων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* και *Chlorella sorokiniana*, μπορεί να προσδιοριστεί η ακορεστότητα των συνολικών λιπιδίων, σε αντίθεση με τις τεχνικές φασματομετρίας μάζας που παρέχουν πληροφορίες για κάθε λιπίδιο ξεχωριστά.
- Η λήψη φασμάτων μέσω HR-MAS συγκριτικά με τη λήψη φασμάτων υγρής φάσης, συμβατικού NMR, απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, δεν πραγματοποιείται πειραματική εκχύλιση των λιπιδίων, τα φάσματα όμως δεν έχουν υψηλή ευκρίνεια και υπάρχουν σημαντικές απορροφήσεις επιπλέον συστατικών εκτός από αυτές των λιπιδίων στις κορυφές που μελετώνται.
- Από τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR των λιπιδικών εκχυλισμάτων, υπολογίστηκε ο λόγος των ολοκληρώσεων των κορυφών των βινυλικών πρωτονίων έναντι των μεθυλενικών. Για τα *Chlamydomonas reinhardtii* παρατηρήθηκε η συνολική μείωση της ακορεστότητας των λιπιδίων με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης για  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$  και  $\text{Se}^{6+}$ . Τα κύτταρα *Chlorella sorokiniana* δεν φάνηκε να αποκτούν περισσότερο κορεσμένο λιπιδικό προφίλ στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.
- Η χρήση εσωτερικού προτύπου, DMT, για ποσοτικοποίηση της ακορεστότητας των λιπιδίων κρίνεται προτιμητέα όταν το εκχύλισμα περιέχει σημαντική

ποσότητα άλλων συστατικών που απορροφούν στις περιοχές που μελετώνται. Επίσης για ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων ζύγισης, το δείγμα πρέπει να έχει μάζα μεγαλύτερη από μερικά mg και να έχει ξηρανθεί αποτελεσματικά.

- Η μικροεκχύλιση λιπιδίων από τα άγλη βασισμένη στη μέθοδο των Folch et al. φάνηκε αποτελεσματική στη σχετική απομόνωση τους .
- Η μέθοδος RP-HPLC-MS/MS με MRM που χρησιμοποιήθηκε διαχώρησε ικανοποιητικά τα πολικά λιπίδια του εκχυλίσματος και έγινε ποιοτική και ημιποσοτική μελέτη σε λιπίδια των *Chlamydomonas reinhardtii*. Η σύσταση των πολικών λιπιδίων αλλάζει σημαντικά παρουσία  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  .
- Με την αύξηση της συγκέντρωσης επώασης των  $Ni^{2+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $Se^{6+}$  παρατηρείται μείωση της ακορεστότητας των λιπιδίων του *Chlamydomonas reinhardtii*. Εικάζεται πως αυτό συμβαίνει λόγω συσσώρευσης λιγότερο ακόρεστων λιπιδίων TAG και λόγω μείωσης της δράσης των δεσατουρασών.

## 4.2 Μελλοντικοί στόχοι

Η δράση των δεσατουρασών καθορίζει την ακορεστότητα των λιπιδίων. Πιθανότατα, με τη αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων, να επηρεάζεται-μειώνεται η βιοαπορρόφηση του σιδήρου από το θρεπτικό υλικό. Τα ένζυμα αυτά, εφόσον έχουν στο ενεργό κέντρο τους 2 άτομα σιδήρου, έχουν περιορισμένη δράση με μείωση του διαθέσιμου σιδήρου.

Επομένως, κατά την ποσοτικοποίηση των στοιχείων που περιέχονται στα κύτταρα που έχουν προστεθεί στο θρεπτικό υλικό (στην παρούσα εργασία  $Ni(II)$ ,  $As(V)$ ,  $Se(VI)$ ) με την τεχνική ICP-MS, ωφέλιμο θα είναι να προσδιορίζεται παράλληλα και η ποσότητα του Fe που περιέχεται στα κύτταρα. Σε περίπτωση που μειώνεται η ποσότητα του Fe στα κύτταρα, τότε υπάρχει σημαντική ένδειξη υπολειτουργίας αυτών των ενζύμων με αποτέλεσμα την αύξηση του κορεσμού των λιπαρών. Σε αυτή τη περίπτωση, μπορεί να γίνει νέα επώαση με τα στοιχεία που μελετώνται με παράλληλη αύξηση της

συγκέντρωσης Fe. Αν η ποσότητα του Fe στα κύτταρα παραμείνει ίδια με τις control συνθήκες, πιθανότατα η ακορεστικότητα να μην μειωθεί, λόγω της φυσιολογικής ενεργότητας των δεσατουρασών. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει προσθήκη επιπλέον ποσότητας Fe λίγο πριν το τέλος της εκθετικής ανάπτυξης των κυττάρων που αναπτύχθηκαν υπό στρες ώστε να διαπιστωθεί αν η μείωση της ακορεστικότητας είναι αναστρέψιμη.

Η ποσοτική αναλυτική μελέτη των λιπιδίων μπορεί να παρέχει λεπτομέρειες για μηχανισμούς τοξικότητας και επίδρασης του στρες στο λιπιδικό προφίλ των άλγεων. Εφόσον η μέθοδος RP-HPLC-MS/MS με MRM που χρησιμοποιήθηκε διαχώρισε ικανοποιητικά τα λιπίδια που αναλύθηκαν στη παρούσα εργασία, μπορεί να προστεθεί κάποια πρότυπη ένωση για τη ποσοτικοποίηση κάθε λιπιδίου, καθώς και της συνολικής σύστασης των λιπιδίων ανά ομάδα. Με αύξηση του στρες είναι πιθανό, εκτός από την ακορεστικότητα των λιπιδίων, να αλλάζει και η κατανομή των λιπιδίων στις επιμέρους κατηγορίες. Επίσης, η ποσοτικοποίηση των TAG μπορεί να δώσει απαντήσεις για τη μείωση της ακορεστικότητας. Ωστόσο, εφόσον τα μόρια αυτά είναι ουδέτερα, πιθανότατα να μην υπάρχει υψηλή ευαισθησία στις μετρήσεις με ESI και να χρειαστεί ισχυρότερη πηγή ιονισμού.

Επίσης, ενδιαφέρον έχει η μελέτη της ακορεστικότητας του λιπιδικού προφίλ της *Chlorella sorokiniana* σε υψηλότερες συγκεντρώσεις  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$ , ώστε γίνει ικανοποιητική σύγκριση με τα αποτελέσματα του *Chlamydomonas reinhardtii* το οποίο εμφάνισε μείωση της ακορεστικότητας όταν η ανάπτυξή του παρεμποδιζόταν σημαντικά. Εφόσον και οι δύο οργανισμοί περιέχουν δεσατουράσες και υπό στρες συσσωρεύουν TAG, αναμένεται να εμφανίσουν παρόμοιες μεταβολές στην ακορεστικότητα των λιπιδίων, όταν το στρες υπερβεί κάποιο όριο.

## Βιβλιογραφία

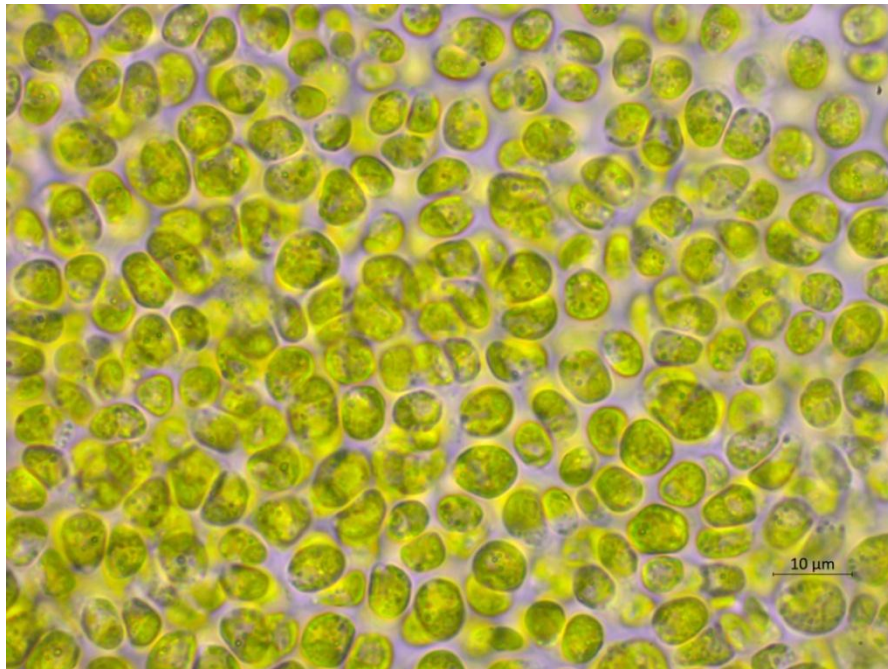
- [1] Harris, Elizabeth H. "Chlamydomonas as a model organism." *Annual review of plant biology* 52.1 (2001): 363-406.
- [2] Lizzul, Alessandro Marco, et al. "Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230." *Biology* 7.2 (2018): 25.
- [3] Hanikenne, Marc. "Chlamydomonas reinhardtii as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance." *New Phytologist* 159.2 (2003): 331-340.
- [4] Danilov, Roman A., and Nils GA Ekelund. "Effects of Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and pentachlorophenol on photosynthesis and motility in *Chlamydomonas reinhardtii* in short-term exposure experiments." *BMC ecology* 1.1 (2001): 1-10.
- [5] Yao, Linxing, et al. "Microalgae lipid characterization." *Journal of agricultural and food chemistry* 63.6 (2015): 1773-1787.
- [6] Juergens, Matthew T., Bradley Disbrow, and Yair Shachar-Hill. "The relationship of triacylglycerol and starch accumulation to carbon and energy flows during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant physiology* 171.4 (2016): 2445-2457.
- [7] Sajjadi, Baharak, et al. "Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97 (2018): 200-232.
- [8] Harwood, John L. "Membrane lipids in algae." *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*. Springer, Dordrecht, 1998. 53-64.
- [9] Nanda, Manisha, et al. "Micro-pollutant Pb (II) mitigation and lipid induction in oleaginous microalgae *Chlorella sorokiniana* UUIND6." *Environmental Technology & Innovation* 23 (2021): 101613.
- [10] Zeraatkar, Amin Keyvan, et al. "Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review." *Journal of environmental management* 181 (2016): 817-831.
- [11] Perales-Vela, Hugo Virgilio, Julián Mario Peña-Castro, and Rosa Olivia Canizares-Villanueva. "Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae." *Chemosphere* 64.1 (2006): 1-10.

- [12] Politaeva, Natalia, et al. "Impact of various physical exposures on *Chlorella Sorokiniana* microalgae cultivation." *International Journal of Applied Engineering Research* 12.21 (2017): 11488-11492.
- [13] Légeret, B., et al. "Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids." *Plant, cell & environment* 39.4 (2016): 834-847.
- [14] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger's Βασικές Αρχές Βιοχημείας* (7<sup>η</sup> Αγγλική-2<sup>η</sup> Ελληνική έκδοση)
- [15] Marr, Allen G., and John L. Ingraham. "Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*." *Journal of bacteriology* 84.6 (1962): 1260-1267.
- [16] Los, Dmitry A., and Norio Murata. "Structure and expression of fatty acid desaturases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1394.1 (1998): 3-15.
- [17] Shanklin, John, and Edgar B. Cahoon. "Desaturation and related modifications of fatty acids." *Annual review of plant biology* 49 (1998): 611.
- [18] Urzica, Eugen I., et al. "Remodeling of membrane lipids in iron-starved *Chlamydomonas*." *Journal of Biological Chemistry* 288.42 (2013): 30246-30258.
- [19] Sarpal, Amarjit S., et al. "NMR techniques for determination of lipid content in microalgal biomass and their use in monitoring the cultivation with biodiesel potential." *Applied microbiology and biotechnology* 100.5 (2016): 2471-2485.
- [20] Li-Beisson, Yonghua, et al. "The lipid biochemistry of eukaryotic algae." *Progress in Lipid Research* 74 (2019): 31-68.
- [21] Van Meer, Gerrit, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nature reviews Molecular cell biology* 9.2 (2008): 112-124.
- [22] Kobayashi, Koichi. "Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development." *Journal of plant research* 129.4 (2016): 565-580.
- [23] Harwood, John L. "Membrane lipids in algae." *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*. Springer, Dordrecht, 1998. 53-64.
- [24] Skoog, Douglas A., F. James Holler, and Timothy A. Nieman. "Αρχές ενόργανης ανάλυσης." *Εκδόσεις Κωσταράκη* (2007).

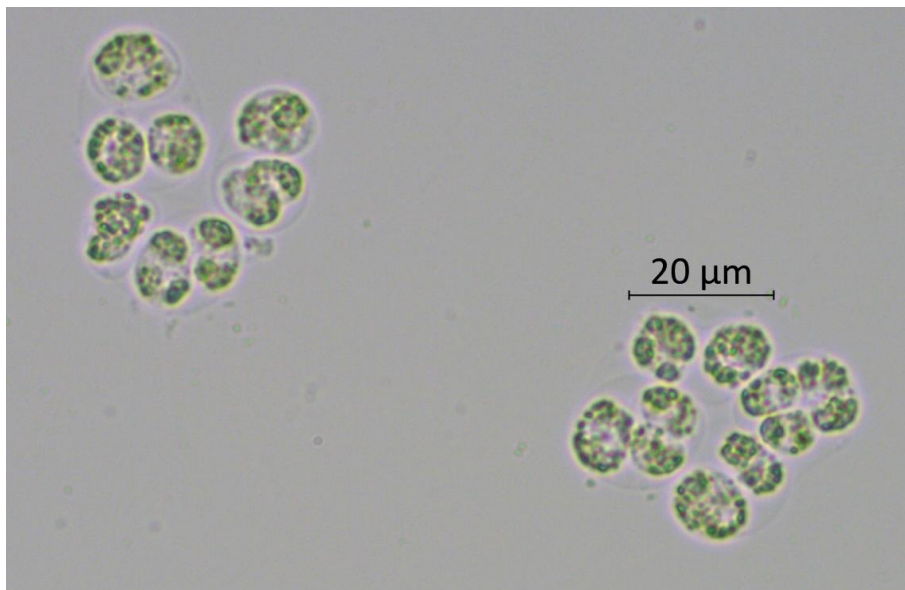
- [25] Harris, Daniel C., Ποσοτική χημική ανάλυση (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2010).
- [26] PerkinElmer. The 30-Minute Guide to ICP-MS. 1-8
- [27] <https://pediaa.com/category/science/chemistry/analytical-chemistry/>
- [28] Yamashita, Masamichi, and John B. Fenn. "Negative ion production with the electrospray ion source." *The Journal of Physical Chemistry* 88.20 (1984): 4671-4675.
- [29] Banerjee, Shibdas, and Shyamalava Mazumdar. "Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte." *International journal of analytical chemistry* 2012 (2012).
- [30] Venter, Andre, Marcela Nefliu, and R. Graham Cooks. "Ambient desorption ionization mass spectrometry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27.4 (2008): 284-290.
- [31] Takats, Zoltan, et al. "Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization." *Science* 306.5695 (2004): 471-473.
- [32] Haddad, Renato, Regina Sparrapan, and Marcos N. Eberlin. "Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry* 20.19 (2006): 2901-2905.
- [33] Haddad, Renato, et al. "Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography." *Analytical Chemistry* 80.8 (2008): 2744-2750.
- [34] Takats, Zoltan, Justin M. Wiseman, and R. Graham Cooks. "Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology." *Journal of mass spectrometry* 40.10 (2005): 1261-1275.
- [35] Hirabayashi, Atsumu, Minoru Sakairi, and Hideaki Koizumi. "Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry." *Analytical Chemistry* 66.24 (1994): 4557-4559.
- [36] Zilch, Lloyd W., et al. "Charge separation in the aerodynamic breakup of micrometer-sized water droplets." *The Journal of Physical Chemistry A* 112.51 (2008): 13352-13363.
- [37] Parfenyuk, V. I. "Surface potential at the gas-aqueous solution interface." *Colloid Journal* 64.5 (2002): 588-595.

- [38] McMurry, J. Οργανική Χημεία (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης)
- [39] Klein, D. Οργανική Χημεία, Τόμος Β (2<sup>η</sup> Αμερικάνικη-1<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση)
- [40] Folch, Jordi, Mark Lees, and Gerald H. Sloane Stanley. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues." *J Biol Chem* 226.1 (1957): 497-509.
- [41] Bligh, E. Graham, and W. Justin Dyer. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37.8 (1959): 911-917.
- [42] Yang, M., et al. "Qualitative and quantitative analyses of polar glycerolipids in *Chlamydomonas reinhardtii* based on LC-MS techniques, Chin." *Bull. Bot* 53 (2018): 812-828.
- [43] May, Thomas W., and Ray H. Wiedmeyer. "A table of polyatomic interferences in ICP-MS." *ATOMIC SPECTROSCOPY-NORWALK CONNECTICUT- 19* (1998): 150-155.
- [44] <https://www.geicp.com/>
- [45] Mavroudakis, L. Development and Application of Desorption Sonic- Spray Ionization Mass Spectrometry for the Direct Analysis of Membrane Lipids in Microorganism Cells, University of Crete, 2018.
- [46] Fulmer, Gregory R., et al. "NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist." *Organometallics* 29.9 (2010): 2176-2179.
- [47] Skogen Chauton, Matilde, Trond Røvik Størseth, and Geir Johnsen. "High-resolution magic angle spinning 1H NMR analysis of whole cells of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): Broad range analysis of metabolic composition and nutritional value." *Journal of applied phycology* 15.6 (2003): 533-542.
- [48] Spyros, Apostolos, and Photis Dais. *NMR spectroscopy in food analysis*. Royal Society of Chemistry, 2012.
- [49] Karpagam, R., et al. "Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production." *Ecotoxicology and environmental safety* 121 (2015): 253-257.
- [50] Mpesios, A., et al. "Heterotrophic growth of *Chlorella sorokiniana*: temperature dependence of kinetics and of fatty acid distribution."

## Παράρτημα

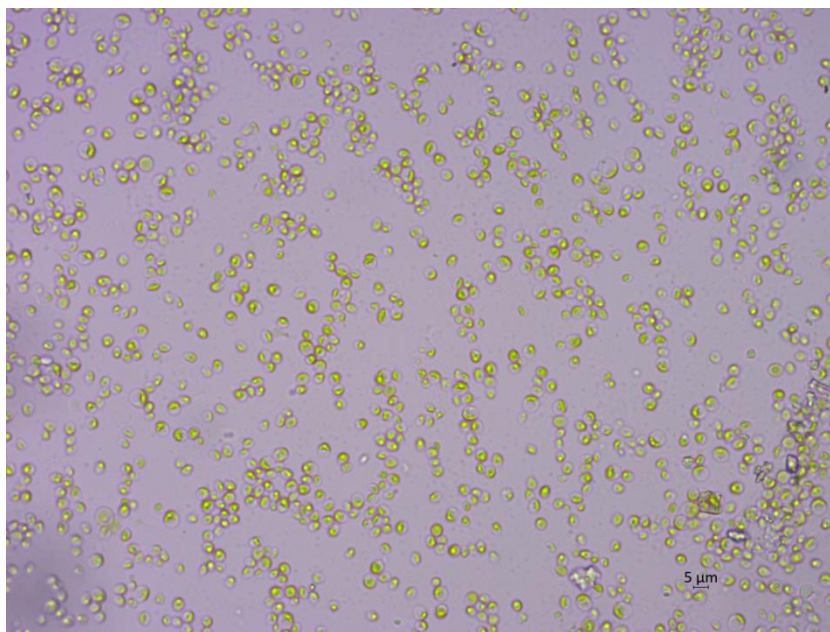


Εικόνα Π1: Παρατήρηση κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* με οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας ελαιοβυθιζόμενο φακό.

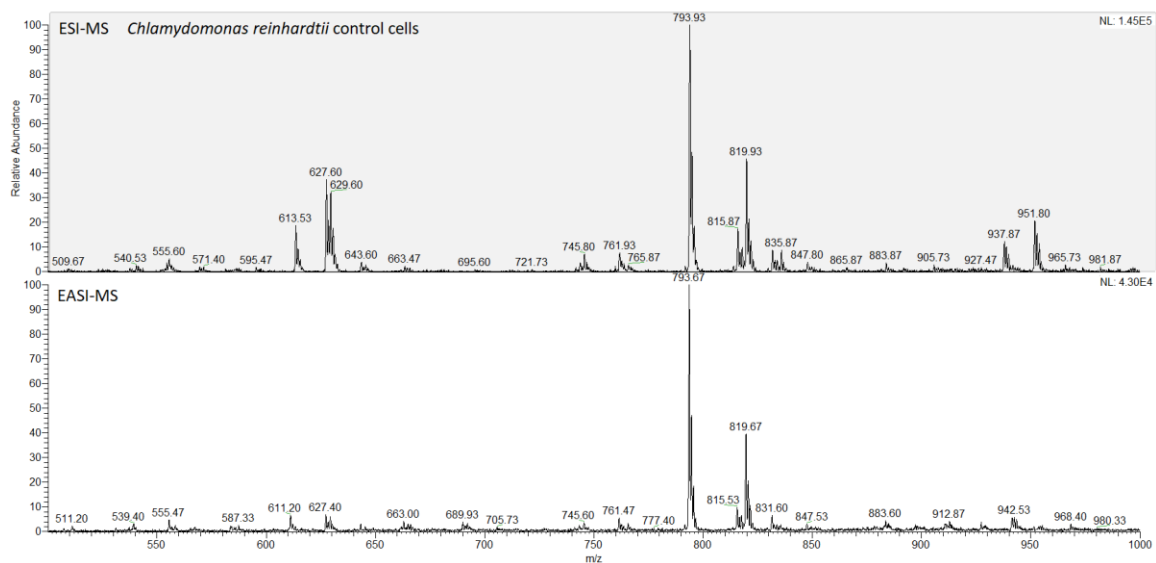


Εικόνα Π2: Παρατήρηση κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένων παρουσία 6 ppm  $\text{Ni}^{2+}$ . Οι κυτταρικές μεμβράνες φαίνονται να έχουν σχαστεί.

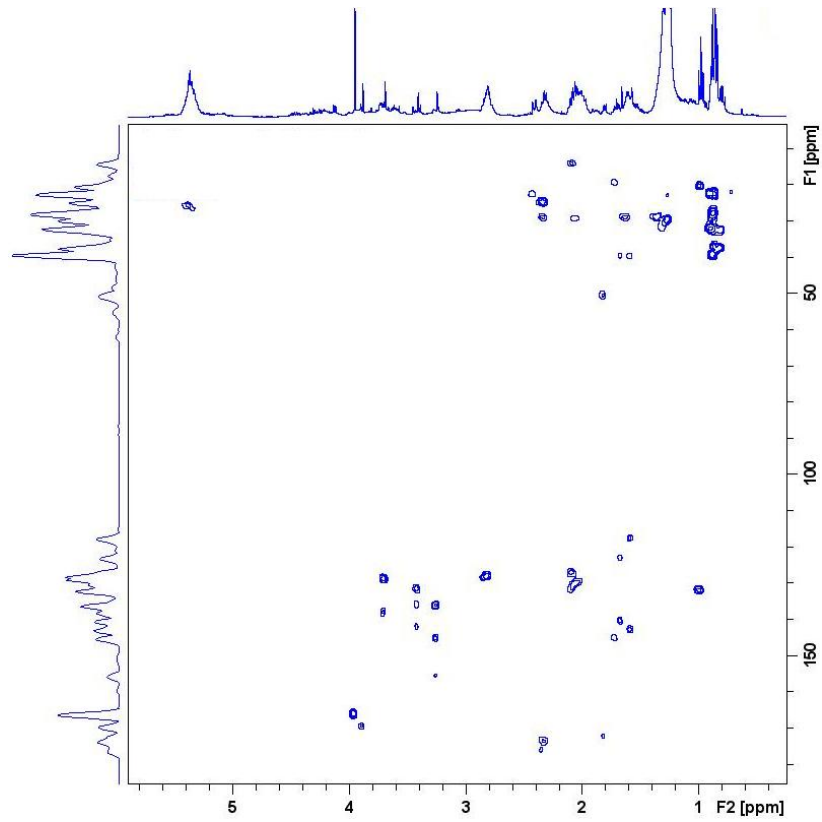




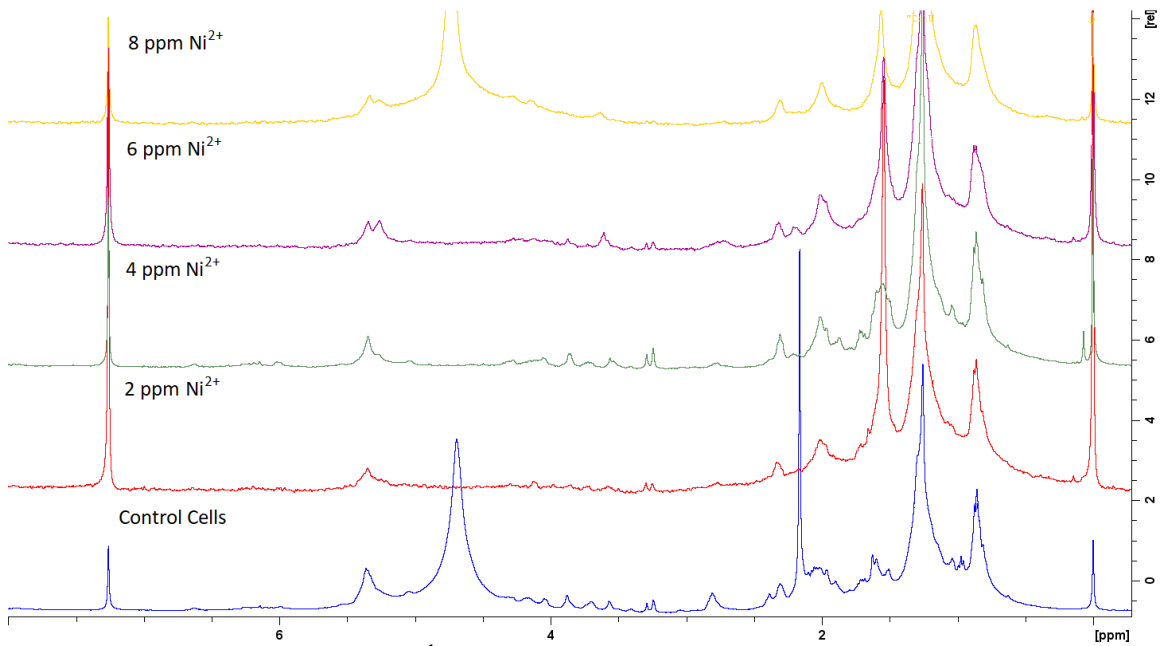
Εικόνα Π3: Παρατήρηση κυττάρων *Chlorella sorokiniana* με οπτικό μικροσκόπιο.



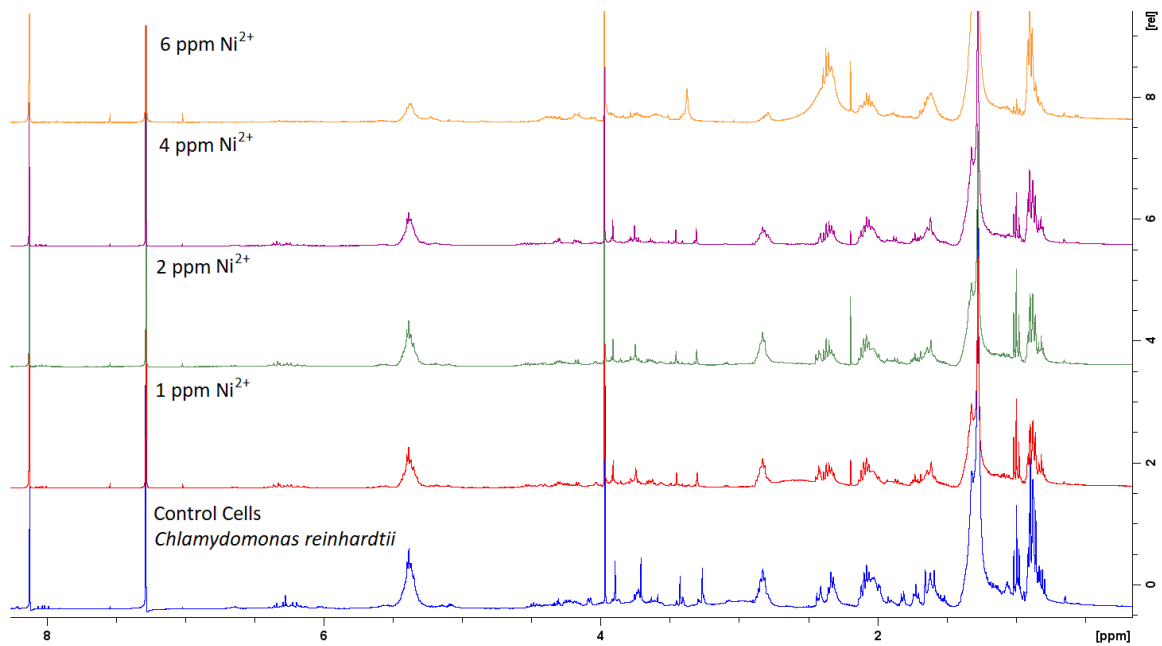
Εικόνα Π4: Φάσμα μάζας κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιιεργημένων χωρίς κάποια προσθήκη σε εύρος 500-1000  $m/z$  στον αρνητικό ιοντισμό. Πάνω: Λήψη φάσματος με την τεχνική ESI-MS σε εκχύλισμα. Κάτω: Λήψη φάσματος με την τεχνική EASI-MS. Ο διαλύτης και στις 2 περιπτώσεις είναι ACN:DMF 1:1.



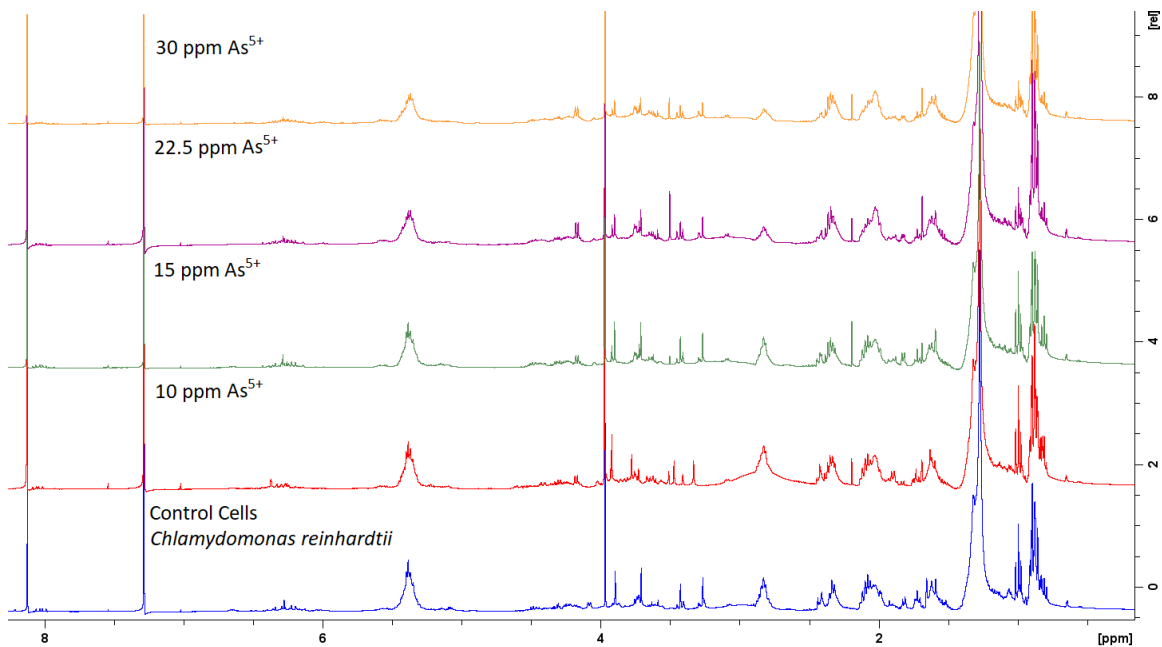
Εικόνα Π6: Φάσμα HMBC εκχυλίσματος control κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*.



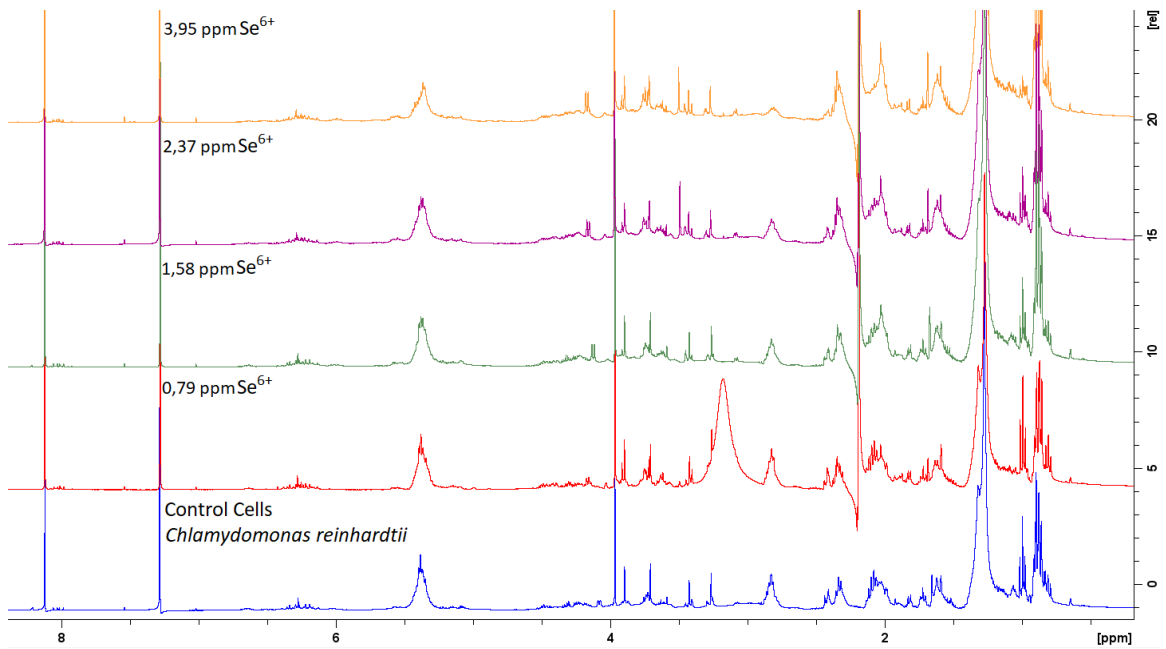
Εικόνα Π7: Διαδοχικά φάσματα  $^1\text{H}$  κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένων παρουσία  $\text{Ni}^{2+}$  μέσω της τεχνικής HR-MAS.



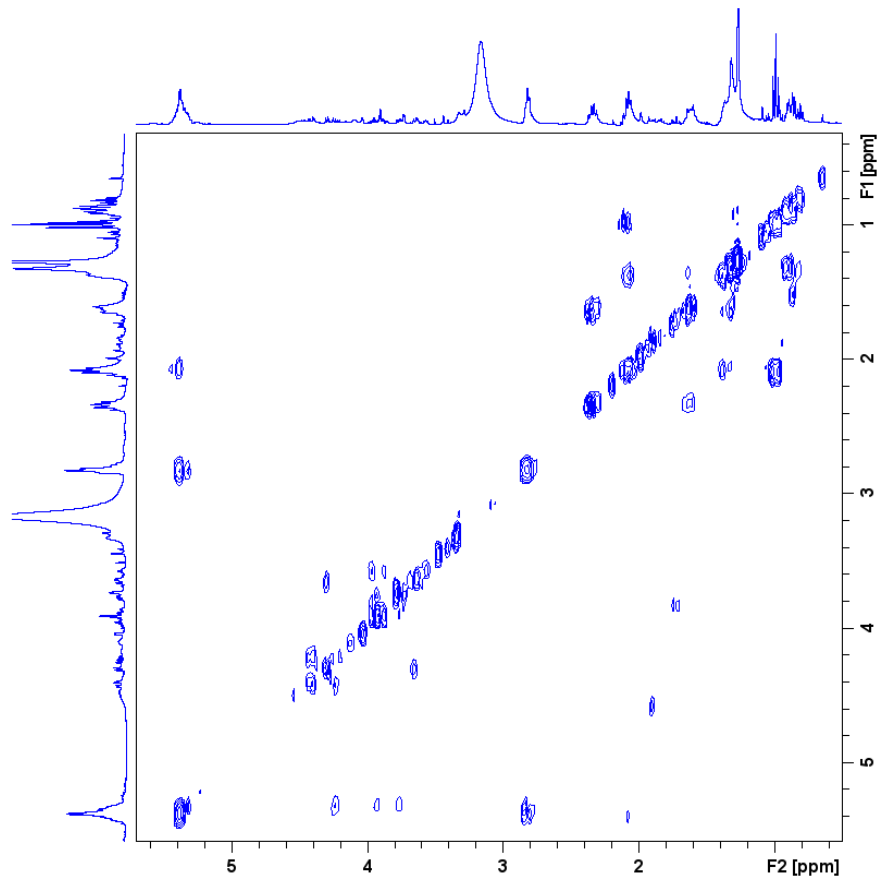
Εικόνα Π8: Διαδοχικά φάσματα <sup>1</sup>H NMR εκχυλίσματος κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένων παρουσία Ni<sup>2+</sup>.



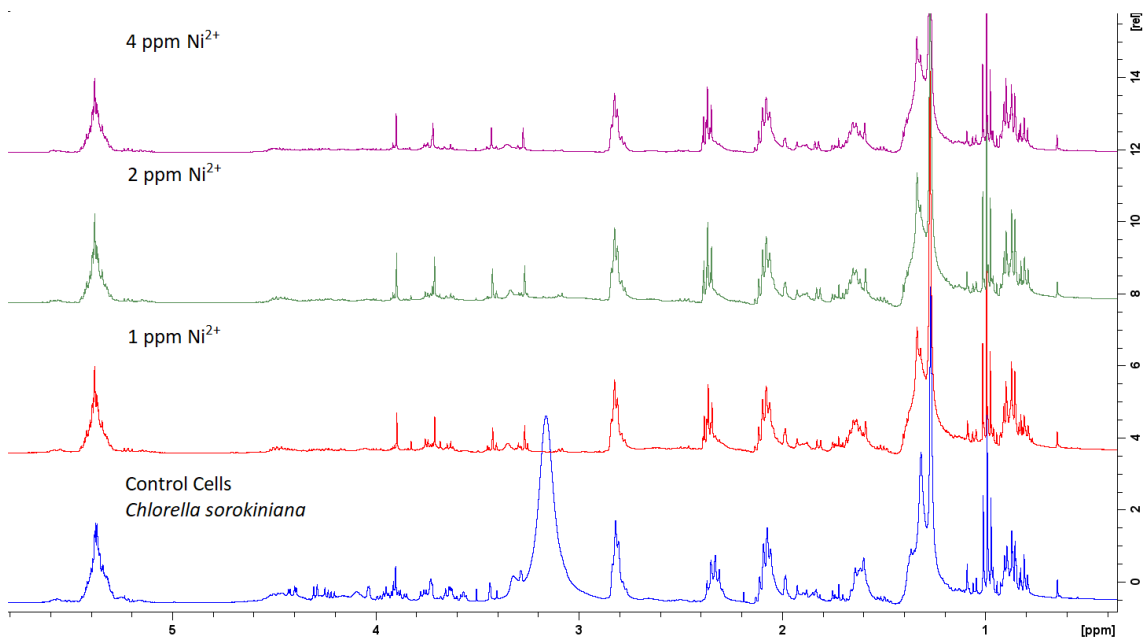
Εικόνα Π9: Διαδοχικά φάσματα <sup>1</sup>H NMR εκχυλίσματος κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένων παρουσία As<sup>5+</sup>.



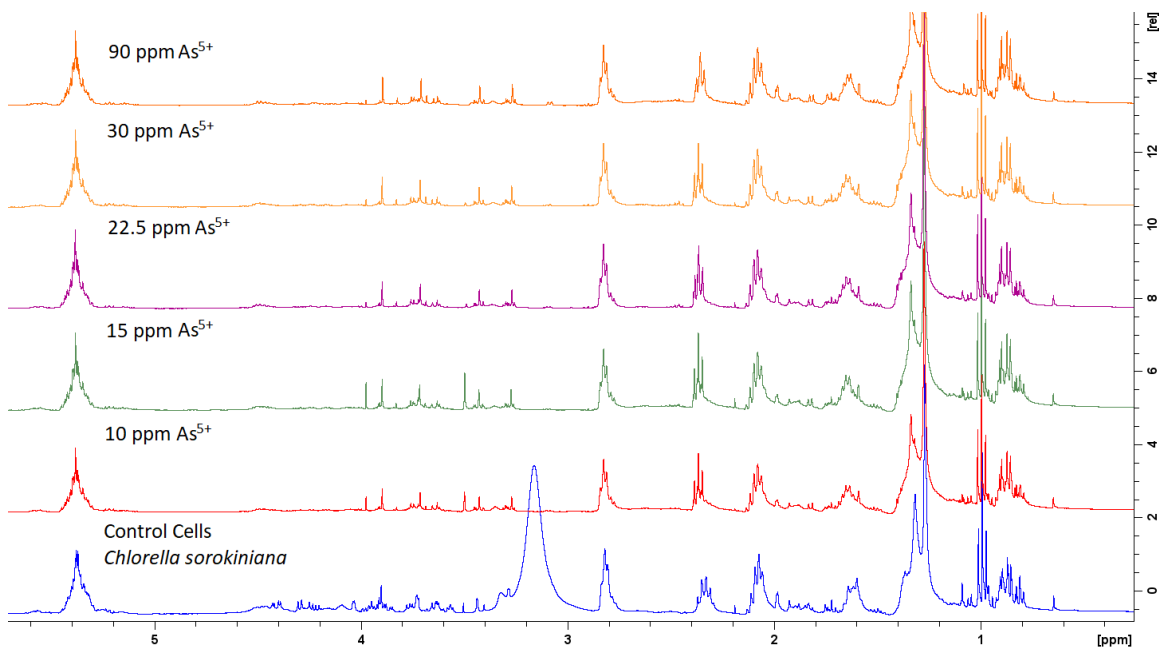
Εικόνα Π10: Διαδοχικά φάσματα  $^1\text{H}$  NMR εκχυλίσματος κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένων παρουσία  $\text{Se}^{6+}$ . Υπάρχει υπόλειμμα ακετόνης που εμφανίζεται στα 2.16 ppm.



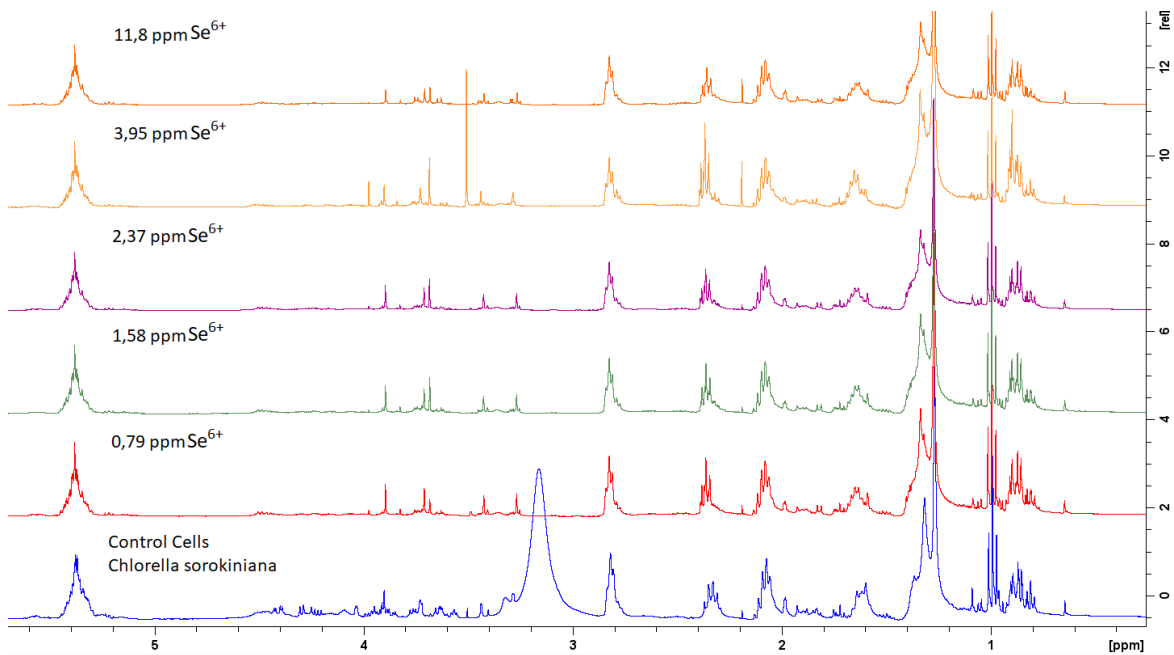
Εικόνα Π11: Φάσμα COSY NMR εκχυλίσματος control κυττάρων *Chlorella sorokiniana*.



Εικόνα Π12: Διαδοχικά φάσματα  $^1\text{H}$  NMR εκχυλίσματος κυττάρων *Chlorella sorokiniana* καλλιεργημένων παρουσία  $\text{Ni}^{2+}$ . Η ευρεία κορυφή στα 3.2 ppm αντιστοιχεί στα  $-\text{OH}$  του δείγματος που δεν έχουν αντικατασταθεί από  $^2\text{D}$ .



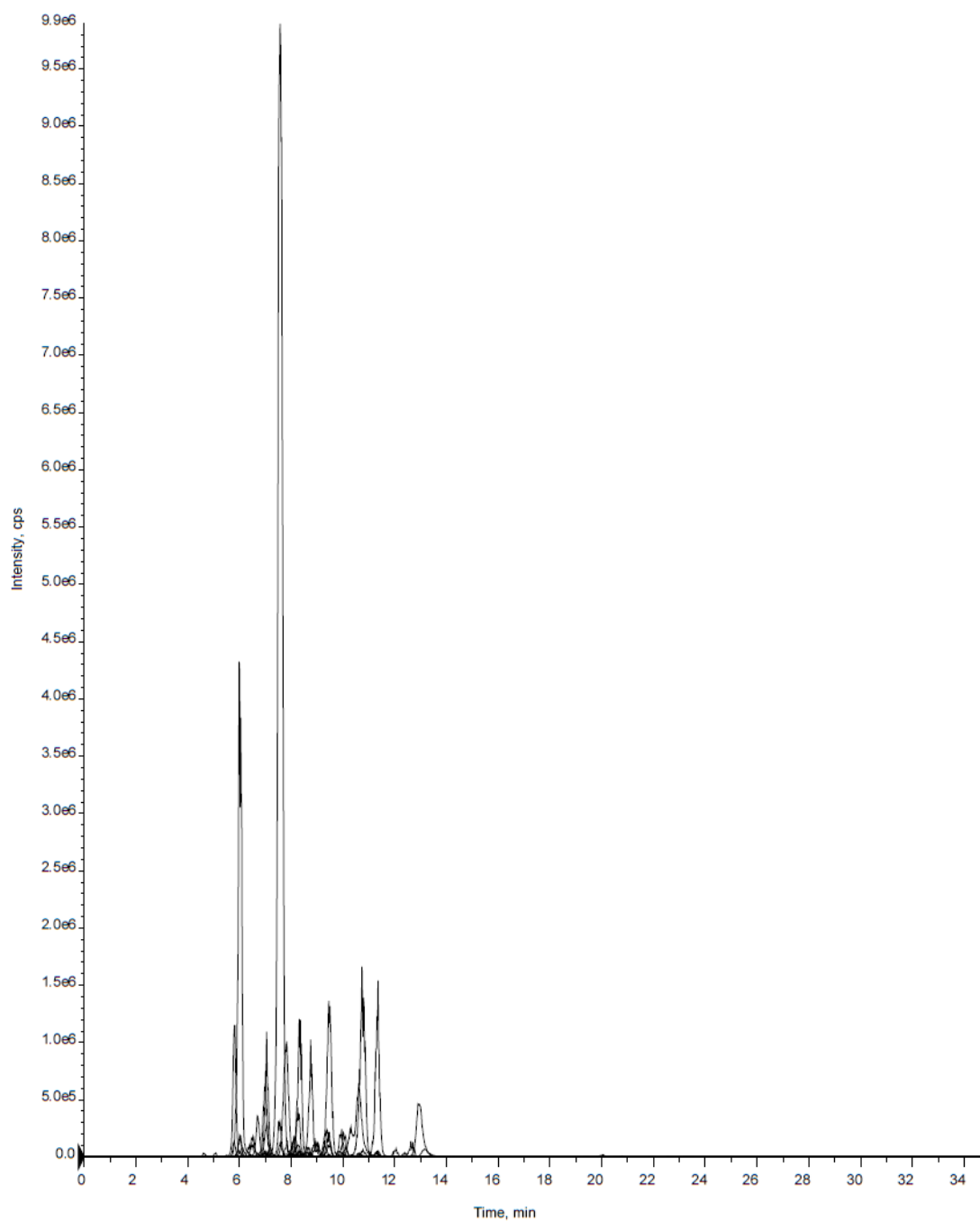
Εικόνα Π13: Διαδοχικά φάσματα  $^1\text{H}$  NMR εκχυλίσματος κυττάρων *Chlorella sorokiniana* καλλιεργημένων παρουσία  $\text{As}^{5+}$ .



Εικόνα Π14: Διαδοχικά φάσματα  $^1\text{H}$  NMR εκχυλίσματος κυττάρων *Chlorella sorokiniana* καλλιιεργημένων παρουσία  $\text{Se}^{6+}$ .

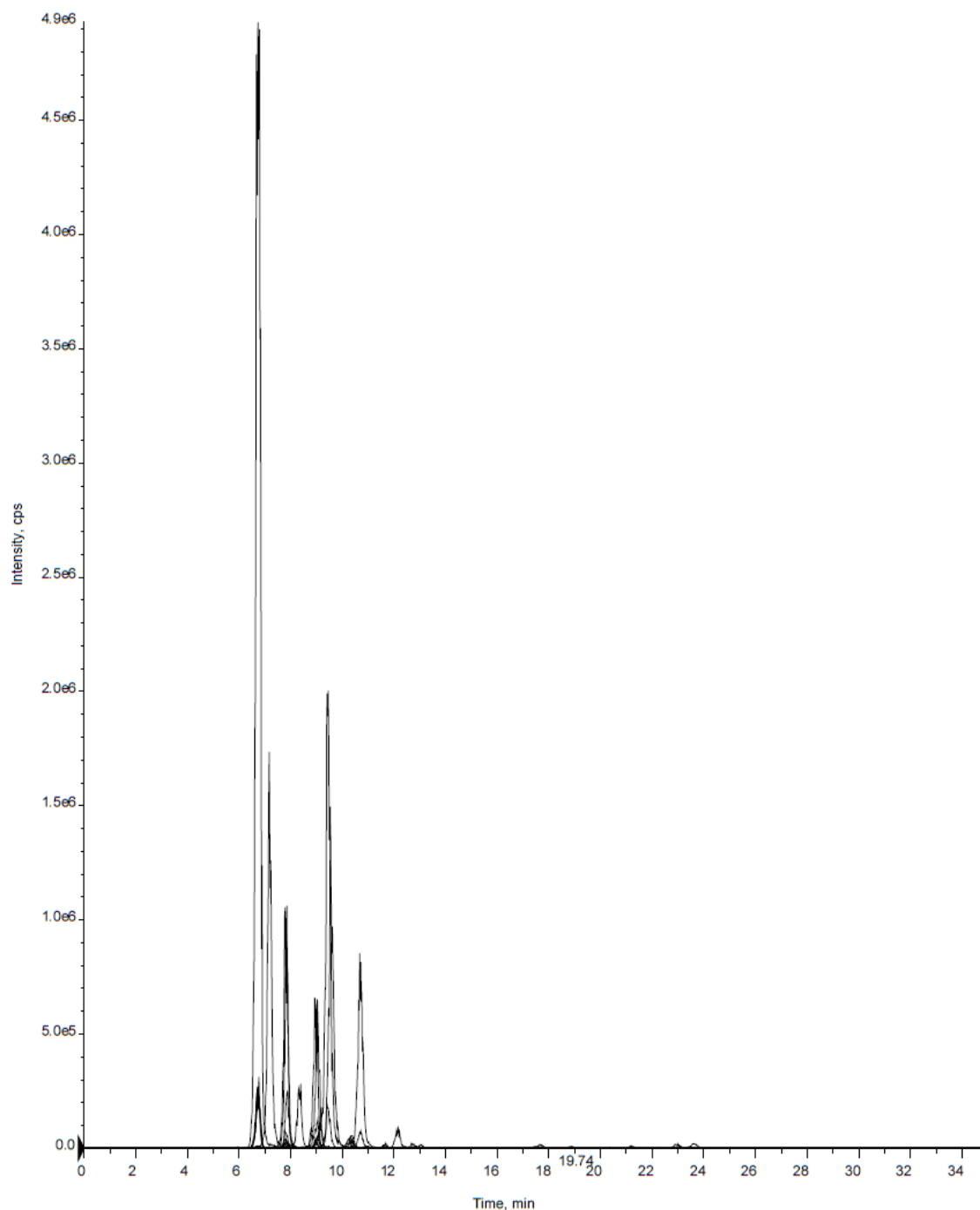
	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	ID	CE (volts)		Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	ID	CE (volts)
1	736.500	547.500	PG 32:2	35.000	41	704.500	474.400	DGTS32:4	35.000
2	738.500	549.500	PG 32:1	35.000	42	708.500	474.400	DGTS32:2	35.000
3	740.500	551.500	PG 32:0	35.000	43	712.600	474.400	DGTS32:0	35.000
4	760.500	571.500	PG 34:4	35.000	44	726.500	466.400	DGTS34:7	35.000
5	762.500	573.500	PG 34:3	35.000	45	730.500	500.400	DGTS34:5	35.000
6	764.500	575.500	PG 34:2	35.000	46	734.500	474.400	DGTS34:3	35.000
7	766.500	577.500	PG 34:1	35.000	47	738.600	474.400	DGTS34:1	35.000
8	768.500	579.500	PG 34:0	35.000	48	756.500	496.400	DGTS36:6	35.000
9	762.500	335.200	MGDG 34:7	50.000	49	760.600	498.400	DGTS36:4	35.000
10	764.500	335.200	MGDG 34:6	50.000	50	764.600	500.400	DGTS36:2	35.000
11	764.500	337.200	MGDG 34:6(2)	50.000	51	754.500	496.400	DGTS36:7	35.000
12	766.500	335.200	MGDG 34:5	50.000	52	764.500	309.200	MGDG34:6	50.000
13	768.500	339.200	MGDG 34:4	50.000	53	766.500	337.200	MGDG34:5(2)	50.000
14	770.500	339.200	MGDG 34:3	50.000	54	766.500	339.200	MGDG34:5(3)	50.000
15	772.500	339.200	MGDG 34:2	50.000	55	766.500	333.200	MGDG34:5(4)	50.000
16	774.600	339.200	MGDG 34:1	50.000	56	768.500	337.200	MGDG34:4(2)	50.000
17	904.500	313.200	DGDG 32:3	70.000	57	768.500	311.200	MGDG34:4(3)	50.000
18	924.500	335.200	DGDG 34:7	70.000	58	768.500	313.200	MGDG34:4(4)	50.000
19	928.500	337.200	DGDG 34:5	70.000	59	768.500	341.200	MGDG34:4(6)	50.000
20	932.600	339.200	DGDG 34:3	70.000	60	770.500	337.200	MGDG34:3(2)	50.000
21	938.600	341.200	DGDG 34:0	70.000	61	770.500	335.200	MGDG34:3(3)	50.000
22	958.600	339.200	DGDG 36:4	70.000	62	772.500	341.200	MGDG34:2(2)	50.000
23	960.600	341.200	DGDG 36:3	70.000	63	772.500	313.200	MGDG34:2(3)	50.000
24	810.500	313.200	SQDG 32:1	50.000	64	774.600	341.200	MGDG34:1(2)	50.000
25	812.500	313.200	SQDG 32:0	50.000	65	904.500	311.200	DGDG32:3(2)	70.000
26	834.500	313.200	SQDG 34:3	50.000	66	926.500	337.200	DGDG34:6(2)	70.000
27	840.500	341.100	SQDG 34:0	50.000	67	926.500	333.200	DGDG34:6(3)	70.000
28	688.400	547.400	PE32:2	35.000	68	926.500	335.200	DGDG34:6	70.000
29	690.500	549.500	PE32:1	35.000	69	928.500	335.200	DGDG34:5(2)	70.000
30	692.500	551.500	ON32:0	35.000	70	930.600	335.200	DGDG34:4	70.000
31	714.500	573.500	PE34:4	35.000	71	930.600	337.200	DGDG34:4(2)	70.000
32	716.500	575.500	PE34:2	35.000	72	930.600	339.200	DGDG34:4(3)	70.000
33	718.500	577.500	PE34:1	35.000	73	932.600	313.200	DGDG34:3(2)	70.000
34	736.400	595.400	PE36:6	35.000	74	932.600	337.200	DGDG34:3(3)	70.000
35	740.500	599.500	PE36:4	35.000	75	934.600	339.200	DGDG34:2	70.000
36	744.500	603.500	PE36:2	35.000	76	934.600	337.200	DGDG34:2(2)	70.000
37	850.500	573.500	PI34:3	35.000	77	936.600	339.200	DGDG34:1	70.000
38	852.500	575.500	PI34:2	35.000	78	958.600	337.200	DGDG36:4(2)	70.000
39	854.500	577.500	PI34:1	35.000	79	836.500	313.200	SQDG34:2	50.000
40	856.500	579.500	PI34:0	35.000	80	838.500	313.200	SQDG34:1	50.000

Πίνακας Π1: Λίστα  $m/z$  για  $Q_1$  &  $Q_3$  των λιπιδίων που μετρήθηκαν με HPLC-MRM.



Εικόνα Π15: Χρωματογράφημα 0-35 min εκχυλίσματος Control κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*.





Εικόνα Π16: Χρωματογράφημα 0-35 min εκχυλίσματος Control κυττάρων *Chlorella sorokiniana*.

Παρακάτω παρουσιάζονται διαδοχικά μεγεθυμένα χρωματογραφήματα για τα εκχυλίσματα των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* για όλες τις συνθήκες επώασης παρουσία  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{6+}$  με επισήμανση των κύριων λιπιδίων. Για τα κύτταρα *Chlorella sorokiniana* παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα για τις συγκεντρώσεις 1, 2, 4 ppm  $\text{Ni}^{2+}$ .

