

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΦΥΚΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΑΠΟ
ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ**

ΜΑΝΤΖΩΡΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

**Υπεύθυνος Καθηγητής:
ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

TECHNOLOGIES FOR ENVIRONMENTAL PROTECTION



Master Thesis

**PHYCOREMEDIATION OF HEAVY METAL POLLUTED
WATERS**

MANTZOROU ANTONIA

**Master Thesis Supervisor:
Pergantis Spiros**

HERAKLION 2015

Εξεταστική Επιτροπή

Σπύρος Περγαντής

Καθηγητής, Τομέας Χημείας Περιβάλλοντος και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Κρήτης (Επιβλέπων)

Φίλιππος Βερβερίδης

Καθηγητής, Επιστ. Υπευθ. Εργαστηρίου Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, ΤΕΙ Κρήτης (Συνεπιβλέπων)

Απόστολος Σπύρος

Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Χημείας Περιβάλλοντος και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών "Τεχνολογίες Προστασίας Περιβάλλοντος" του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το κύριο μέρος των αναλύσεων εκπονήθηκε στη Σχολή Τεχνολόγων Γεωπόνων του Τ.Ε.Ι Κρήτης και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών. Ένας σημαντικός αριθμός μετρήσεων διεξήχθη στο εργαστήριο Θρέψης Φυτών της Σχολής Τεχνολόγων Γεωπόνων του Τ.Ε.Ι Κρήτης.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Φίλιππο Βερβερίδη (Καθηγητής, Επιστ. Υπευθ. Εργαστηρίου Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, ΤΕΙ Κρήτης) για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, της διεξαγωγής και της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το επιστημονικό προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών για την καθοδήγηση και τις υποδείξεις που μου προσέφεραν για την κατανόηση του πειραματικού μέρους. Ειδικές ευχαριστίες οφείλω στη Νατάσα Παπαδάκη (Τεχνολόγος Γεωπόνος PhD – Εργαστήριο Θρέψης Φυτών, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, ΤΕΙ Κρήτης) για το χρόνο που αφιέρωσε, για την επιτυχή διεκπεραίωση ενός μεγάλου αριθμού εργαστηριακών αναλύσεων.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΜΑΝΤΖΩΡΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

Βάρνης 37, 71305, Ηράκλειο Κρήτης
τηλ. 2810 254767 κινητό 6947230140
e-mail: tonia_mantzorou@hotmail.com

Προσωπικές πληροφορίες

Ημερομηνία γέννησης: 25/08/1981

Σπουδές

2011 – 2015 Μ.Δ.Ε «Τεχνολογίες προστασίας περιβάλλοντος», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μεταπτυχιακή διατριβή: Φυκοαποκατάσταση ρυπασμένων υδάτων από βαρέα μέταλλα

2008 – 2010 Πτυχίο του Τμήματος Βιολογικών Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης

2001 – 2007 Πτυχίο του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης

Πτυχιακή διατριβή: Η λίπανση στη βιολογική γεωργία
1999 Απολυτήριο Γενικού Λυκείου Τήνου

Εργασιακή εμπειρία

2/2013 – 6/2013 Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (πρακτική άσκηση)

8/2006 – 1/2007 Εργαστήριο Εδαφολογίας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης (πρακτική άσκηση)

2000 – 2001 Επιμελήτρια μουσείου, Παναγία της Τήνου

Ξένες γλώσσες

Αγγλικά Certificate of English Language Proficiency - The Michigan State University

Γαλλικά D.E.L.F. 1er Degré

Δεξιότητες πληροφορικής

Λειτουργικό σύστημα MS Windows

Εφαρμογές γραφείου MS Office [(Word, Excel, Power Point, Access), Internet]

CURICULUM VITAE

MANTZOROU ANTONIA

Varnis 37, 71305, Heraklion, Greece

tel. no. +30 2810 254767, mob. ph. no. +30 6947 230140

e-mail: tonia_mantzorou@hotmail.com

Personal information

Date of birth 25/08/1981
Nationality Greek
Gender Female

Education

2011 – 2015 MSc «Technologies for environmental protection»,
Department of Chemistry, University of Crete.
Master thesis Phycoremediation of heavy metal polluted waters
2008 – 2010 Bachelor in Biofloriculture & GreenHouse Crops
Department, Technological Educational of Crete
2001 – 2007 Bachelor in Crop Science Department, Technological
Educational of Crete
Diploma thesis Fertilization in organic farming
1999 Lykeion (upper secondary education), Tinos, Greece

Work experience

2/2013 – 6/2013 Laboratory of General Chemistry, Department of
Chemistry, University of Crete (practical training)
8/2006 – 1/2007 Laboratory of Soil Science, Crop Science Department,
Technological Educational of Crete (practical training)
2000 – 2001 Curator of the Museum of Tinian Artists, Panagia of Tinos

Languages

English Certificate of English Language Proficiency. The Michigan
State University
French D.E.L.F. 1er Degré
Greek Native language

Computer skills

Operating Systems MS Windows
Applications MS Office [(Word, Excel, Power Point, Access), Internet]

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	i
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	viii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	x
ABSTRACT	xi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Η ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΩΝ	1
1.2. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΟΡΟΥ “ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ”	2
1.3. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ	4
1.3.1. Η τεχνολογία της φυκοαποκατάστασης	5
1.3.2. Μικροφύκη	6
1.3.3. Το γένος <i>Chlamydomonas</i>	7
1.3.4. Βιορρόφηση	12
1.3.4.1. Επιμέρους μηχανισμοί βιορρόφησης	21
1.3.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιορρόφηση.....	23
1.3.5. Βιοσυσσώρευση	27
1.3.6. Σύγκριση της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης.....	35
1.3.7. Σκοπός της παρούσας έρευνας	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	38
2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	38
2.3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	40
2.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	42
2.5. ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	43
2.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΞΗΡΗΣ ΜΑΖΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	47
2.7. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	47
2.8. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	48
2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	49

2.10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ	50
2.11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	50
2.12. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ <i>CHLAMYDOMONAS</i> <i>REINHARDTII</i>	51
2.12.1. Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων προς μέτρηση	51
2.12.2. Ποσοτικός προσδιορισμός χαλκού	53
2.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	54
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ	55
3.2. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	57
3.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	63
3.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	68
3.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ	74
3.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	83
3.7. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ <i>CHLAMYDOMONAS</i> <i>REINHARDTII</i>	87
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.** Απεικόνιση του χλωροφύκου *Chlamydomonas* sp. Έγχρωμη μικρογραφία SEM (μεγέθυνση: x 680 σε μέγεθος 6 x 7cm), (Power and Syred, n.d.) 10
- Εικόνα 2.** Κυτταρική δομή του *Chlamydomonas reinhardtii*. N: πυρήνας, Nu: πυρηνίσκος, F: μαστίγια, C: κυπελλοειδής χλωροπλάστης, E: στίγμα, P: πυρηνοειδές, M: μιτοχόνδρια, G: golgi, S: κόκκοι αμύλου, V: χυμοτόπιο (Harris, 2009). 11
- Εικόνα 3.** Βιολογικές μέθοδοι για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014)..... 13
- Εικόνα 4.** Βιορρόφηση μεταλλικών ιόντων (Chojnacka, 2009). 13
- Εικόνα 5.** Βιβλιογραφικές αναφορές που έχουν δημοσιευτεί με τη πάροδο του χρόνου για τη βιορρόφηση (Romera et al., 2006)..... 15
- Εικόνα 6.** SEM εικόνες των μικροφυκών *Chlorella miniata* (a, b) και *Chlamydomonas* sp. (c, d). (a): κύτταρο μάρτυρας, (b): κύτταρο επεξεργασμένο με $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cr (III)}$, (c): κύτταρο επεξεργασμένο με $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}$ και (d): κύτταρο επεξεργασμένο με $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}$ (Arief et al., 2008, Wan Maznah et al., 2012). 17
- Εικόνα 7.** Οι μέσες τιμές q_{\max} που ελήφθησαν από διάφορους τύπους βιομάζας (González et al., 2011). 21
- Εικόνα 8.** Τα στάδια της βιοσυσσώρευσης των μεταλλικών ιόντων (Chojnacka, 2009). 28
- Εικόνα 9.** Σύγκριση των δομών των οξυανιόντων χρωμικού και αρσενικού με τα ενδογενή οξυανιόντα θειικού και φωσφορικού αντίστοιχα (Beckett et al., 2007). 29
- Εικόνα 10.** Η δομή του συμπλόκου μεθυλδραργύρου – κυστεΐνης μιμείται εκείνη της μεθειονίνης (Beckett et al., 2007). 29
- Εικόνα 11.** Πρωτοταγής δομή των φυτοχελαινών (Hirata et al., 2005). 32

- Εικόνα 12.** Η σύνθεση των PCs στα φυτά. Συντομογραφίες: Glu: γλουταμινικό οξύ, Cys: κυστεΐνη, GCS: συνθετάση της γ – γλουταμυλο – κυστεΐνης, GS: συνθάση της γλουταθειόνης, Gly: γλυκίνη, GSH: γλουταθειόνη, PCS: PC συνθάση, PC: φυτοχελατίνη (Cobbett, 2001, Mejare and Bulow, 2001). 33
- Εικόνα 13.** Προτεινόμενο μοντέλο της σύνθεσης της φυτοχελατίνης (PC), της μεταλλικής αποτοξίνωσης και ομοιόστασης (Gaur and Rai, 2001, Howe and Merchant, 1992). 35
- Εικόνα 14.** Μακρά συντήρηση του *Chlamydomonas reinhardtii* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. 39
- Εικόνα 15.** Ειδικά διαμορφωμένοι βιοαντιδραστήρες μέσα στους οποίους πραγματοποιήθηκε η υγρή καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*. 40
- Εικόνα 16.** Ένα εκ των 2 συστημάτων καλλιέργειας του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* που διαθέτει το εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Το κάθε σύστημα περιλαμβάνει δεξαμενή νερού (Α), μέσα στην οποία τοποθετούνται 10 βιοαντιδραστήρες (Β), σύστημα παροχής αέρα (Γ) καθώς και λάμπες ψυχρού φωτισμού (Δ). Η θερμοκρασία ρυθμίζεται από έναν ψηφιακό ελεγκτή θερμοκρασίας (Ε) μέσω ενός σένσορα (ΣΤ) που τοποθετείται μέσα στη δεξαμενή νερού. Το νερό περνά μέσα από φίλτρα (Ζ) με τη βοήθεια αντλιών (Η) και ανακυκλώνεται 41
- Εικόνα 17.** Μακροσκοπική απεικόνιση των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας σε χρόνους της τάξης των ημερών. 43
- Εικόνα 18.** Χρονοδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για κάθε μεταχείριση με τα βαρέα μέταλλα. Καλλιέργεια Α: Η stock καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε αρχικά. Καλλιέργεια Β: Η καλλιέργεια που προέκυψε με αραιώση της καλλιέργειας Α κατά 1/10. Καλλιέργειες Γ: Οι καλλιέργειες που προέκυψαν από μικρές ποσότητες εναιωρήματος της καλλιέργειας Β. Τοξικής φάση: Φάση έκθεσης των καλλιεργειών σε Cu, Zn, Ni και As. 44
- Εικόνα 19.** Διάταξη καλλιεργειών με τις διάφορες μεταχειρίσεις Cu, Zn και Ni. 46
- Εικόνα 20.** Διάταξη καλλιεργειών με τις διάφορες μεταχειρίσεις As. 47
- Εικόνα 21.** Σχηματική απεικόνιση του αιμοκυτταρόμετρου (Martin, 2013). 48
- Εικόνα 22.** Μικροσκοπική απεικόνιση των νεκρών και ζωντανών κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii*. 49
- Εικόνα 23.** Δείγματα διαφορετικής περιεκτικότητας πρωτεϊνών, μεταχειρισμένα με Bradford χρωστική. 51

- Εικόνα 24.** Διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση της δέσμευσης του Cu από το *Chlamydomonas reinhardtii*. 52
- Εικόνα 25.** Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (Perkin – Elmer 2100)..... 53
- Εικόνα 26.** Εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* βάσει της θέσης τοποθέτησης των βιοαντιδραστήρων (No 1, No 2 κτλ). 56
- Εικόνα 27.** Διάταξη βιοαντιδραστήρων για τον έλεγχο του ρυθμού ανάπτυξης του οργανισμού βάσει των διαθέσιμων θέσεως στο σύστημα (σύστημα A) καθώς και οι διαθέσιμες / αποκλειόμενες θέσεις για το παρόν πείραμα (σύστημα A και B). 56
- Εικόνα 28.** Μακροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) μετάλλων (A: Cu, B: Zn, Γ: Ni) και Δ: του ημιμετάλλου As αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση..... 58
- Εικόνα 29.** Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) Cu. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση. 61
- Εικόνα 30.** Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) Zn. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση. 61
- Εικόνα 31.** Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) Ni. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση. 62
- Εικόνα 32.** Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) As. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση. 62
- Εικόνα 33.** Μικροσκοπική παρατήρηση A: κυττάρων (μάρτυρας) και B: κυττάρων και σχηματιζόμενων σπορίων ή παρομοίων δομών, παρουσία δυσχερών συνθηκών ανάπτυξης του *Chlamydomonas reinhardtii* (1,0 mM Ni). 63

- Εικόνα 34.** Εκτίμηση της ανάπτυξης των καλλιεργειών των μαρτύρων από κάθε επιμέρους πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Οι μάρτυρες συμβολίζονται έτσι όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 19. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 64
- Εικόνα 35.** Εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 65
- Εικόνα 36.** Εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 68
- Εικόνα 37.** Εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (ως ποσοστά επί του συνολικού αριθμού κυττάρων των καλλιεργειών) των μαρτύρων από κάθε επιμέρους πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Οι μάρτυρες συμβολίζονται έτσι όπως παρουσιάζονται στην **Εικόνα 18**. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 69
- Εικόνα 38.** Εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 70
- Εικόνα 39.** Εκτίμηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 71
- Εικόνα 40.** Εκτίμηση της του αριθμού ζωντανών κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 73

- Εικόνα 41.** Εκτίμηση της του αριθμού νεκρών κυττάρων(ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 73
- Εικόνα 42.** Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλες (α+β) κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.... 75
- Εικόνα 43.** Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλες (α+β) κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες..... 77
- Εικόνα 44.** Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης Cu για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 78
- Εικόνα 45.** Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης Zn για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 79
- Εικόνα 46.** Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης Ni για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 80
- Εικόνα 47.** Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 81

Εικόνα 48. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 82

Εικόνα 49. Εκτίμηση της περιεκτικότητας (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε πρωτεΐνες κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. 85

Εικόνα 50. Εκτίμηση της ποσότητας των πρωτεϊνών των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.... 87

Εικόνα 51. Εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu από το υδατικό διάλυμα για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. Α: Ο προσροφημένος Cu (pg Cu / κύτταρο) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε επιφανειακά στα κύτταρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης. Β: Ο συσσωρευμένος Cu (pg Cu / κύτταρο) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε εντός των κυττάρων με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης. Γ: Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης Cu για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση) όπως παρουσιάστηκε και παραπάνω στην **Εικόνα 38**. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (**Πίνακας 7**). Έτσι τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αφού έχουν αφαιρεθεί πρωτίστως οι αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Μετατροπές μονάδων για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu: 0,5 mM = 31,77 ppm, 1,5 mM = 95,32 ppm, 2,0 mM = 127,09 ppm..... 89

Εικόνα 52. Εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu (pg Cu / κύτταρο) με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης από το υδατικό διάλυμα για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. Η εικόνα εντός του γραφήματος αποτελεί μικρογραφία της **Εικόνας 51B**. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (**Πίνακας 7**). Έτσι τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αφού έχουν αφαιρεθεί πρωτίστως οι αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Μετατροπές μονάδων για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu: 0,5 mM = 31,77 ppm, 1,5 mM = 95,32 ppm, 2,0 mM = 127,09 ppm. 92

Εικόνα 53. Εκτίμηση της δέσμευσης του Cu από το υδατικό διάλυμα που περιείχε 0,40 ppm. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. Ο προσροφημένος και συσσωρευμένος Cu (μ g Cu / κύτταρο) αντιπροσωπεύουν τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε από τα κύτταρα του μάρτυρα μέσω της διαδικασίας της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης αντίστοιχα. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (0,40 ppm). 94

Εικόνα 54. Εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu από το υδατικό διάλυμα για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. A: Ο προσροφημένος Cu (μ g Cu / g ξηρής βιομάζας) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε επιφανειακά στα κύτταρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης. B: Ο συσσωρευμένος Cu (μ g Cu / g ξηρής βιομάζας) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε εντός των κυττάρων με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (**Πίνακας 7**). Έτσι τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αφού έχουν αφαιρεθεί πρωτίστως οι αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Μετατροπές μονάδων για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu: 0,5 mM = 31,77 ppm, 1,5 mM = 95,32 ppm, 2,0 mM = 127,09 ppm..... 95

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Πειραματικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί πάνω στη δυνατότητα του χλωροφύκου <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> να απομακρύνει μέταλλα (me) από υδατικά διαλύματα (μονομεταλλικά ή πολυμεταλλικά συστήματα). Τα στελέχη του οργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν συχνά δεν αναφέρονται στη πηγή. Η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε ήταν είτε στη φυσική της κατάσταση (όπου δεν αναγράφεται) είτε έχοντας υποστεί κάποια φυσική, χημική ή γενετική μεταχείριση. Οι πειραματικές παράμετροι δηλώνουν τις τιμές αυτών που εξετάστηκαν χωρίς να αναφέρονται οι βέλτιστες τιμές αυτών. C_0 (mg · L ⁻¹ /me): Οι αρχικές στο διάλυμα συγκεντρώσεις του μετάλλου που εξετάστηκαν. Οι μονάδες αναγράφονται όπου οι συγκεντρώσεις αυτές εκφράστηκαν με διαφορετικό τρόπο. q_{max} (mg/g): Η μέγιστη πειραματική ικανότητα δέσμευσης των μετάλλων, εκφρασμένη σε ποσότητα μετάλλου που δεσμεύτηκε στο χλωροφύκος ανά μονάδα ξηρής μάζας. Οι τιμές της αναφέρονται σε ένα βέλτιστο pH, θερμοκρασία και συγκέντρωση μετάλλου όπου εδώ δεν αναγράφονται. n.g.: not given. Αναφέρεται σε δεδομένα που είτε δεν αναγράφονται είτε εμφανίζονται εντός γραφημάτων στην πηγή.....	8
Πίνακας 2. Τοξικότητα μετάλλων και μεταλλοειδών στον <i>Chlamydomonas</i> : Μια περίληψη των προηγούμενων μελετών (Hanikenne et al., 2009).	11
Πίνακας 3. Πρόσληψη μετάλλων μέσω βιορρόφησης από μικροβιακή βιομάζα (Volesky and Holan, 1995).....	17
Πίνακας 4. Βέλτιστο pH για τη δέσμευση μετάλλων από διάφορα φύκη (Wilde and Benemann, 1993).	24
Πίνακας 5. Σύγκριση της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης (Eccles, 1999, Kadukova and Vircikova, 2005, Lo et al., 2014, Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).....	36
Πίνακας 6. Επικρατούσες συνθήκες συντήρησης των κυττάρων του οργανισμού.....	39
Πίνακας 7. Σύνθεση υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας [Tris – Acetate – Phosphate (TAP) culture medium], (Gorman and Levine, 1965).....	39
Πίνακας 8. Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . 42	

Πίνακας 9. Ενώσεις και συγκεντρώσεις των προστιθέμενων βαρέων μετάλλων στις υγρές καλλιέργειες του οργανισμού <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	45
Πίνακας 10. Σύνθεση διαλύματος Phosphate – buffered saline (PBS), (2006).	50
Πίνακας 11. Προετοιμασία δειγμάτων προς μέτρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.	51
Πίνακας 12. Λειτουργικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του Cu χρησιμοποιώντας Perkin – Elmer 2100 φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης.	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βαρέα μέταλλα θεωρούνται ιδιαίτερα επικίνδυνοι χημικοί ρυπαντές. Η παρουσία τους σε ρυπασμένες περιοχές (εδαφικές ή/ και υδάτινες) έχει επιφέρει περιβαλλοντικές ανησυχίες καθώς προκαλούν τοξικότητες στη χλωρίδα και την πανίδα ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μια ευρεία ποικιλία διαφόρων ειδών μικροφυκών έχει εξεταστεί ως προς την ικανότητα δέσμευσης και απομάκρυνσης των συγκεκριμένων ρυπαντών. Στη παρούσα εργασία, εργαστηριακές μελέτες διεξήχθησαν προκειμένου να προσδιοριστούν οι επιδράσεις διαφόρων συγκεντρώσεων (0 – 2,0 mM) των Cu, Zn, Ni και As στο χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (εργαστηριακά στελέχη) μετά από 72 ώρες έκθεσης του. Η τοξικότητα των εν λόγω βαρέων μετάλλων εξετάστηκε μέσω της μελέτης της ανάπτυξης και βιωσιμότητας των κυττάρων των καλλιεργειών, του ποσοτικού προσδιορισμού των χλωροφυλλών α και β καθώς και των πρωτεϊνών των κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μέταλλα Cu και Ni είχαν τη μεγαλύτερη δυσμενή επίδραση στο εν λόγω χλωροφύκος. Με παρόμοιο τρόπο επέδρασαν ο Zn και το As καθώς επηρέασαν επίσης αρνητικά τις επιλεγμένες παραμέτρους αλλά σε μικρότερο βαθμό. Σε κάποιες περιπτώσεις, κυρίως το Zn και το As επέφεραν αύξηση της επιλεγμένης παραμέτρου σε σχέση με το μάρτυρα [όπως χλωροφύλλες (α+β) και πρωτεΐνες]. **Όσον αφορά την απομάκρυνση του Cu από το υδατικό διάλυμα, το μικροφύκος, έδειξε ικανότητα δέσμευσης του μετάλλου.** Η ποσότητα του δεσμευμένου Cu με τη διαδικασία της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης αυξήθηκε με το πέρασμα του χρόνου φτάνοντας τις μέγιστες τιμές στο τέλος της τοξικής φάσης. Παρόλα αυτά ήταν δύσκολη η ποσοτική διάκριση μεταξύ προσροφημένου και βιοσυσσωρευμένου Cu στα κύτταρα.

Λέξεις κλειδιά: *Chlamydomonas reinhardtii*, τοξικότητα, βαρέα μέταλλα, βιορρόφηση, βιοσυσσώρευση

ABSTRACT

Heavy metals are considered to be particularly dangerous pollutants. Their presence in polluted areas (soil or /and water) has brought about environmental concerns since they cause toxicities in the flora and fauna, even at low concentrations. A large variety of different species of microalgae has been examined for their ability to bind and remove these specific pollutants. In the present dissertation, laboratory studies were conducted to determine the effects of different concentrations (0 – 2,0 mM) of Cu, Zn, Ni and As on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* after its exposure for 72 h in the aforementioned heavy metals. The toxicity of these heavy metals was examined by studying the growth and viability of the cell cultures and by quantitatively estimating changes in chlorophylls a, b and total proteins. The results showed that the Cu and Ni had the greatest adverse effect on the green alga. In a similar manner, Zn and As affected also negatively the selected parameters, but to a lesser extent than the former metals. In some cases, it was observed that the presence of Zn and As showed to increase selected parameters [such as chlorophyll (a+b) and total protein content] in comparison to control cultures. **Regarding the removal of Cu from the aqueous solution, the microalga showed ability to bind the metal.** The amount of bound Cu through the process of biosorption and bioaccumulation increased over time, reaching the maximum values at the end of the toxic phase. Nevertheless, it was difficult to quantitatively distinguish between biosorpted and bioaccumulated Cu in the cells.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, toxicity, heavy metals, biosorption, bioaccumulation

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

Στα κύρια παγκόσμια ζητήματα του 21^{ου} αιώνα περιλαμβάνονται η ταχεία αύξηση του πληθυσμού, η επισιτιστική ανασφάλεια, η έλλειψη νερού και οι αυξανόμενες εκπομπές των θερμοκηπικών αερίων (Greenhouse gases – GHGs). Η κακή διαχείριση του εδάφους και των υδάτινων πόρων δεν συμβάλλουν μόνο στη κλιμάκωση της παγκόσμιας φτώχιας αλλά θέτουν σε κίνδυνο τα οικοσυστήματα με σημαντικό κόστος για το περιβάλλον (Obade et al., 2013).

Ως άμεσο αποτέλεσμα της εκβιομηχάνισης, της αστικοποίησης, την ανάπτυξη των μεγαλουπόλεων και της εντατικοποίησης της γεωργίας, τεράστιες ποσότητες ρύπων έχουν απορριφθεί σε υδάτινους αποδέκτες (Abu-Zeid, 1998). Εκατομμύρια άνθρωποι εκτίθενται σε επικίνδυνα επίπεδα βιολογικών ουσιών και χημικών ρύπων στο πόσιμο νερό που οφείλονται στην ανεπαρκή διαχείριση των αστικών, βιομηχανικών και γεωργικών αποβλήτων (World Health Organization, 2013). Η διαχείριση των αποβλήτων και τα μέτρα ελέγχου της ρύπανσης έχουν καθυστερήσει σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα τη ταχεία επιδείνωση της ποιότητας των περισσότερων επιφανειακών και των υπόγειων πόρων γλυκού νερού στον κόσμο. Οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον είναι ανυπολόγιστες (Abu-Zeid, 1998).

Η σύγχρονη βιομηχανία ευθύνεται κατά ένα μεγάλο βαθμό για την ρύπανση του περιβάλλοντος. Ανάμεσα στις τοξικές ουσίες που φτάνουν σε επικίνδυνα υψηλά επίπεδα είναι και τα βαρέα μέταλλα. Τα μεταλλικά είδη που κινητοποιούνται και απελευθερώνονται στο περιβάλλον από τις τεχνολογικές δραστηριότητες, τείνουν να παραμένουν επ' αόριστον, να κυκλοφορούν και τελικά να συσσωρεύονται στη τροφική αλυσίδα, θέτοντας έτσι σοβαρή απειλή για το περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο. Καθώς η κοινωνία αντιλαμβάνεται τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις αυτών των τοξικών ουσιών και την αναγκαιότητα της ανακύκλωσης και διατήρησης των βασικών μετάλλων, ολοένα και πιο επιτακτική γίνεται η ανάγκη για αναζήτηση μεθόδων απομάκρυνσης τους οι οποίες θα είναι υψηλότερης απόδοσης και ταυτόχρονα πιο ελκυστικές οικονομικά (Najja et al., 2009, Volesky and Holan, 1995).

Οι περιβαλλοντικές απαιτήσεις έχουν λάβει έντονη έμφαση στις δημόσιες πολιτικές των εθνών ανά το κόσμο κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτό έγκειται ως αποτέλεσμα των εξωτερικών πιέσεων από διαφορετικούς τομείς, όπως τα μέσα μαζικής ενημέρωσης, τις επιστημονικές έρευνες καθώς και τη μεγαλύτερη συνειδητότητα της κοινωνίας των πολιτών σχετικά με τα περιβαλλοντικά ζητήματα (Oliveira et al., 2011). Οι επιδεινούμενες τοξικές επιδράσεις των βαρέων

μετάλλων στο περιβάλλον αρχίζουν πλέον να αναγνωρίζονται και οι επιπτώσεις τους να γίνονται καλύτερα κατανοητές. Λόγω του χαρακτηρισμού τους ως τοξικές ουσίες, απαιτούν ειδικό χειρισμό, μεθόδους και χώρους διάθεσης. Ο χειρισμός και η διάθεσή τους, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρακολουθείται στενά από τις κυβερνήσεις (Volesky, 2001).

Στο παρελθόν, οι ωκεανοί θεωρούνταν ως μια τεράστια δεξαμενή ασφαλούς διάθεσης των ρύπων. Πλέον αναγνωρίζεται ότι τα βαρέα μέταλλα έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον των ωκεανών, ακόμα και όταν απελευθερώνονται σε χαμηλά επίπεδα (Torres et al., 2008). Η ποιότητα του νερού, είτε χρησιμοποιείται για πόση, για οικιακή χρήση, στην παραγωγή τροφίμων είτε για ψυχαγωγικούς σκοπούς, έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία. Νερό κακής ποιότητας μπορεί να προκαλέσει ξεσπάσματα νόσων. Πρωτοβουλίες για τη διαχείριση της ασφάλειας του νερού δεν υποστηρίζουν μόνο τη δημόσια υγεία, αλλά συχνά προωθούν την κοινωνικό – οικονομική ανάπτυξη και την ευημερία (World Health Organization, 2013).

Η διαχείριση των υδάτινων οικοσυστημάτων απαιτεί την κατανόηση των δεσμών μεταξύ των ιδιοτήτων του οικοσυστήματος και τον τρόπο με τον οποίο οι ανθρώπινες δραστηριότητες μπορούν να μεταβάλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των φυσικών, χημικών και βιολογικών παραμέτρων που οδηγούν στη λειτουργία των οικοσυστημάτων (Carr et al., 2008).

1.2. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΟΡΟΥ “ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ”

Κατά τη διάρκεια των 2 τελευταίων δεκαετιών, ο όρος “βαρέα μέταλλα” χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε διάφορες δημοσιεύσεις και τη νομοθεσία που σχετίζονται με τους χημικούς κινδύνους και την ασφαλή χρήση των χημικών ουσιών. Ο όρος αυτός δίνεται ως ονομασία μιας ομάδας μετάλλων και μεταλλοειδών που σχετίζονται με το δυναμικό τοξικότητας ή οικοτοξικότητας (Duffus, 2002). Παρ’ όλα αυτά, ο όρος “βαρέα μέταλλα” τις περισσότερες φορές, χρησιμοποιείται με ασυνέπεια και αυτό έχει οδηγήσει σε σύγχυση σχετικά με τη σημασία του (Batley, 2012, Charman, 2012). Επίσης, υπάρχει μια γενική τάση, τα “βαρέα μέταλλα” να θεωρούνται ως στοιχεία με εξαιρετικά τοξικές ή οικοτοξικές ιδιότητες. Είναι λοιπόν αναγκαίο να επανεξεταστεί η χρήση του όρου αυτού, προτού χρησιμοποιηθεί, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στη σχέση του με τις θεμελιώδεις έννοιες της Χημείας (Duffus, 2002).

Σύμφωνα με το θεμελιώδες έγγραφο αναθεώρησης του Duffus (2002), το οποίο δημοσιεύτηκε από τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC), υπάρχει μια πλειάδα από διαφορετικούς ορισμούς που αφορούν τα “βαρέα μέταλλα”, εκ των οποίων πολλοί είναι μεταξύ τους αντιφατικοί (Hodson, 2004). Για παράδειγμα, σε 13 διαφορετικές αναφορές γίνεται λόγος για μέταλλα όπου το χαμηλότερο όριο πυκνότητας που τα κατατάσσει σε “βαρέα μέταλλα” κυμαίνεται μεταξύ $3,5 - 7 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Ωστόσο, το κατώτερο αυτό όριο έχει αλλάξει από πολλούς συγγραφείς, με αποτέλεσμα

να είναι αδύνατη η κατάληξη σε κοινή συναίνεση (Arpenroth, 2010b). Επίσης τα φυτά δεν έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται την πυκνότητα ενός μετάλλου (Arpenroth, 2010a). Ως συνέπεια όλων των παραπάνω, οποιαδήποτε ιδέα περί ορισμού των “βαρέων μετάλλων” με βάση την πυκνότητα έπρεπε να εγκαταλειφθεί (Duffus, 2002). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το έγγραφο αναθεώρησης του Duffus αντιπροσωπεύει μια χημική άποψη η οποία συχνά δεν λαμβάνεται υπόψη από τον τομέα έρευνας των βιοεπιστημών (Arpenroth, 2010a).

Οι ορισμοί που έχουν διατυπωθεί βάσει ατομικού βάρους και ατομικού αριθμού και οι οποίοι προσεγγίζουν περισσότερο τον περιοδικό πίνακα, φαίνονται επιστημονικά πιο κατατοπιστικοί όσον αφορά τη χημική ταξινόμηση των στοιχείων αυτών. Και πάλι όμως δεν υπήρχε μια ξεκάθαρη βάση του ορισμού (Duffus, 2002).

Παρά το γεγονός ότι τα μεταλλικά στοιχεία έχουν ορισμένες κοινές ιδιότητες, το καθένα είναι ένα ξεχωριστό στοιχείο με τα δικά του φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν τις τοξικές και βιολογικές ιδιότητες καθώς και την κινητικότητα του μέσα στο περιβάλλον (Cornelis and Nordberg, 2007, Duffus, 2002). Επιπλέον, το καθένα μπορεί να αποτελεί μέρος ενός ευρέος φάσματος ενώσεων με ιδιότητες εντελώς διαφορετικές όπως συμβαίνει με τις ενώσεις του C. Έτσι η τάση συγκέντρωσης και ομαδοποίησης ορισμένων μετάλλων και των ενώσεων τους για την εκτίμηση της τοξικότητας υπό το τίτλο “βαρέα μέταλλα” οδηγεί σε ασάφεια και είναι ένας ακόμη λόγος για να εγκαταλειφτεί ο όρος αυτός (Duffus, 2002).

Ο Lewis (1923) ανέπτυξε μια εναλλακτική ταξινόμηση η οποία εξελίχθηκε περαιτέρω από διάφορους συγγραφείς όπως τους Nieboer και Richardson (1980), (Hodson, 2004). Η αλληλεπίδραση των μεταλλικών στοιχείων με τα έμβια συστήματα κυριαρχείται από τις ιδιότητες των μεταλλικών ιόντων ως οξέων κατά Lewis (Duffus, 2002). Οποιοδήποτε θετικά φορτισμένο ιόν είναι σε θέση να δεχτεί ηλεκτρόνια, συμπεριφερόμενο ως οξύ κατά Lewis (Arpenroth, 2010a, Duffus, 2002). Οποιαδήποτε πρακτική κατάταξης των μετάλλων θα πρέπει να περιλαμβάνει την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των μεταλλικών ιόντων ως αποδέκτες ηλεκτρονίων δεδομένου ότι αυτό καθορίζει τις δυνατότητες σχηματισμού συμπλόκων (Duffus, 2002).

Όσον αφορά το τομέα των βιοεπιστημών, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα “βαρέα μέταλλα” δεν είναι απαραίτητα τοξικά. Οι επιδράσεις οποιασδήποτε ουσίας στα έμβια συστήματα είναι πάντα αποτέλεσμα της διαθέσιμης συγκέντρωσής της στα κύτταρα. Έτσι, δεν υπάρχουν ουσίες που να θεωρούνται πάντα τοξικές. Επομένως, αυτό που χρειάζεται για την αξιολόγηση της τοξικότητας μιας ουσίας είναι δεδομένα δόσης – απόκρισης (όπως ποσοτικές σχέσεις δόσης – απόκρισης), (Arpenroth, 2010a, Arpenroth, 2010b). Η σχέση αυτή είναι μια σχέση μεταξύ της δόσης και της συχνότητας μιας καθορισμένης βιολογικής επίπτωσης σε ένα εκτεθειμένο πληθυσμό (Moffett et al., 2007).

Επίσης πολλά μεταλλικά ιόντα είναι ζωτικής σημασίας, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, για το μεταβολισμό των κυττάρων ενώ είναι τοξικά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Τα στοιχεία αυτών των μετάλλων ονομάζονται μικροθρεπτικά συστατικά ή ιχνοστοιχεία και παίζουν σημαντικό ρόλο στις

βασικές λειτουργίες των φυτικών κυττάρων. Μόνο όταν η εσωτερική συγκέντρωση αυτών υπερβεί ένα ανώτατο όριο, ασκούν τοξική δράση (Arpennroth, 2010a, Arpennroth, 2010b). Για το λόγο αυτό, όπως προαναφέρθηκε, ο όρος “βαρέα μέταλλα” δεν έχει οριστεί ποτέ από κανέναν επίσημο οργανισμό (όπως τη IUPAC), (Duffus, 2002). Είναι προφανές λοιπόν, ότι έχει αποδοθεί κακώς και είναι προτιμότερο να αποφεύγεται. Παρόλα αυτά, δεδομένου της μεγάλης συχνότητας που χρησιμοποιείται στις βιοεπιστήμες, φαίνεται μάταιο να αναμένεται να εγκαταλειφτεί ξαφνικά. Ο όρος “βαρύ μέταλλο” θα πρέπει να σχετίζεται με τη θέση του μετάλλου στον περιοδικό πίνακα επειδή η θέση αυτή συνδέεται με τις χημικές ιδιότητες των ενώσεων που περιλαμβάνουν το μέταλλο (Arpennroth, 2010a).

Η κατανόηση της βιοδιαθεσιμότητας είναι το κλειδί για την εκτίμηση της πιθανής τοξικότητας των μεταλλικών στοιχείων και των ενώσεών τους (Duffus, 2002). Ο όρος βιοδιαθέσιμος αναφέρεται στο κλάσμα της συνολικής ποσότητας μετάλλου που μπορεί να παραλαμβάνεται από έναν οργανισμό (Bjerrregaard and Andersen, 2007). Αν ένα μέταλλο, εν όλω ή εν μέρει απομακρύνεται, τότε μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ή πλήρη εξαφάνιση των τοξικών επιδράσεων του (Gadd and Griffiths, 1977). Η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται από τις βιολογικές παραμέτρους και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μεταλλικών στοιχείων, τα ιόντα τους και τις ενώσεις τους. Αυτά με τη σειρά τους εξαρτώνται από την ατομική δομή των μεταλλικών στοιχείων, τα οποία συστηματικά περιγράφονται από τον περιοδικό πίνακα (Duffus, 2002).

Επειδή ο όρος “βαρέα μέταλλα” είναι ευρέως χρησιμοποιούμενος στη βιβλιογραφία και από τη μεγάλη πλειοψηφία των βιοεπιστημόνων, υιοθετήθηκε και στην παρούσα διατριβή παρ’ όλες τις παραπάνω σημαντικές αιτιολογήσεις για το λανθασμένο του όρου.

1.3. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Ο έλεγχος της απόρριψης και απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων από τα υδατικά διαλύματα έχει γίνει μια πρόκληση του 21^{ου} αιώνα (Volesky, 2001). Λόγω της τοξικότητάς τους σε ανώτερες μορφές ζωής, τα ιόντα βαρέων μετάλλων σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα αποτελούν ρυπαντές μείζονος προτεραιότητας στο περιβάλλον (Atkinson et al., 1998).

Φυσικοχημικές μέθοδοι όπως ιονανταλλαγή, χημική καταβύθιση, αντίστροφη ώσμωση ηλεκτροδιάλυση κ.ά., έχουν προταθεί και εφαρμοστεί για την απομάκρυνση των μεταλλικών ιόντων από τα λύματα. Παρόλα αυτά, αυτές οι μέθοδοι είναι εμπορικώς μη πρακτικές είτε λόγω υψηλού λειτουργικού κόστους είτε λόγω δυσκολίας στην αντιμετώπιση των στερεών αποβλήτων που παράγονται (Gavrilescu, 2004). Επίσης καθίστανται μη αποτελεσματικές σε συγκεντρώσεις μετάλλων μεταξύ 10 – 100 mg · L⁻¹ (Abbas et al., 2014, Sun et al., 2012).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν νέες αποτελεσματικές μέθοδοι αποκλεισμού των μετάλλων από αραιά διαλύματα (1 – 100 mg/L), μείωσης των βαρέων

μεταλλικών ιόντων σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις και σε προσιτό κόστος (Gavrilescu, 2004, Wilde and Benemann, 1993).

1.3.1. Η τεχνολογία της φυκοαποκατάστασης

Τις 2 τελευταίες δεκαετίες, παρατηρείται ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις βιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στην απορρύπανση του περιβάλλοντος από τα βαρέα μέταλλα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι αυτές οι τεχνολογίες έχουν ένα πλήθος πλεονεκτημάτων έναντι των διαθέσιμων φυσικοχημικών τεχνικών που αφορούν την αποκατάσταση των ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα, περιοχών (Karlan, 2007). Σε αυτές περιλαμβάνονται η χρήση φυσικώς απαντώμενων, άφθονων και ανανεώσιμων βιοϋλικών τα οποία μπορούν να παραχθούν φθηνά, με πλεονεκτήματα τη μικρότερη ανάγκη για επιπρόσθετα αντιδραστήρια που αυξάνουν το κόστος της διαδικασίας και δημιουργούν προβλήματα διάθεσης και χώρου, και τα χαμηλά λειτουργικά έξοδα (Wilde and Benemann, 1993).

Μέχρι σήμερα έχει εξεταστεί το δυναμικό ενός πλήθους οργανισμών (χερσαία φυτά, μακροφύκη, μικροφύκη, βακτήρια, μύκητες κ.ά.) καθώς και η νεκρή μάζα που προέρχεται από αυτούς, για την δυνατότητα εξάλειψης και βιοαποκατάστασης του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα (Karlan, 2007, Perales-Vela et al., 2006).

Ως επί των πλείστον, βιοαποκατάσταση (bioremediation) ορίζεται η χρήση μικροοργανισμών για τη μείωση, την εξάλειψη ή τη μετατροπή ξενοβιοτικών και / ή τοξικών ουσιών που υπάρχουν στο έδαφος, το νερό και τον αέρα, με στόχο τη μετατροπή ρυπασμένων υλικών/ περιοχών σε βιολογικά ευδόκιμα. Σε μερικές περιπτώσεις περιλαμβάνει και τη χρήση φυτών που εφαρμόζονται άμεσα (φυτοαποκατάσταση / phytoremediation) ή ως υποστήριξη αποικισμού μικροβίων (Gavrilescu, 2004, Koenigsberg et al., 2005). Η βιοαποκατάσταση θεωρείται μια αρκετά ασφαλής και χρήσιμη τεχνολογία καθώς βασίζεται σε οργανισμούς που εμφανίζονται φυσικά στο περιβάλλον. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα χωρίς να προκαλείται κάποια διαταραχή των ανθρώπινων δραστηριοτήτων ή σοβαρή απειλή για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (Bhatnagar, 2013).

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη βιοαποκατάσταση μπορούν να είναι είτε γηγενείς στην ρυπασμένη περιοχή είτε να έχουν απομονωθεί και να μεταφερθεί στο ρυπασμένο χώρο. Μπορούν να απομονωθούν σχεδόν από οποιοσδήποτε περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι οργανισμοί αυτοί, ανάλογα με την περιβαλλοντική τους προσαρμοστικότητα, μπορούν να αναπτυχθούν σε ανάλογα βεβαρημένα περιβάλλοντα και συνθήκες (π.χ. θερμοκρασίες υπό το μηδέν καθώς και σε υπερβολική ζέστη, σε συνθήκες ερήμου, στο νερό, σε περίσσεια O₂ και σε αναερόβιες συνθήκες) και υπό τη παρουσία επικίνδυνων συστατικών ή σε κάθε ρεύμα αποβλήτων (Kumar et al., 2011).

Ο όρος φυκοαποκατάσταση (phycoremediation) χρησιμοποιείται για να δηλώσει τη χρήση των μακροφυκών και μικροφυκών που αφορά την απομάκρυνση ή το βιομετασχηματισμό των ρύπων συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών και ξενοβιοτικών ουσιών από τα λύματα και του CO₂ από τον αέρα (Bhatnagar, 2013, Hanumantha et al., 2011). Πολυάριθμα είδη φυκών, είναι ικανά να απομονώνουν σημαντικές ποσότητες θρεπτικών ή τοξικών ιόντων μετάλλων από τα υδατικά διαλύματα. Η διαδικασία απομόνωσης μετάλλων με τη χρήση φυκών λαμβάνει χώρα με διάφορους μηχανισμούς, ανάλογα με τα φύκη, τα είδη μεταλλικών ιόντων, τις συνθήκες του διαλύματος, και το αν τα κύτταρα των φυκών είναι ζωντανά ή νεκρά (González-Dávila, 1995). Επίσης το μέσο καλλιέργειας των φυκών στο οποίο αναπτύσσονται καθώς και η ηλικία ή το στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας φαίνονται να είναι επίσης πολύ σημαντικοί παράγοντες στη δεσμευτική ικανότητα των φυκών έναντι των μετάλλων (Wilde and Benemann, 1993).

Όσον αφορά τα οικονομικά ζητήματα της φυκοαποκατάστασης, είναι ακόμα πολύ θεωρητικά λόγω των αβεβαιοτήτων και των ραγδαίων εξελίξεων που σημειώνονται σε αυτό το σχετικά νέο πεδίο έρευνας. Πέραν μικρών εξαιρέσεων, τα συστήματα που έχουν ως τώρα περιγραφεί είναι εργαστηριακά και δεν έχουν λάβει πλήρη αξιολόγηση υπό πραγματικές συνθήκες. Αυτό αποτελεί το σημαντικότερο περιορισμό στο πεδίο αυτό. Η μεγάλης κλίμακας παραγωγή μικροφυκών θα μπορούσε να μειώσει το κόστος (Wilde and Benemann, 1993).

Αν και η διάθεση των αποβλήτων μπορεί να είναι η πιο σημαντική πτυχή της διαδικασίας της βιοαποκατάστασης καθώς και κάθε διαδικασίας επεξεργασίας αποβλήτων, αυτό το θέμα ουσιαστικά αγνοείται στη βιβλιογραφία η οποία περιγράφει την βιολογική απομάκρυνση των μετάλλων από τα υγρά απόβλητα. Υπάρχουν πολλά προβλήματα με τη διάθεση της ρυπασμένης με μέταλλα λυματολάσπης και θα πρέπει να αναπτυχθούν περιβαλλοντικά πιο αποδεκτές μέθοδοι (Wilde and Benemann, 1993).

1.3.2. Μικροφύκη

Ο όρος 'μικροφύκη' αναφέρεται σε υδρόβια, μικροσκοπικά φυτά (οργανισμοί με χλωροφύλλη α και θαλλό που δεν διαφοροποιείται σε ρίζα, βλαστό και φύλλα) και στα κυανοβακτήρια (οξυγονικά φωτοσυνθετικά βακτήρια, γνωστά και ως *Cyanophyceae*). Ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν των χερσαίων φυτών αλλά λόγω της απλής κυτταρικής τους δομής και της ευκολότερης πρόσβασής τους σε CO₂ και θρεπτικά συστατικά, έχουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα στη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα (Priyadarshani et al., 2011).

Τα μικροφύκη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία των υδάτινων οικοσυστημάτων καθώς αποτελούν πηγή O₂ και το πρώτο επίπεδο της τροφικής αλυσίδας στα υδατικά συστήματα. Το υπόλοιπο των υδρόβιων ζώντων οργανισμών εξαρτάται αυστηρά από

τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των εν λόγω οργανισμών. Διαταραχές των πληθυσμών αυτών και μεταβολές της πρωτογενούς παραγωγής μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες για τις υπόλοιπες βιοκοινότητες (Campanella et al., 2001, Priyadarshani et al., 2011). Από άποψη βιομάζας και σε παγκόσμιο επίπεδο, τα μικροφύκη αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα πρωτογενών παραγωγών οργανισμών (Priyadarshani et al., 2011).

Τα μικροφύκη που υπάρχουν στους ωκεανούς και σε περιβάλλον γλυκού νερού είναι ταξινομικά ποικίλα και σημαντικά για την παγκόσμια οικολογία. Αυτά που αναπτύσσονται στους ωκεανούς, ζουν σε ένα περιβάλλον που καλύπτει σχεδόν το 70% του πλανήτη και είναι υπεύθυνα για το 32% τουλάχιστον της παγκόσμιας φωτοσύνθεσης (Priyadarshani et al., 2011).

Σήμερα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά μικροφύκη θεωρούνται σχετικοί δείκτες στον τομέα της περιβαλλοντικής παρακολούθησης και αξιολόγησης. Λόγω της ευκολίας καλλιέργειας τους και της ευαισθησίας τους σε έναν αριθμό ρύπων, χρησιμοποιούνται συχνά σε οικοτοξικολογικούς ελέγχους ρυπασμένων γλυκών και θαλάσσιων υδάτων. Σε δοκιμές τοξικότητας, διάφορες παράμετροι μπορούν να μετρηθούν για την αξιολόγηση των επιπτώσεων των τοξικών ουσιών σε μικροφύκη. Η ανάπτυξη και φωτοσυνθετική δραστηριότητα είναι οι πιο συχνές παράμετροι παρακολούθησης (Campanella et al., 2001).

Μέσα σε εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης και σε ένα ανταγωνιστικό περιβάλλον, τα μικροφύκη έχουν αναπτύξει τη δυνατότητα σύνθεσης ενός μεγάλου αριθμού πολυμερών που μπορούν να εκκαθαρίσουν μέταλλα ενδιαφέροντος, τα περισσότερα από τα οποία αποτελούν απαραίτητα μικροθρεπτικά συστατικά για τον μεταβολισμό των μικροφυκών. Στην πραγματικότητα οι μικροοργανισμοί που παράγουν αυτά τα πολυμερή υλικά, ρυθμίζουν την κατανομή των βαρέων μεταλλικών ιόντων στα φυσικά ύδατα και σε συνδυασμό με την εκθετική τους αύξηση υπό ιδανικές συνθήκες, θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς παράγοντες απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων στα ύδατα (Priyadarshani et al., 2011). Παρά το γεγονός ότι μπορεί αυθόρμητα να χρησιμεύσουν ως 'όχημα' για την εισαγωγή και μεταφορά των βαρέων μετάλλων κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας σε υψηλότερα τροφικά επίπεδα, η ικανότητά τους για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από ρυπασμένες υδάτινες τοποθεσίες μπορεί να είναι επωφελής σε βιοθεραπευτικές στρατηγικές (Monteiro et al., 2011).

1.3.3. Το γένος *Chlamydomonas*

Μέχρι σήμερα, αρκετά μικροφύκη έχουν μελετηθεί για την δυνατότητα τους να απομακρύνουν βαρέα μέταλλα από τα ύδατα. Το πράσινο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα. Στο **Πίνακα 1** παρουσιάζονται τα πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από μια σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση (1999 – σήμερα), που αφορά την ικανότητα του *Chlamydomonas reinhardtii* να δεσμεύει μέταλλα από υδατικά διαλύματα.

Πίνακας 1. Πειραματικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί πάνω στη δυνατότητα του χλωροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* να απομακρύνει μέταλλα (me) από υδατικά διαλύματα (μονομεταλλικά ή πολυμεταλλικά συστήματα). Τα στελέχη του οργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν συχνά δεν αναφέρονται στη πηγή. Η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε ήταν είτε στη φυσική της κατάσταση (όπου δεν αναγράφεται) είτε έχοντας υποστεί κάποια φυσική, χημική ή γενετική μεταχείριση. Οι πειραματικές παράμετροι δηλώνουν τις τιμές αυτών που εξετάστηκαν χωρίς να αναφέρονται οι βέλτιστες τιμές αυτών. C_0 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}/\text{me}$): Οι αρχικές στο διάλυμα συγκεντρώσεις του μετάλλου που εξετάστηκαν. Οι μονάδες αναγράφονται όπου οι συγκεντρώσεις αυτές εκφράστηκαν με διαφορετικό τρόπο. q_{\max} (mg/g): Η μέγιστη πειραματική ικανότητα δέσμευσης των μετάλλων, εκφρασμένη σε ποσότητα μετάλλου που δεσμεύτηκε στο χλωροφύκος ανά μονάδα ξηρής μάζας. Οι τιμές της αναφέρονται σε ένα βέλτιστο pH, θερμοκρασία και συγκέντρωση μετάλλου όπου εδώ δεν αναγράφονται. n.g.: not given. Αναφέρεται σε δεδομένα που είτε δεν αναγράφονται είτε εμφανίζονται εντός γραφημάτων στην πηγή.

Μέταλλο (me)	Βιομάζα	Πειραματικές παράμετροι			q_{\max} (mg/g)	Αναφορά
		pH	T (°C)	C_0 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}/\text{me}$)		
Cr(VI)	wild type	1 – 8	5 – 40	20 – 400	18,2	(Anica et al., 2005)
Cr(VI)	wild type (heated)	1 – 8	5 – 40	20 – 400	25,6	
Cr(VI)	wild type (acid – treated)	1 – 8	5 – 40	20 – 400	21,2	
Mn ²⁺ + Fe ²⁺ + Co ²⁺ + Ni ²⁺ + Cu ²⁺ + Zn ²⁺ + Cd ²⁺	wild type	n.g	25	0,01 – 0,1 mmol/L me ⁻¹	n.g	(Zhao et al., 2013)
Mn ²⁺ + Fe ²⁺ + Co ²⁺ + Ni ²⁺ + Cu ²⁺ + Zn ²⁺ + Cd ²⁺	wild type (boiling)	n.g	25	0,01 – 0,1 mmol/L · me ⁻¹	n.g	
Hg(II)	wild type	2 – 7	5 – 35	20 – 400	72,2	(Tüzün et al., 2005)
Cd(II)	wild type	2 – 7	5 – 35	20 – 400	42,6	
Pb(II)	wild type	2 – 7	5 – 35	20 – 400	96,3	
Hg(II) + Cd(II) + Pb(II)	wild type	n.g	25	100 mmol/L · me ⁻¹	36,7 [Hg(II)], 16,8 [Cd(II)], 61,5 [Pb(II)]	
Pb(II)	dried and sieved	1 – 7	30	0.33 mmol/L	1,47 mmol/g	(Kondo et al., 2013)
Fe(III)	dried and sieved	1 – 7	30	0.33 mmol/L	1,13 mmol/g	
Ni(II)	dried and sieved	1 – 7	30	0.33 mmol/L	0,870 mmol/g	
Fe(III) + Ni(II)	dried and sieved	1 – 4	30	0.33 mmol/L · me ⁻¹	n.g	
Hg(II)	wild type (immobilized)	3 – 7	5 – 40	25 – 500	106,6	(Bayramođ lu et al., 2006)

Πίνακας 1. (συνέχεια)

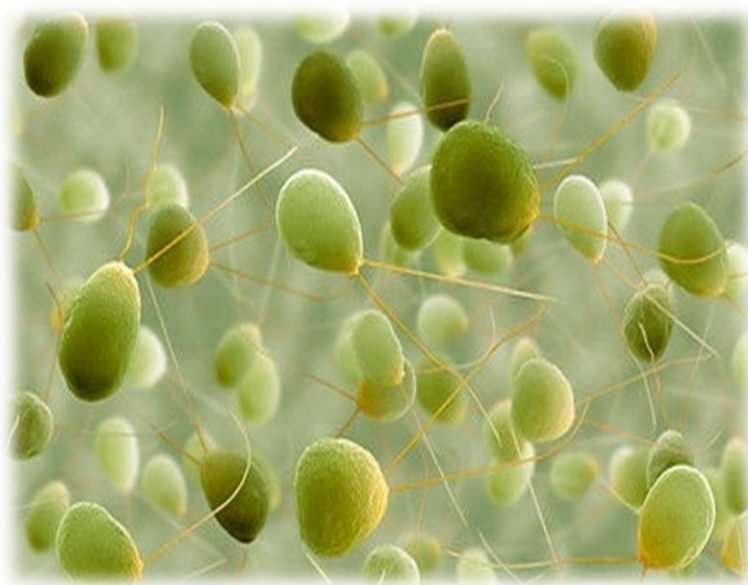
Μέταλλο (me)	Βιομάζα	Πειραματικές παράμετροι			q _{max} (mg/g)	Αναφορά
		pH	T (°C)	C ₀ (mg · L ⁻¹ /me)		
Cd(II)	wild type (immobilized)	3 – 7	5 – 40	25 – 500	79,7	(Bayramođ lu et al., 2006)
Pb(II)	wild type (immobilized)	3 – 7	5 – 40	25 – 500	380,7	
Cd(II)	wild type (CC – 425)	7	25	5 – 40 μM	79,6 μg/mg Chl	(Cai et al., 1999)
Cd(II)	transgenic (pMTCC-8)	7	25	5 – 40 μM	86,4 μg/mg Chl	
Cd(II)	wild type (lyophilized)	2 – 10	23	0.1 – 8.75 mM	145	(Adhiya et al., 2002)
Cu(II)	wild type (2137)	6	30	5 · 10 ⁻⁷ M	0,109	(Flouty and Estephane, 2012)
Cu(II)	wild type (2137) (lyophilized)	6	30	5 · 10 ⁻⁷ M	0,056	
Pb(II)	wild type (2137)	6	30	5 · 10 ⁻⁷ M	0,286	
Pb(II)	wild type (2137) (lyophilized)	6	30	5 · 10 ⁻⁷ M	0,057	
Cu(II) + Pb(II)	wild type (2137)	6	30	5 · 10 ⁻⁷ M · me ⁻¹ + 1 · 10 ⁻⁸ – 5 · 10 ⁻⁶ M · me ⁻¹	n.g	
Cu(II) + Pb(II)	wild type (2137)	6	30	5 · 10 ⁻⁷ M · me ⁻¹ + 1 · 10 ⁻⁸ – 5 · 10 ⁻⁶ M · me ⁻¹	n.g	
Al(III)	wild type (CPCC 11)	7	20	10,4 μM	83 ± 14 fg / cell	(Pitre et al., 2014)

Ο μικροοργανισμός αυτός έχει υπηρετήσει ως ένα χρήσιμο πειραματικό μοντέλο διότι μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα απλό, χημικά καθορισμένο μέσο με μια υψηλή κυτταρική πυκνότητα (Blaby-Haas and Merchant, 2012). Ο σύντομος χρόνος αναπαραγωγής του, οι απλές απαιτήσεις του για ανάπτυξη καθώς και η ικανότητά του να αναπτύσσεται στο σκοτάδι αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της υψηλής αξίας του οργανισμού αυτού (Rehnstam-Holm and Godhe, 2003).

Δεδομένου ότι διάφορα μοριακά και γενετικά εργαλεία είναι διαθέσιμα για τον οργανισμό αυτό, αρκετά γενετικά τροποποιημένα στελέχη μπορούν σχετικά εύκολα να δημιουργηθούν ή να είναι ήδη διαθέσιμα με αποτέλεσμα το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* να καταστεί ένας εξαιρετικά χρήσιμος οργανισμός για τη μελέτη διαφόρων προσαρμοστικών αντιδράσεων

(Mendez-Alvarez et al., 1999). Επίσης, για περισσότερο από 40 έτη ο οργανισμός αυτός έχει χρησιμοποιηθεί εντατικά για μελέτες ενός μεγάλου αριθμού φυσιολογικών διεργασιών όπως της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής, της αφομοίωσης του N, της κινητικότητας των μαστίγιων και της βασικής λειτουργίας του βασικοκυτταρικού σώματος. Είναι εύκολος στο χειρισμό και ο σύντομος κύκλος ζωής του, τον κάνουν ένα ισχυρό εργαλείο για γενετική ανάλυση (Hanikenne, 2003).

Το μικροφύκος αυτό είναι ένα είδος που αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα περιβάλλοντος. Σημεία συλλογής του γένους *Chlamydomonas* (**Εικόνα 1**) περιλαμβάνουν εύκρατες, τροπικές και πολικές περιοχές. Τα είδη του γένους αυτού έχουν απομονωθεί από λίμνες, λιμνάζοντα νερά αποχετεύσεων, θαλάσσια και υφάλμυρα νερά, χιόνι, δάση, ερήμους, βάλτους κ.ά. (Harris, 2009).

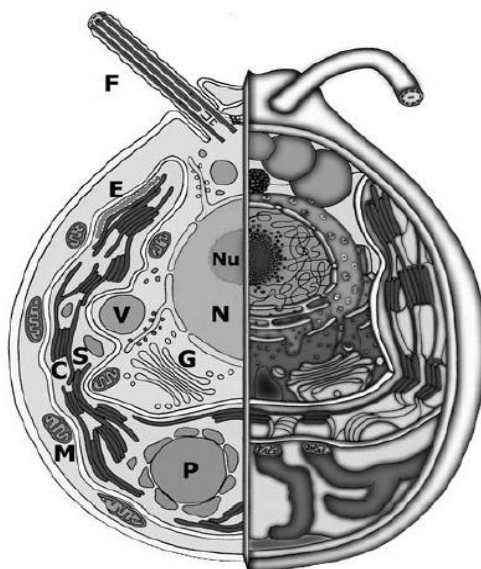


Εικόνα 1. Απεικόνιση του χλωροφύκου *Chlamydomonas* sp. Έγχρωμη μικρογραφία SEM (μεγέθυνση: x 680 σε μέγεθος 6 x 7cm), (Power and Syred, n.d).

Μορφολογικά, παρόλο που το σχήμα (ελλειψοειδές ή ωοειδές) και το μέγεθος των κυττάρων μεταξύ των ειδών του γένους *Chlamydomonas* ποικίλει, τα βασικά χαρακτηριστικά παραμένουν τα ίδια (**Εικόνα 2**): 2 εμπρόσθια και ισομήκη μαστίγια των οποίων τα σημεία διαχωρισμού από το κυτταρικό σώμα δεν είναι εμφανή, ένα στίγμα (για όλα τα είδη εκτός μερικών εξαιρέσεων), το κυτταρικό τοίχωμα, ένας κυπελλοειδής χλωροπλάστης που περιβάλλει ένα ή περισσότερα πυρηνοειδή (Harris, 2009).

Όπως και άλλοι οργανισμοί, έτσι και τα φυτά είναι σε θέση να διατηρούν την ομοίωση των βασικών μεταλλικών ιόντων σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (Hanikenne, 2003). Το κυτταρικό τοίχωμα του *Chlamydomonas* διαθέτει μια υψηλή συγγένεια με μεταλλικά κατιόντα και αποτελεί ένα σύστημα παθητικής προστασίας έναντι στη περίσσεια μετάλλων. Αρκετές μελέτες

έχουν δείξει επανειλημμένως ότι τα στελέχη με ανεπάρκεια κυτταρικού τοιχώματος είναι πιο ευαίσθητα σε μέταλλα όπως Cd, Cu, Ni και Co επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί το πρώτο φράγμα προστασίας των κυττάρων έναντι των βαρέων μετάλλων (Hanikenne, 2003, Hanikenne et al., 2009).



Εικόνα 2. Κυτταρική δομή του *Chlamydomonas reinhardtii*. N: πυρήνας, Nu: πυρηνίσκος, F: μαστίγια, C: κυπελλοειδής χλωροπλάστης, E: στίγμα, P: πυρηνοειδές, M: μιτοχόνδρια, G: golgi, S: κόκκοι αμύλου, V: χυμοτόπιο (Harris, 2009).

Η τοξικότητα των μετάλλων που βρίσκονται σε περίσσεια στον οργανισμό του *Chlamydomonas* έχει μελετηθεί εδώ και αρκετά χρόνια. Επειδή διαφορετικά μέσα έχουν χρησιμοποιηθεί και διαφορετικές παράμετροι έχουν μετρηθεί για την αξιολόγηση της τοξικότητας των μετάλλων, είναι δύσκολο να συναχθούν γενικά συμπεράσματα από αυτές τις αποσπασματικές και κυρίως περιγραφικές μελέτες. Ωστόσο στον **Πίνακα 2**, γίνεται μια προσπάθεια σύνοψης των ευρημάτων για τα As(V), As(III), Cd(II), Cu(II), Fe(II), Pb(II), Hg(II), Ni(II), Se(IV), Zn(II) και Tl(I). Τα περισσότερα από αυτά τα βαρέα μέταλλα, όταν υπάρχουν σε περίσσεια, επηρεάζουν την ανάπτυξη και τελικά τη βιωσιμότητα, ενώ ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εμφανίζεται ως πρωταρχικός στόχος τοξικότητας (Hanikenne et al., 2009).

Πίνακας 2. Τοξικότητα μετάλλων και μεταλλοειδών στον *Chlamydomonas*: Μια περίληψη των προηγούμενων μελετών (Hanikenne et al., 2009).

Χημικές ουσίες	Συγκεντρώσεις	Περιγραφόμενες επιδράσεις
Αρσενικό (As V)	125 – 500 μM	Αναστολή ανάπτυξης Μείωση φωτοσύνθεσης
Αρσενικό (As III)	4 mM	Μείωση φωτοσύνθεσης και αναπνοής

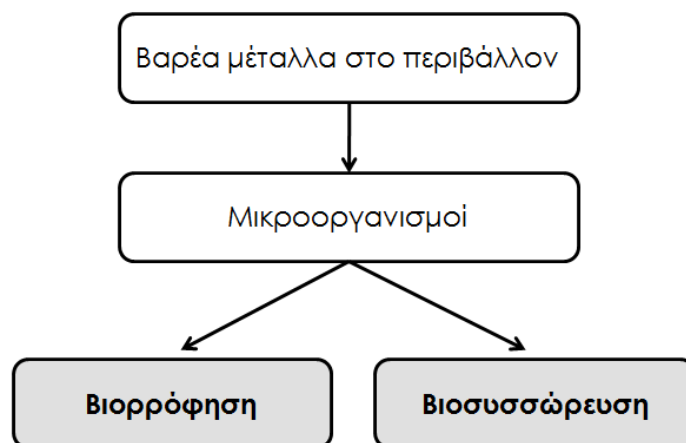
Πίνακας 2. (συνέχεια)

Χημικές ουσίες	Συγκεντρώσεις	Περιγραφόμενες επιδράσεις
Κάδμιο (Cd II)	100 – 300 μΜ	Αναστολή ανάπτυξης Μείωση της φωτοσύνθεσης και της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη
Χαλκός (Cu II)	80 – 300 μΜ	Αναστολή ανάπτυξης
	100 – 300 μΜ	Μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη
	2 – 30 μΜ	Μείωση φωτοσύνθεσης
	100 – 300 μΜ	Αναστολή αφομοίωσης νιτρικών
Σίδηρος (Fe II)	250 – 600 μΜ	Αναστολή ανάπτυξης και χλώρωση
Μόλυβδος (Pb II)	1 – 20 μΜ	Μείωση φωτοσύνθεσης Υπερδομικές αλλαγές (θυλακοειδή, μιτοχόνδρια, πυρήνας)
Νικέλιο (Ni II)	3 – 80 μΜ	Διέγερση της φωτοσύνθεσης
Υδράργυρος (Hg II)	1 – 25 μΜ	Μειωμένη ανάπτυξη και κινητικότητα
		Μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη
Σελήνιο (Se IV)	10 – 500 μΜ	Αναστολή ανάπτυξης Υπερδομικές αλλαγές (κυρίως στον χλωροπλάστη)
Ψευδάργυρος (Zn II)	100 – 300 μΜ	Αναστολή αφομοίωσης νιτρικών
	1,5 – 30 μΜ	Μείωση φωτοσύνθεσης
Θάλλιο (Tl II)	0,5 – 2,5 μΜ	Αναστολή ανάπτυξης
		Μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη

1.3.4. Βιορρόφηση

Φαίνεται να υπάρχουν 2 κύριοι τύποι πρόσληψης των βαρέων μετάλλων από τους οργανισμούς (**Εικόνα 3**). Ο πρώτος περιλαμβάνει την δέσμευση αυτών σε κυτταρικές επιφάνειες (βιορρόφηση / biosorption) ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει τη μεταβολικά – εξαρτώμενη ενδοκυτταρική πρόσληψη (βιοσυσσώρευση / bioaccumulation), (Gadd and Griffiths, 1977, Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).

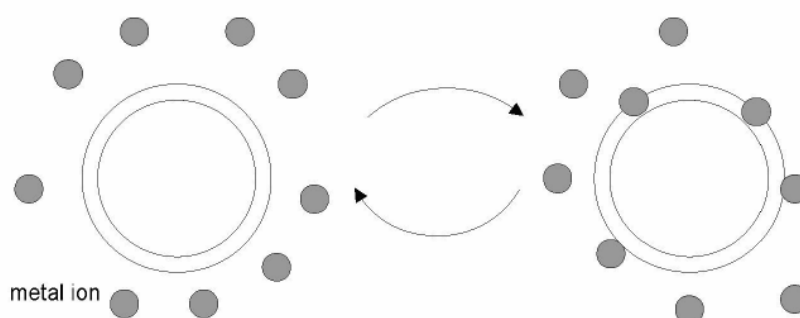
Ο όρος βιορρόφηση χρησιμοποιείται συχνά από διάφορους συγγραφείς ως μια ευρύτερη έννοια που αφορά τις διαδικασίες απομάκρυνσης διαφόρων ρυπαντικών ουσιών (όπως οργανικές, ανόργανες μορφές, αέρια) από υδατικά διαλύματα, με τη χρήση βιομάζας. Οι περισσότερες έρευνες βιορρόφησης έχουν επικεντρωθεί σε μέταλλα και συναφή στοιχεία. Έτσι αρκετοί συγγραφείς έχουν δώσει έμφαση σε αυτά, ορίζοντας ως βιορρόφηση την αφαίρεση ενός μετάλλου ή μεταλλοειδούς, με τη χρήση βιολογικού υλικού (Gadd, 2009).



Εικόνα 3. Βιολογικές μέθοδοι για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).

Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, η διαδικασία της βιορρόφησης αναφέρεται στην ικανότητα των βιολογικών υλικών να συσσωρεύουν βαρέα μέταλλα από τα λύματα είτε μέσω της μεσολάβησης μεταβολικών είτε μέσω φυσικό – χημικών οδών πρόσληψης (Ahalya et al., 2003, Gadd, 2009, Muñoz et al., 2006, Priyadarshani et al., 2011, Shanab et al., 2012). Ωστόσο σύμφωνα με τον Bohumil Volesky, ο οποίος είναι ο πρωτοπόρος σε αυτό το ερευνητικό πεδίο, η βιορρόφηση αποτελεί μια παθητική διαδικασία πρόσληψης μετάλλων και απομόνωσης σύμφωνα με την οποία το μέταλλο διαχωρίζεται με τις χημικές θέσεις που υπάρχουν φυσικά, ακόμα και όταν η βιομάζα είναι νεκρή (**Εικόνα 4**), (Arica et al., 2005, Lesmana et al., 2009, Naja et al., 2009, Oliveira et al., 2011, Volesky, 2001, Zhao et al., 2013). Η χρήση νεκρής βιομάζας προτιμάται δεδομένου ότι περιορίζει τα αποτελέσματα τοξικότητας των βαρέων μετάλλων (που μπορεί να συσσωρεύονται στην επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων ή στις κυτταρικές μεμβράνες) και την ανάγκη για παροχή θρεπτικών συστατικών (Oliveira et al., 2011).

Διεργασίες επιμετάλλωσης, εξόρυξης και επεξεργασίας μεταλλευμάτων, χυτήρια, και βυρσοδεψεία είναι μερικές από τις βιομηχανίες των οποίων τα απόβλητα έχουν υψηλές συγκεντρώσεις σε βαρέα μέταλλα και αποτελούν πρόβλημα. Η πιθανή εφαρμογή της βιορρόφησης φαίνεται να είναι τεράστια (Macek and Mackona, 2011).



Εικόνα 4. Βιορρόφηση μεταλλικών ιόντων (Chojnacka, 2009).

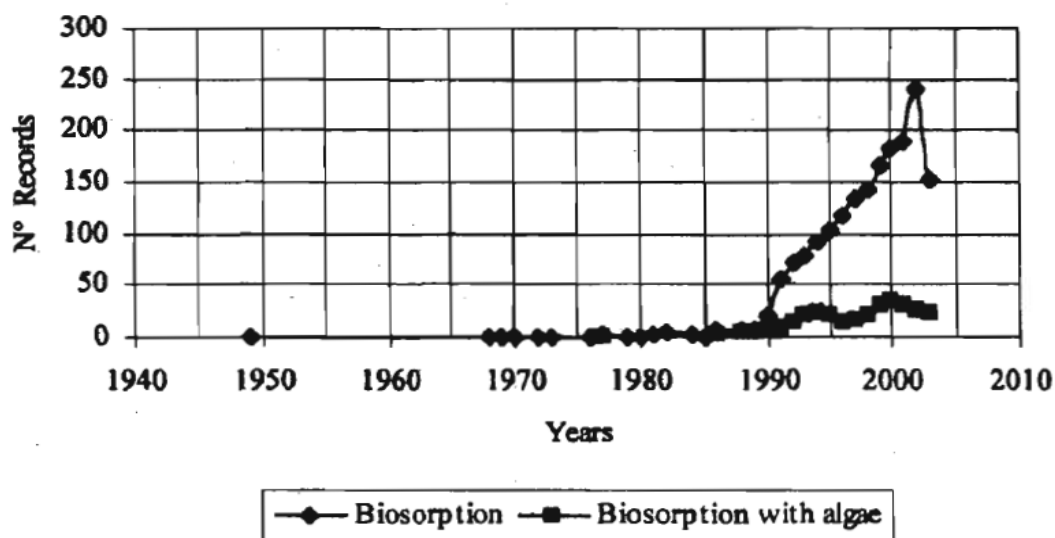
Τα αρχικά κίνητρα της ανάπτυξης της βιορρόφησης για βιομηχανικές διαδικασίες ήταν τα εξής (Oliveira et al., 2011, Rao and Prabhakar, 2011):

- Χαμηλό κόστος βιορροφητικών δεδομένου ότι συχνά είναι κατασκευασμένα από άφθονα ή άχρηστα υλικά
- Μεγάλη απόδοση μεταλλικής απομάκρυνσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις μετάλλων
- Δυνατότητα αναγέννησης βιορροφητικού και επαναχρησιμοποίησης του καθώς και αξιοποίησης του μετάλλου
- Περιορισμένη παραγωγή δευτερογενών καταλοίπων
- Φιλική προς το περιβάλλον

Η διαδικασία της βιορρόφησης των βαρέων μετάλλων από διάφορα είδη βιομάζας εμφανίζεται ως μια εναλλακτική και αρκετά αποδοτική λύση, για την αποκατάσταση των υδάτων που περιέχουν βαρέα μέταλλα (Kratochvil and Volesky, 1998). Επίσης, δύναται να αφορά μια διαδικασία μαζικής μεταφοράς με την οποία μια ουσία μεταφέρεται από την υγρή φάση στην επιφάνεια ενός στερεού και η ουσία δεσμεύεται με φυσικές ή / και χημικές αλληλεπιδράσεις (Macek and Mackona, 2011). Η εύκολη αναγέννηση των βιορροφητικών αυξάνει το οικονομικό όφελος της μεθόδου και καθιστά δυνατή την επαναχρησιμοποίηση τους σε πολλαπλούς κύκλους ρόφησης (Kratochvil and Volesky, 1998).

Όσον αφορά τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, η βιορρόφηση μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκει στις καθαρές τεχνολογίες. Είναι γνωστό ότι οι καθαρές τεχνολογίες και τα προϊόντα τους αποτελούν εργαλεία για την περιβαλλοντική βιωσιμότητα, καθώς για μια περιβαλλοντική πολιτική που σχετίζεται με την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης (Brinza et al., 2007). Η χρήση της βιομάζας μικροφυκών πλεονεκτεί σε σύγκριση με τη βιομάζα άλλων οργανισμών. Τα μικροφύκη ως αυτότροφοι οργανισμοί έχουν χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Επίσης σε αντίθεση με τους μύκητες και τα βακτήρια, τα μικροφύκη δεν παράγουν τοξικές ουσίες (Das et al., 2008).

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει δείξει ένα μεγάλο ενδιαφέρον για την τεχνική αυτή εν όψει των αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί. Παρόλο που υπάρχει μια ουσιώδης συλλογή δημοσιευμένης βιβλιογραφίας σχετικά με τη ρόφηση [προσρόφηση και συσσώρευση (Naja and Volesky, 2011)] μετάλλων από τα φύκη, ο αριθμός των δημοσιευμένων έργων με άλλους τύπους βιομάζας (κυρίως μύκητες και βακτήρια) είναι αρκετά μεγαλύτερος, κυρίως όσον αφορά τα πολυμεταλλικά συστήματα. Η αναζήτηση βιβλιογραφίας που πραγματοποιήθηκε το 2004 από τους Romero et al., η οποία παρήγαγε 2,057 αναφορές κατά τη πάροδο του χρόνου (**Εικόνα 5**) δείχνει ότι το αντικείμενο της βιορρόφησης είναι σχετικά καινούργιο και συνοδεύεται με μια εκθετική αύξηση του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας κατά τα τελευταία χρόνια.



Εικόνα 5. Βιβλιογραφικές αναφορές που έχουν δημοσιευτεί με τη πάροδο του χρόνου για τη βιορρόφηση (Romera et al., 2006).

Η περιοχή εντοπισμού του φαινομένου της βιορρόφησης αφορά στη διεπαφή μεταξύ του κυτοπλάσματος των κυττάρων και του φυσικού περιβάλλοντος όπου βρίσκεται το κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελεί τη πρώτη γραμμή άμυνας των μικροφυκών κατά της τοξικής δράσης των βαρέων μετάλλων (Rajamani et al., 2007). Όλα τα μεταλλικά ιόντα, προτού αποκτήσουν πρόσβαση στο κυτόπλασμα και τις κυτταρικές μεμβράνες, συναντούν το κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελεί μια καλά καθορισμένη πολυμερή μήτρα η οποία βρίσκεται ακριβώς εξωτερικά από τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου (Das et al., 2008, Tsezos et al., 2011).

Ποικίλες συνθέσεις των μικροβιακών κυτταρικών τοιχωμάτων έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις διαφορετικές ποσότητες προσροφημένων μεταλλικών ιόντων. Η επιφάνεια των μικροβιακών κυττάρων αποτελείται από μακρομόρια με ένα μεγάλο αριθμό φορτισμένων λειτουργικών ομάδων (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014). Το μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένο, κυρίως λόγω της παρουσίας καρβοξυλικών, φωσφορικών και άλλων ομάδων (Gaur and Rai, 2001). Τα κυτταρικά τοιχώματα των μικροφυκών αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λιπίδια που προσφέρουν διάφορες λειτουργικές ομάδες [όπως καρβοξυλικές ($-COOH$), υδροξυλικές ($-OH$), σουλφυδρυλικές ($-SH$) κ.ά], (Monteiro et al., 2012).

Σε αντίθεση προς τις διαδικασίες που συμβαίνουν στο κυρίως διάλυμα, η πλασματική μεμβράνη είναι βιολογικά δραστική και συχνά σε θέση να ελέγχει το μέγεθος των εισροών σύμφωνα με τις απαιτήσεις του οργανισμού. Λόγω της υδρόφοβης φύσης της βιολογικής μεμβράνης, μόνο ουδέτερα ή μη – πολικά μόρια διασχίζουν το κυτόπλασμα με παθητική διάχυση. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιβαλλοντικά σχετικών ειδών των μετάλλων είναι υδρόφιλα και η μεταφορά τους διαμέσου της βιολογικής μεμβράνης προκαλείται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Sunda and Huntsman, 1998, Worms et al., 2006).

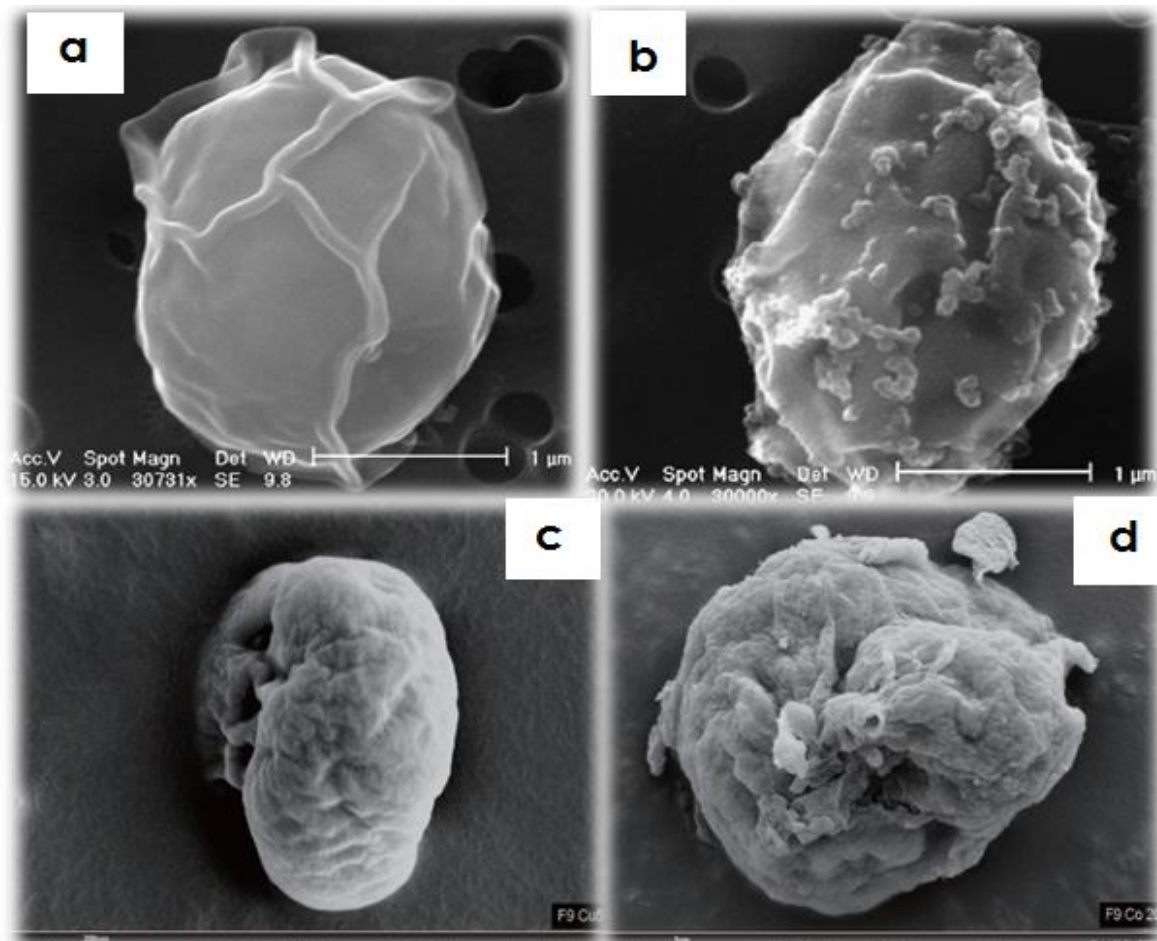
Η αρχική υπόθεση δήλωνε ότι όλα τα είδη βιομάζας έχουν παρόμοια σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος παρόλο που υπάρχουν αρκετές διαφορές ανάμεσα στα γένη. Ωστόσο, τα κυτταρικά τοιχώματα των φυκών είναι περισσότερο πολύπλοκα από αυτά των μυκήτων και των βακτηρίων, σε τέτοιο βαθμό που ακόμα και μεταξύ των φυκών, θα πρέπει να γίνεται διαφοροποίηση μεταξύ χλωροφυκών, φαιοφυκών και ροδοφυκών (Romera et al., 2006). Η χρήση του *Chlamydomonas reinhardtii* ως βιορροφητικό των βαρέων μετάλλων, δοκιμάστηκε από τους Tuzun et al., (2005). Στη μελέτη τους, βρήκαν ότι οι υπεύθυνες λειτουργικές ομάδες για τη βιορρόφηση στα κύτταρα του μικροφύκου ήταν αμινο – ομάδες, καρβοξυλικές, υδροξυλικές και ομάδες καρβονυλίου (González et al., 2011). Τα κυτταρικά τοιχώματα των μικροφυκών συνήθως παρουσιάζουν υψηλές ικανότητες δέσμευσης των βαρέων μετάλλων (0,1 g μέταλλου / g ξηρού βάρους) προστατεύοντας έτσι τη κυτταρική μεμβράνη από δυνητικά τοξικά επίπεδα μετάλλων (Rajamani et al., 2007). Οι διαφορές στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ διάφορων οργανισμών προκαλεί σημαντικές διαφορές στο τύπο και το ποσό των δεσμευόμενων σε αυτά, μεταλλικών ιόντων (Das et al., 2008).

Στην **Εικόνα 6** γίνεται αντιληπτό ότι τα βαρέα μέταλλα επηρεάζουν την εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων των φυκών, γεγονός που αποδεικνύει ότι αυτά συνδέονται με τις λειτουργικές ομάδες του κυτταρικού τοιχώματος (Wan Maznah et al., 2012). Στην **Εικόνα 6a, b** παρουσιάζεται το κύτταρο του μικροφύκου *Chlorella miniata* πριν και μετά τη φόρτωση με Cr(III). Το κύτταρο – μάρτυρας έχει παχύ σχήμα με ένα διαφανές εξωτερικό στρώμα στην απώτερη επιφάνεια του, το οποίο τσαλακώνεται μετά την μεταχείριση του με Cr(III), (Arief et al., 2008).

Η επίδραση των 20 mg/L Cu πάνω στα κύτταρα του *Chlamydomonas* sp. ήταν εμφανώς διαφορετική σε σχέση με αυτή των 5 mg/L Cu (**Εικόνα 6c, d**). Τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Cu είχαν συρρικνωθεί, διπλωθεί και αρχίσει να καταρρέουν. Η επιφάνεια των κυττάρων του *Chlamydomonas* sp. που εκτέθηκε σε 5 mg / L Cu ήταν λιγότερο διπλωμένη. Τα κύτταρα του μάρτυρα (εικόνα δεν δίνεται) ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος και δεν έδειξαν αναδίπλωση της εξωτερικής επιφάνειας σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 5 mg / L Cu. Οι αλλαγές στο εξωτερικό σχήμα των κυττάρων μπορεί να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταλλικών ιόντων και των ενεργών θέσεων στην επιφάνεια αυτών (Wan Maznah et al., 2012).

Η πρώτη μεγάλη πρόκληση όσον αφορά το τομέα της βιορρόφησης, είναι η σωστή επιλογή των πιο υποσχόμενων μορφών βιομάζας από μια εξαιρετικά μεγάλη, ανέξοδη και διαθέσιμη ποικιλία βιοϋλικών. Έως σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός διαφόρων τύπων βιομάζας έχει εξεταστεί για τις μεταλλικές δεσμευτικές τους δυνατότητες, κάτω από διαφορετικές συνθήκες (Kratochvil and Volesky, 1998). Παρόλα αυτά, λόγω έλλειψης ομοιόμορφης μεθοδολογίας και ύπαρξης διαφορετικών κριτηρίων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην αναζήτηση για το κατάλληλο υλικό, τα αποτελέσματα των μελετών που έχουν αναφερθεί έως τώρα ποικίλουν ευρέως και είναι αδύνατον να συγκριθούν ποσοτικά. Στον **Πίνακα 3** συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τις πιο συνεπείς προσπάθειες για τον προσδιορισμό των τύπων μικροβιακής βιομάζας που δεσμεύουν

μέταλλα με τη διαδικασία της βιορρόφησης (Volesky and Holan, 1995). Από τον πίνακα αυτό, καθίσταται σαφές ότι τα θαλάσσια φύκη αποτελούν τις πιο ελπιδοφόρες βιομάζες βιορρόφησης μετάλλων.



Εικόνα 6. SEM εικόνες των μικροφυκών *Chlorella miniata* (a, b) και *Chlamydomonas* sp. (c, d). (a): κύτταρο μάρτυρας, (b): κύτταρο επεξεργασμένο με $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cr (III)}$, (c): κύτταρο επεξεργασμένο με $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}$ και (d): κύτταρο επεξεργασμένο με $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}$ (Arief et al., 2008, Wan Maznah et al., 2012).

Πίνακας 3. Πρόσληψη μετάλλων μέσω βιορρόφησης από μικροβιακή βιομάζα (Volesky and Holan, 1995).

Μέταλλο	Τύπος βιομάζας	Κατηγορία βιομάζας	Πρόσληψη μετάλλου ^a (mg/g)
Ag	(φύκη γλυκού νερού) ^b	βιορροφητικό	86 – 94
	(βιομάζα μυκήτων) ^b	βιορροφητικό	65
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	54
	<i>Streptomyces noursei</i>	νηματοειδές βακτήριο	38,4
Au	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ζύμη	4,7
	<i>Sargassum natans</i>	φαιοφύκος	400
	<i>Aspergillus niger</i>	μύκητας	176
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	15
			164

Πίνακας 3. (συνέχεια)

Μέταλλο	Τύπος βιομάζας	Κατηγορία βιομάζας	Πρόσληψη μετάλλου ^a (mg/g)	
Au	<i>Palmaria tenera</i>	Θαλάσσιο φύκος	164	
	<i>Palmaria palmata</i>	Θαλάσσιο φύκος	124	
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	φύκος γλυκού νερού	98	
	<i>Cyanidium caldarium</i>	φύκος	84	
	<i>Chlorella vulgaris</i>	φύκος γλυκού νερού	80	
	<i>Bacillus subtilis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	79	
	<i>Chondrus crispus</i>	Θαλάσσιο φύκος	76	
	<i>Bacillus subtilis</i>	βακτήριο	70	
	<i>Spirulina platensis</i>	φύκος γλυκού νερού	71	
			58	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα.	59	
	<i>Rhodomenia palmata</i>	Θαλάσσιο φύκος	40	
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	24	
	φύκος γλυκού νερού	βιορροφητικό	27 – 127	
	Cd	<i>Ascophyllum nodosum</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	215
		<i>Sargassum natans</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	135
		βιομάζα μυκήτων ^b	βιορροφητικό	135
<i>B. subtilis</i> ^b		βιορροφητικό	101	
<i>Fucus vesiculosus</i>		θαλάσσιο φαιοφύκος	73	
<i>Candida tropicalis</i>		ζύμη	60	
<i>Penicillium chrysogenum</i>		μύκητας	56	
		μύκητας	11	
<i>Rhizopus arrhizus</i>		μύκητας	30	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		ζύμη	20 – 40	
			11,8	
<i>Rhizopus arrhizus</i>		μύκητας	27	
<i>Rhizopus nigricans</i>		μύκητας	19	
<i>Penicillium chrysogenum</i> ^b		μύκητας	20	
<i>Pencillium spinulosum</i>		μύκητας	0,4	
Co	<i>Ascophyllum nodosum</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	100	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ζύμη	4,7	
Cr	<i>Bacillus biomass</i>	βακτήριο	118 (Cr ³⁺) 60 (Cr ⁶⁺)	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	31	
	<i>Candida tropicalis</i>	ζύμη	4,6	
	<i>Streptomyces nouresei</i>	νηματοειδές βακτήριο	1,8	
Cu	(<i>Bacillus subtilis</i>) ^b	βιορροφητικό	152	
	<i>Bacillus subtilis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	146	
	<i>Candida tropicalis</i>	ζύμη	80	
	(βιομάζα μυκήτων) ^b	βιορροφητικό	76	
	Μαγγάνιο – οξειδωτικά βακτήρια	(MK-2)	50	

Πίνακας 3. (συνέχεια)

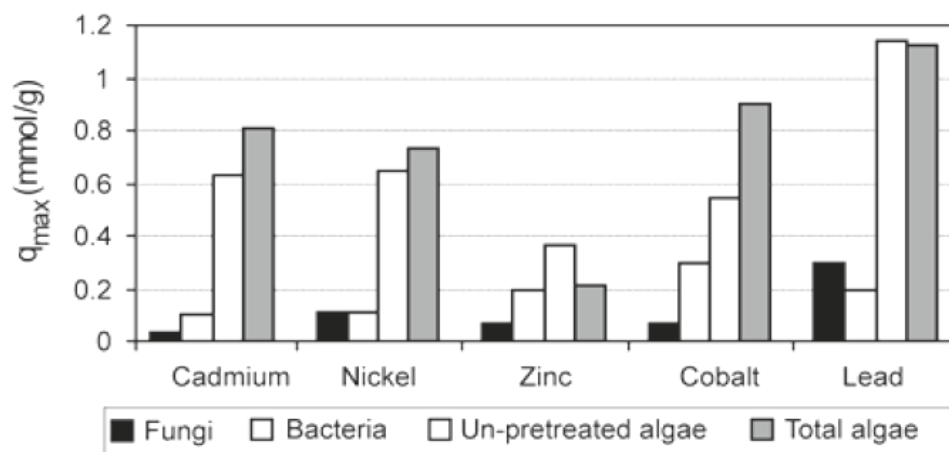
Μέταλλο	Τύπος βιομάζας	Κατηγορία βιομάζας	Πρόσληψη μετάλλου ^a (mg/g)	
Cu	<i>Bacillus licheniformis</i>	bacter. cell walls prep.	32	
	<i>Cladosporium resinae</i>	μύκητας	18	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	16	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ζύμη	17 – 40	
			10	
			6,3	
	<i>Pichia guilliermondii</i>	ζύμη	11	
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	φύκος γλυκού νερού	10	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	10	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	μύκητας	9	
	<i>Streptomyces noursei</i>	νηματοειδές βακτήριο	5	
	<i>Bacillus</i> sp.	βακτήριο	5	
	<i>Penicillium spinulosum</i>	μύκητας	0,4 – 2	
	<i>Aspergillus niger</i>	μύκητας	1,7	
	Cu	<i>Trichoderma viride</i>	μύκητας	1,2
	Fe	<i>Bacillus subtilis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	201
<i>Bacillus biomass</i>		βακτήριο	107	
<i>Bacillus licheniformis</i>		προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	45	
Hg	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	54	
	(<i>Penicillium chrysogenum</i>) ^b	μύκητας	20	
Mn	<i>Bacillus subtilis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	44	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	38	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	12	
Ni	<i>Fucus vesiculosus</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	40	
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	30	
	<i>Sargassum natans</i>	θαλάσσιο φαιοφύκος	24 – 44	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	29	
	<i>Candida tropicalis</i>	ζύμη	20	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	18	
	Μαγγάνιο – οξειδωτικά βακτήρια	(MK-2)	16	
	<i>Bacillus subtilis</i>	προεπεξεργ. βακτηρ. κυτταρ. τοιχώματα	6	
	<i>Rhizopus nigricans</i>	μύκητας	5	
	<i>Absidia orchidis</i>	μύκητας	5	
	Pb	<i>Bacillus subtilis</i> ^b	βιορροφητικό	601
		(βιομάζα μυκήτων) ^b	βιορροφητικό	373
		<i>Absidia orchidis</i>	μύκητας	351
<i>Fucus vesiculosus</i>		θαλάσσιο φαιοφύκος	220 – 370	
<i>Ascophyllum nodosum</i>		θαλάσσιο φαιοφύκος	270 – 360	
<i>Sargassum natans</i>		θαλάσσιο φαιοφύκος	220 – 270	
(<i>Bacillus subtilis</i>) ^b		βιορροφητικό	189	
<i>Penicillium chrysogenum</i>		μύκητας	122	

Πίνακας 3. (συνέχεια)

Μέταλλο	Τύπος βιομάζας	Κατηγορία βιομάζας	Πρόσληψη μετάλλου ^a (mg/g)
Pb	<i>Penicillium chrysogenum</i>	μύκητας	93
	<i>Rhizopus nigricans</i>	μύκητας	166
	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	ζύμη	100
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	91
			55
	<i>Streptomyces noursei</i>	νηματοειδές βακτήριο	55
	(<i>Penicillium chrysogenum</i>) ^b	μύκητας	25
Pd	(φύκη γλυκού νερού) ^b	βιορροφητικό	436
	(βιομάζα μυκήτων) ^b	βιορροφητικό	65
Pt	(φύκη γλυκού νερού) ^b	βιορροφητικό	53
U	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	νηματοειδές βακτήριο	440
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	220
U	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	195
	(<i>Penicillium chrysogenum</i>) ^b	μύκητας	25
U	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ζύμη	55 – 140
	<i>Bacillus</i> sp.	bacterium	38
	(<i>Penicillium chrysogenum</i>) ^b	μύκητας	25
Th	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	160
			93
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	yeast	70
	(<i>Bacillus subtilis</i>) ^b	βιορροφητικό	137
	(βιομάζα μυκήτων) ^b	βιορροφητικό	98
	Μαγγάνιο – οξειδωτικά βακτήρια	(MK-2)	39
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ζύμη	14 – 40
	<i>Candida tropicalis</i>	ζύμη	30
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	μύκητας	20
			14
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	μύκητας	6,5
	<i>Bacillus</i> sp.	βακτήριο	3,4

^a: Πρόσληψη μετάλλων όπως αναφέρθηκε, όχι απαραίτητα στο μέγιστο. Ο επανυπολογισμός μερικές φορές κρίνεται απαραίτητος. Οι υπολειμματικές συγκεντρώσεις συχνά δεν δίνονται για την κατάλληλη σύγκριση. ^b: Βιομάζα, όχι απαραίτητα στη φυσική της κατάσταση. Η προεπεξεργασία της μερικές φορές δεν αναφέρεται.

Επιπλέον, σε στατιστική μελέτη του 2004, οι μέσες τιμές της μέγιστης ποσότητας των προσροφούμενων μεταλλικών ιόντων ανά μονάδα μάζας (q_{max}) που έχουν δημοσιευτεί για 5 μέταλλα και διαφορετικούς τύπους βιομάζας (βακτήρια, μύκητες και μικροφύκη), ήταν μια άμεση ένδειξη ότι τα μικροφύκη είχαν καλύτερες ικανότητες πρόσληψης από τα υπόλοιπα είδη βιομάζας (**Εικόνα 7**). Παρόλα αυτά, τη δεδομένη χρονική περίοδο, η ποσότητα των διαθέσιμων δεδομένων για τα φύκη ήταν κατά πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή των βακτηρίων και των μυκήτων (González et al., 2011).



Εικόνα 7. Οι μέσες τιμές q_{max} που ελήφθησαν από διάφορους τύπους βιομάζας (González et al., 2011).

Τα φύκη πλέον έχουν μελετηθεί εκτενώς για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από τα λύματα, λόγω της διαδεδομένης παρουσίας τους στη φύση. Ένας αριθμός στελεχών αυτών τα οποία είναι κατάλληλα για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων σε υδατικό διάλυμα, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες και έχουν δείξει διάφορους βαθμούς απομάκρυνσης. Από τα μονοκύτταρα φύκη, το *Chlamydomonas reinhardtii* έχει μόλις πρόσφατα κερδίσει μεγαλύτερη προσοχή για τη μεταχείριση της ρύπανσης των βαρέων μετάλλων σε υδατικά διαλύματα. Λόγω της ευρέως φάσματος ανοχής του σε βαρέα μέταλλα, το είδος αυτό μπορεί να απομονώσει μια σειρά από ίχνη μετάλλων (Flouty and Estephane, 2012).

Η διαδικασία της βιορρόφησης περιλαμβάνει μια στερεή φάση που αποτελεί το βιορροφητικό (biosorbent) και μια υγρή φάση που αποτελεί το διαλυτικό μέσον (solvent), η οποία περιέχει διαλυμένα είδη τα οποία πρόκειται να προσροφηθούν (sorbate), (Munees Athamad, 2013). Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία μεταξύ της ποσότητας των δεσμευμένων ειδών στη στερεά φάση και της ποσότητας αυτών που παραμένει στο διάλυμα (υπολειμματική ή τελική συγκέντρωση ισορροπίας – C_f), (Kratochvil and Volesky, 1998).

1.3.4.1. Επιμέρους μηχανισμοί βιορρόφησης

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η βιορρόφηση των μετάλλων από τα μικροφύκη δεν βασίζεται αποκλειστικά σε έναν, αλλά σε περισσότερους δεσμευτικούς μηχανισμούς που μπορούν να συμβούν την ίδια δεδομένη στιγμή και σε διαφορετικό βαθμό ο καθένας (Najja et al., 2009). Αυτοί οι μηχανισμοί είναι αρκετά περίπλοκοι και όχι πλήρως κατανοητοί (Tsezos et al., 2011).

Υπάρχει μια εκτενής βιβλιογραφία που αφορά το μηχανισμό και τη μοντελοποίηση της βιορρόφησης, αναφερόμενη σε συγκεκριμένα στοιχεία και μικροβιακά στελέχη (Tsezos et al.,

2011). Επίσης, στις μελέτες της βιορρόφησης που έχουν διεξαχθεί έως σήμερα, ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί κυρίως στη συνολική πρόσληψη όπου διάφοροι τύποι πρόσληψης μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα (Naja et al., 2009). Έτσι η ερμηνεία τους γίνεται δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών συστημάτων (παρουσία διαφόρων αντιδραστικών ομάδων, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων, κτλ), (Oliveira et al., 2011). Συνεπώς η ικανότητα δέσμευσης μεταλλικών ιόντων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος του προσροφητικού. Έτσι οι διαφορές στις ικανότητες δέσμευσης των μετάλλων μπορεί να σχετίζονται με τις διαφορές στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Naja et al., 2009, Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014). Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις, η δέσμευση μετάλλων προχωρά μέσω των παρακάτω διαδικασιών (Oliveira et al., 2011).

Φυσική προσρόφηση

Η φυσική προσρόφηση λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια φυσικών δυνάμεων (Van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις), (Brinza et al., 2007, Naja and Volesky, 2011). Η φυσική προσρόφηση συνήθως δεν παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες βιορρόφησης. Ωστόσο, σε αρκετά σπάνιες περιπτώσεις βιορρόφησης, η φυσική προσρόφηση μπορεί να είναι στην πραγματικότητα η κυρίαρχη διαδικασία, π.χ. η προσρόφηση του Cd (II) από ελαιοπυρήνα και του Cu (II) από φύλλα καουτσούκ (Arief et al., 2008).

Ιονανταλλαγή

Έχει προταθεί ως ο κυρίαρχος μηχανισμός της βιορρόφησης από μάζα φυκών (Brinza et al., 2007). Η ανταλλαγή ιόντων είναι μια αναστρέψιμη χημική αντίδραση όπου ένα ιόν μέσα ένα διάλυμα, αντικαθίσταται από ένα παρομοίως φορτισμένο ιόν, συνδεδεμένο σε ένα ακίνητο στερεό σωματίδιο (Arief et al., 2008). Γενικά η βιομάζα περιέχει ελαφρά μέταλλα όπως K^+ , Na^+ , Ca^{2+} και Mg^{2+} , τα οποία ανταλλάσσονται με τα βαρέα μέταλλα (Brinza et al., 2007, He and Chen, 2014).

Συμπλοκοποίηση

Η απομάκρυνση των μετάλλων από το διάλυμα μπορεί επίσης να λάβει χώρα με το σχηματισμό συμπλόκων στην κυτταρική επιφάνεια, μετά την αλληλεπίδραση μεταξύ του μετάλλου και των δραστικών ομάδων (Ahalya et al., 2003). Η επιφάνεια των φυκών είναι ένα πολύπλοκο σύστημα, δεδομένου ότι συμπεριφέρεται ως ένας ετερογενής υποκαταστάτης και μπορεί να αντιμετωπιστεί ως ένα πολυλειτουργικό μακρομόριο (Naja et al., 2009).

Οι Allen και Brown πρότειναν ότι τα πιο ηλεκτραρνητικά μεταλλικά ιόντα έλκονται πιο έντονα στην επιφάνεια. Επίσης, τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η ικανότητα ρόφησης για το Cu^{2+} ήταν μικρότερη από ό, τι για το Pb^{2+} λόγω της μικρότερης ηλεκτραρνητικότητας του (Naja et al., 2009).

Καταβύθιση

Η διαδικασία αυτή μπορεί να είναι είτε εξαρτώμενη από το κυτταρικό μεταβολισμό είτε ανεξάρτητη από αυτόν. Στην πρώτη περίπτωση, η απομάκρυνση μετάλλων από το διάλυμα είναι συχνά συνδεδεμένη με το ενεργό αμυντικό σύστημα των μικροοργανισμών (Ahalya et al., 2003). Αυτοί αντιδρούν στη παρουσία ενός τοξικού μετάλλου, παράγοντας ενώσεις, οι οποίες ευνοούν τη διαδικασία καταβύθισης. Τα μέταλλα δεσμεύονται σε εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες οι οποίες εκκρίνονται από προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Tsezos et al., 2011). Στη περίπτωση αυτή, ένα μεταλλικό κατιόν και ένα ανιόν (π.χ. SO_4^{2-} , S^{2-} , HPO_4^{2-} κ.ά.), το οποίο συχνά είναι ένα μεταβολικό προϊόν ορισμένων τύπων βιομάζας, σχηματίζουν αδιάλυτα συσσωματώματα, όπως σουλφίδια, ανθρακικά άλατα, οξείδια, οξαλικά και τα φωσφορικά (Naja and Volesky, 2011).

Στην άλλη περίπτωση, η καταβύθιση που δεν εξαρτάται από τον κυτταρικό μεταβολισμό, μπορεί να είναι συνέπεια της χημικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του μετάλλου και της επιφάνειας του κυττάρου καθώς και των αλλαγών των περιβαντολογικών συνθηκών γύρω από την βιομάζα (Ahalya et al., 2003, Sag and Kutsal, 2001).

1.3.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιορρόφηση

Πειραματικές παράμετροι όπως το είδος της βιομάζας, το pH και ο ανταγωνισμός μεταξύ των ιόντων των μετάλλων μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην δέσμευση του μετάλλου στα φύκη (Naja et al., 2009). Μερικοί από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη δέσμευση μετάλλων συζητούνται παρακάτω.

Θερμοκρασία

Οι διαθέσιμες μελέτες στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας κατά την αφαίρεση μετάλλων από μικροφύκη, δεν συνάδουν πλήρως μεταξύ τους. Αν και ορισμένοι συγγραφείς επεσήμαναν μια αύξηση στην έκταση της αφαίρεσης μετάλλου με την αύξηση της θερμοκρασίας, άλλοι έχουν υποστηρίξει μια μειωμένη πρόσληψη. Για παράδειγμα, ο Aksu (2002) παρατήρησε ότι η έκταση της προσρόφησης του Ni^{2+} σε ξηρή βιομάζα του *Chlorella vulgaris*, αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας ενώ οι Gurta και Rastogi (2008) περιγράφουν μια χαμηλότερη προσρόφηση του Cd^{2+} από το *Oedogonium* sp. σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Άλλες μελέτες έχουν δείξει να μην υφίσταται καμία επίδραση της θερμοκρασίας στη ρόφηση των μετάλλων (Monteiro et al., 2012).

Οι Kuyucak και Volesky παρατήρησαν ότι η δέσμευση του Co από το φαιοφύκος *Ascophyllum nodosum* αυξήθηκε κατά 50 – 70%, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 4 °C – 23 °C. Με την περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στους 40 °C η δέσμευση αυξήθηκε μόνο ελαφρά, ενώ οι θερμοκρασίες των 60 °C και άνω, προκάλεσαν μια αλλαγή στην υφή του

προσροφητικού και την απώλεια της ικανότητας βιορρόφησης (Naja et al., 2009). Οι Aksu et al. ανέφεραν ότι η θερμοκρασία δεν επηρεάζει τη διαδικασία στο εύρος 20 – 35 °C (Das et al., 2008). Οι Antunes et al., (2003) και Cruz et al., (2004), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ικανότητα πρόσληψης μετάλλων μειώνεται ελαφρά με αύξηση της θερμοκρασίας στο διάστημα 20 – 55 °C (Brinza et al., 2007). Ωστόσο η επίδραση της θερμοκρασίας είναι σχετικά μικρή σε σχέση με άλλους παράγοντες.

pH

Το pH φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της βιορρόφησης καθώς επηρεάζει τη χημεία των διαλυμάτων των μετάλλων, την δραστηριότητα των λειτουργικών ομάδων, τον ανταγωνισμό μεταξύ των ιόντων των μετάλλων καθώς και την ανοχή των φυκών (Brinza et al., 2007, Rao and Prabhakar, 2011).

Η ρόφηση των μεταλλικών κατιόντων από τα περισσότερα είδη βιομάζας (π.χ. Cd, Cu, Zn, Pb, Ni, Mn, Al, Co) μειώνεται με τη μείωση του pH από 6 στα 2,5 (Kratochvil and Volesky, 1998, Naja et al., 2009). Σε χαμηλότερο pH οι ενεργές θέσεις είναι πρωτονιωμένες και ως εκ τούτου παρουσιάζεται ανταγωνισμός μεταξύ των πρωτονίων και των μεταλλικών ιόντων για την θέση ρόφησης. Σε αρκετά χαμηλό pH, σχεδόν όλες οι θέσεις καθίστανται πρωτονιωμένες και είναι δυνατή η πλήρης εκρόφηση των δεσμευμένων μεταλλικών ιόντων. Επίσης ακραίες τιμές pH μπορεί να βλάψουν την δομή του βιορροφητικού υλικού. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις έχουν δείξει παραμορφωμένα κύτταρα, σημαντική απώλεια βάρους και μείωση της ικανότητας ρόφησης (Naja et al., 2009).

Ωστόσο δεν υπάρχει μεγάλος όγκος βιβλιογραφίας που να ορίζει το βέλτιστο pH για τη πρόσληψη των μεταλλικών ιόντων από διάφορα φύκη. Όχι μόνο υπάρχει έλλειψη δεδομένων που συγκρίνουν την επίδραση του pH στην παθητική πρόσληψη των μετάλλων από διάφορα φύκη, αλλά η βιβλιογραφία δεν περιέχει σχεδόν καθόλου χρήσιμα δεδομένα που να περιγράφουν τη βέλτιστη τιμή pH για την πρόσληψη μετάλλων από ζωντανά κύτταρα φυκών. Στο **Πίνακα 4** που ακολουθεί, παρουσιάζεται μια σύντομη περίληψη της δημοσιευμένης βιβλιογραφίας που αναφέρει το βέλτιστο pH για την πρόσληψη 7 κοινών τοξικών μετάλλων (Wilde and Benemann, 1993).

Πίνακας 4. Βέλτιστο pH για τη δέσμευση μετάλλων από διάφορα φύκη (Wilde and Benemann, 1993).

Μεταλλικό ιόν	Βέλτιστο pH	Είδος φύκους
Al (III)	5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Al (III)	5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Al (III)	8,0	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
Cd (II)	> 5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cd (II)	8,0	<i>Navicula pelluculosa</i>
Cd (II)	6,0	<i>Chlamydomonas sp.</i>

Πίνακας 4. (συνέχεια)

Μεταλλικό ιόν	Βέλτιστο pH	Είδος φύκους
Cd (II)	7,0	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
Cd (II)	7,0	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Cd (II)	5,0	<i>Ulothrix fimbriata</i>
Cd (II)	5,0	<i>Zygenema</i> sp.
Cd (II)	8,0	<i>Nostoc</i> sp.
Cd (II)	7,0	<i>Oscillatoria</i> sp.
Cd (II)	7,0	<i>Stichococcus bacillaris</i>
Cr (III)	> 5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cr (III)	3,9	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cr (III)	4 – 6	<i>Hallmeda opuntia</i>
Cr (III)	> 5,5	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cr (VI)	2,8	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cr (VI)	< 2,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cr (VI)	< 2,0	<i>Spirulina platensis</i>
Cr (VI)	< 2,0	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
Cu (II)	> 5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cu (II)	5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Cu (II)	6,5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Cu (II)	5,0	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
Hg (II)	3 – 7	<i>Chlorella vulgaris</i>
Hg (II)	6,0	<i>Navicula pelliculosa</i>
Hg (II)	4,0	<i>Chlamydomonas</i> sp.
Hg (II)	8,0	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
Hg (II)	6,0	<i>Mougeotia</i> sp.
Hg (II)	6,0	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Hg (II)	10,0	<i>Ulothrix fimbriata</i>
Hg (II)	6,0	<i>Zygenema</i> sp.
Hg (II)	4,0	<i>Nostoc</i> sp.
Hg (II)	9,0	<i>Nostoc muscorum</i>
Hg (II)	5,0	<i>Oscillatoria</i> sp.
Hg (II)	9,0	<i>Schizothrix calcicola</i>
Pb (II)	> 5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Pb (II)	9,0	<i>Chlamydomonas</i> sp.
Pb (II)	9,0	<i>Mougeotia</i> sp.
Pb (II)	9,0	<i>Ulothrix fimbriata</i>
Pb (II)	9,0	<i>Nostoc muscorum</i>
Pb (II)	9,0	<i>Oscillatoria</i> sp.
Pb (II)	10,0	<i>Schizothrix calcicola</i>
Zn (II)	> 5,0	<i>Chlorella vulgaris</i>
Zn (II)	3,9	<i>Chlorella vulgaris</i>

Από αυτές και άλλες μελέτες, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι αν και ορισμένες γενικότητες εμφανίζονται στη βιβλιογραφία, το βέλτιστο pH για την απομάκρυνση των μετάλλων είναι απρόβλεπτο και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο των φυκών που χρησιμοποιούνται και από άλλες συνθήκες (Wilde and Benemann, 1993).

Βιομάζα

Ένα πλήθος τύπων βιομάζας (π.χ. μύκητες, βακτήρια, φύκη, τύρφη κτλ) έχει εξεταστεί για τη βιορρόφηση των μετάλλων. Όχι μόνο τα είδη βιομάζας, αλλά και οι συνθήκες ανάπτυξης, όπως το μέσο καλλιέργειας, η φυσιολογική κατάσταση και η ηλικία του οργανισμού επηρεάζουν την απόδοση της προσρόφησης (Naja et al., 2009). Σύμφωνα με πολυάριθμες παρατηρήσεις η σχέση μεταξύ της ηλικίας της βιομάζας και της προσρόφησης των βαρέων μετάλλων δεν είναι πλήρως κατανοητή (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).

Για μια σταθερή αρχική συγκέντρωση μετάλλου, η αύξηση της δόσης του προσροφητικού παρέχει μεγαλύτερο εμβαδόν επιφάνειας και καλύτερη διαθεσιμότητα των ενεργών θέσεων, σε σύγκριση με τη χαμηλότερη δοσολογία η οποία έχει λιγότερες δεσμευτικές θέσεις για την προσρόφηση της ίδιας ποσότητας ιόντων μετάλλου στο διάλυμα προσρόφησης (Abdel-Ghani and El-Chaghaby, 2014). Ωστόσο, η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας οδηγεί στον σχηματισμό μεγαλύτερων συσσωματωμάτων των κυττάρων που μπορεί να διαταράξει την ισορροπία στον αντιδραστήρα (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).

Αρχική συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων

Η αρχική συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων στο διάλυμα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο καθώς δρα ως κινητήρια δύναμη για να ξεπεραστεί η αντίσταση μεταφοράς μάζας μεταξύ του διαλύματος και της επιφάνειας της βιομάζας. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες οι οποίες προσπάθησαν να αποσαφηνίσουν την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των μετάλλων στη πρόσληψη αυτών, μέσω της βιορρόφησης (Arief et al., 2008).

Η απόδοση απομάκρυνσης των ιόντων από το βιορροφητικό, αρχικά αυξάνει με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των ιόντων. Σε χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων στο διάλυμα, τα ιόντα θα αλληλεπιδράσουν με τις θέσεις σύνδεσης και έτσι διευκολύνεται σχεδόν στο 100% η προσρόφηση (Abdel-Ghani and El-Chaghaby, 2014). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, τα περισσότερα ιόντα μένουν μη – προσροφημένα στο διάλυμα λόγω του κορεσμού των θέσεων πρόσδεσης (Abdel-Ghani and El-Chaghaby, 2014).

Παρουσία άλλων κατιόντων

Τα βιομηχανικά λύματα συχνά περιέχουν, εκτός από τα ιόντα βαρέων μετάλλων και άλλα ιόντα (π.χ. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , και Ca^{2+}), τα οποία μπορούν να παρεμβαίνουν στη πρόσληψη των βαρέων μεταλλικών ιόντων από τη βιομάζα (Arief et al., 2008). Τα ιόντα στο διάλυμα μπορεί να

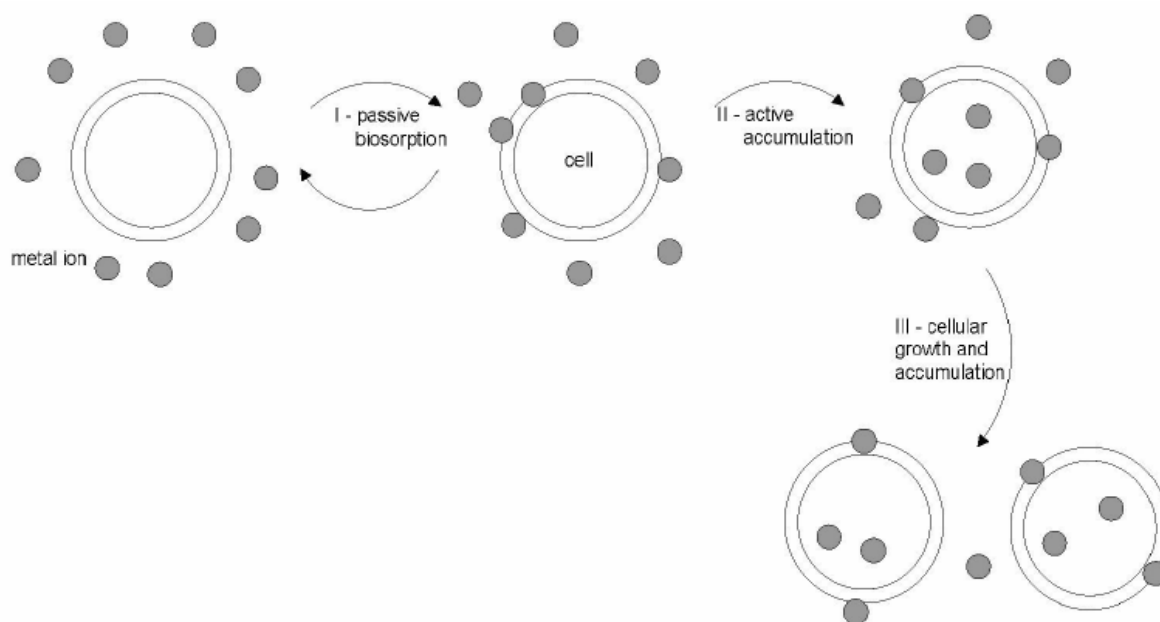
ανταγωνίζονται το μεταλλικό ιόν του ενδιαφέροντος για τις θέσεις προσρόφησης. Έτσι στη συνέχεια, η δέσμευση του μεταλλικού ιόντος μειώνεται (Naja et al., 2009). Ως αποτέλεσμα, η πρόσληψη των μεταλλικών ιόντων σε μια ανταγωνιστική διαδικασία προσρόφησης θα ήταν μικρότερη από ότι σε μια ατομική προσρόφηση (Arief et al., 2008).

1.3.5. Βιοσυσσώρευση

Η βιοσυσσώρευση έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές ήδη από το 1978 και περιγράφει την ενεργή διαδικασία που απαιτεί τη μεταβολική δραστηριότητα των οργανισμών για να δεσμεύσουν ιοντικά είδη. Κατά την ενεργή αυτή διαδικασία, οι οργανισμοί τείνουν συνήθως να παρουσιάζουν ανοχή ή / και αντίσταση στα μέταλλα όταν αυτά βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις ή / και όταν δεν είναι μέρος της θρέψης τους (Macek and Mackona, 2011, Oliveira et al., 2011).

Η βιοσυσσώρευση μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως ένα δεύτερο μέρος της διαδικασίας απομόνωσης μετάλλων από τη ζωντανή βιομάζα. Μερικές φορές, αποκαλείται και ως ενεργή βιορρόφηση, δηλαδή το αντίθετο της παθητικής βιορρόφησης (Kadukona and Vircikona, 2005). Παρόμοια όμως με τον ορισμό της βιορρόφησης και η βιοσυσσώρευση έχει αναφερθεί ως διφασική διαδικασία (**Εικόνα 8**). Σε αυτή τη περίπτωση, η πρώτη φάση περιλαμβάνει τη δέσμευση των μεταλλικών ιόντων στην κυτταρική επιφάνεια. Αυτό το μέρος της διαδικασίας είναι μεταβολικά παθητικό και πανομοιότυπο με το μηχανισμό της βιορρόφησης. Η δεύτερη φάση αυτής της διαδικασίας είναι δυνατή μόνο όταν τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά. Αν διατηρούνται κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των οργανισμών, τότε η ποσότητα βιομάζας αυξάνεται. Αυτό επιτρέπει τη δέσμευση μεγαλύτερων ποσοτήτων μεταλλικών ιόντων σε σύγκριση με τη βιορρόφηση (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014). Η βιοσυσσώρευση δεν αποτελεί μια διαδικασία χημικής ισορροπίας (Chojnacka, 2010, Flouty and Estephane, 2012).

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, υδρόβιοι και χερσαίοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει στρατηγικές για τη διατήρηση μιας εξισορροπημένης σχέσης με τα ιόντα βαρέων μετάλλων που βρίσκονται παρόντα και διαθέσιμα στο περιβάλλον. Τα κύτταρα των οργανισμών αυτών έχουν εξελιχθεί γενετικά αναπτύσσοντας μηχανισμούς άμυνας αφού για να επιβιώσουν έπρεπε να είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν περιβάλλοντα με συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Η εξέλιξη αυτή αρχικά αντιμετωπίστηκε με την επιλογή των βαρέων μετάλλων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη τους και τον αποκλεισμό των υπολοίπων ενώ μετέπειτα, σε επόμενο βήμα εξέλιξης ή παράλληλα, ανέπτυξαν τη δυνατότητα να κρατούν τα μεταλλικά ιόντα στις βέλτιστες ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις (Perales-Vela et al., 2006).



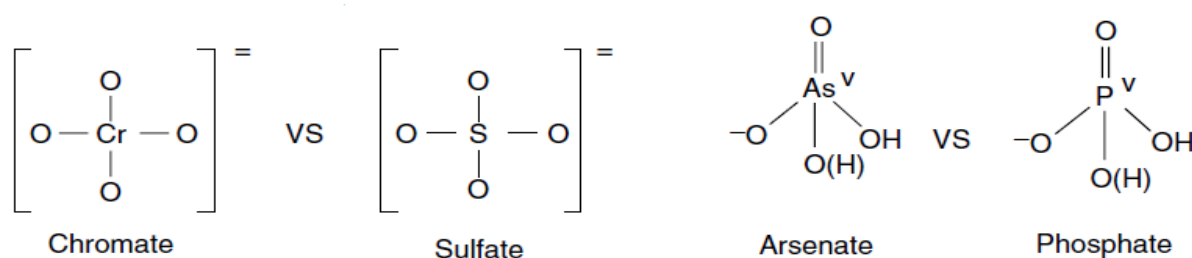
Εικόνα 8. Τα στάδια της βιοσυσσώρευσης των μεταλλικών ιόντων (Chojnacka, 2009).

Τα φύκη είναι συχνά εκτεθειμένα στη ρύπανση από βαρέα μέταλλα λόγω της διάθεσης των βιομηχανικών και των εγχώριων αποβλήτων σε υδάτινες οδούς. Πολλά φύκη που αναπτύσσονται σε μέταλλο – ρυπασμένα περιβάλλοντα εμφανίζουν την ικανότητα να ανέχονται υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών μετάλλων (Gaur and Rai, 2001). Τα μικροφύκη χρησιμοποιούν μια ποικιλία βιοχημικών στρατηγικών για τη μείωση της τοξικότητας των μη ουσιωδών μετάλλων (π.χ., Hg και Cd) και τη διατήρηση της μεταλλικής ομοιόστασης στο κυτόπλασμα (Torres et al., 2008). Αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να περιλαμβάνουν τον αποκλεισμό ο οποίος μπορεί να συμβεί με μεταβολές που οδηγούν σε μειωμένη διαπερατότητα για ένα μεταλλικό ιόν και πιθανές τροποποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος, μηχανισμούς εκροής των μετάλλων, δέσμευσή τους σε εξωκυτταρικούς παράγοντες ή ακόμα και ενδοκυτταρική δέσμευση η οποία θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω (Gaur and Rai, 2001, Worms et al., 2006).

Τα τοξικά ιόντα μετάλλων είναι σε θέση να διασχίσουν τις μεμβράνες και πολλοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί προκειμένου να εξηγηθεί η μεταφορά τους (Pinto et al., 2003). Τα τελευταία χρόνια, οι έννοιες του μοριακού και ιοντικού μιμητισμού (molecular and ionic mimicry) έχουν προταθεί ως μηχανισμοί με τους οποίους ορισμένα τοξικά είδη μετάλλων μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα – στόχους (Christy and Rudolfs, 2010). Ως μοριακός μιμητισμός αναφέρεται η ικανότητα ενός μεταλλικού ιόντος να συνδέεται με ένα ενδογενές οργανικό μόριο προς σχηματισμό ενός οργανικού είδους μετάλλου που δρα ως λειτουργικό ή δομικό μιμητικό των βασικών μορίων το οποίο δεσμεύεται στις θέσεις σύνδεσης των μεταφορέων αυτών των βασικών μορίων (Bridges and Zalups, 2005). Ο ιοντικός μιμητισμός έχει οριστεί ως η ικανότητα ενός μη συνδεδεμένου κατιονικού είδους ενός μετάλλου να συμπεριφέρεται ως λειτουργικό ή / και δομικό 'μιμητικό' ενός άλλου δομικού ή λειτουργικού (συνήθως ουσιώδους) στοιχείου μίας

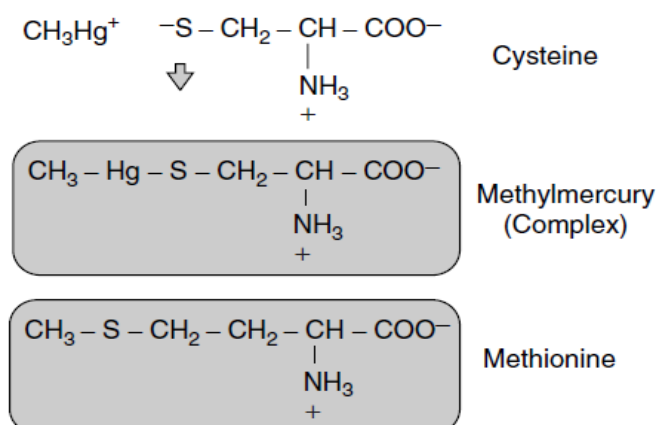
πρωτεΐνης – φορέα, ενός ιοντικού διαλύου, ενός ενζύμου, ενός παράγοντα μεταγραφής, ή / και μιας μέταλλο – δεσμευτικής πρωτεΐνης (Christy and Rudolfs, 2010).

Τα φωσφορικά και θειικά οξυανιόντα μεταφέρονται σε όλη τη κυτταρική μεμβράνη από διάφορες πρωτεΐνες μεταφοράς. Ορισμένα μεταλλικά οξυανιόντα μοιάζουν με αυτές τις ενώσεις και ανταγωνίζονται τα φωσφορικά και θειικά, για τη μεταφορά μέσω των αντίστοιχων φορέων τους. Για παράδειγμα, το χρωμικό μοιάζει με το θειικό και μπορούν να μεταφερθούν με μεταφορείς θειικού. Έχει δειχθεί ότι η μεταφορά θειικού αναστέλλεται από αυτούς τους “μιμητές”. Ομοίως, το αρσενικό είναι δομικά παρόμοιο με το φωσφορικό και ως εκ τούτου, είναι υπόστρωμα για τους φορείς φωσφορικών (**Εικόνα 9**), (Davidson et al., 2007). Αυτό το είδος του ιοντικού μιμητισμού αντιπροσωπεύει επίσης την μεταφορά μονοσθενών κατιόντων όπως του Pb^+ και του Li^+ στους K^+ και Na^+ φορείς αντίστοιχα (Beckett et al., 2007).



Εικόνα 9. Σύγκριση των δομών των οξυανιόντων χρωμικού και αρσενικού με τα ενδογενή οξυανιόντα θειικού και φωσφορικού αντίστοιχα (Beckett et al., 2007).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα τοξικά μέταλλα μπορούν να μεταφέρονται εντός των κυττάρων και ως συμπλοκοποιημένα σε οργανικές ουσίες. Ο μεθυλδράργυρος μπορεί να συνδεθεί με το αμινοξύ κυστεΐνη, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που μοιάζει με την μεθειονίνη, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα μέσω του φορέα της μεθειονίνης (**Εικόνα 10**), (Davidson et al., 2007).



Εικόνα 10. Η δομή του συμπλόκου μεθυλδραργύρου – κυστεΐνης μιμείται εκείνη της μεθειονίνης (Beckett et al., 2007).

Η συμπλοκοποίηση των μετάλλων στο κυτόπλασμα από υποκατάστατες υψηλής συγγένειας αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μηχανισμό αποτοξίνωσης και ανοχής των βαρέων μετάλλων (Srirang and Murooka, 2007). Τα μικροφύκη έχουν αναπτύξει ένα μηχανισμό παραγωγής πεπτιδίων, ικανών να δεσμεύουν βαρέα μέταλλα. Αυτά τα μόρια, ως οργανομεταλλικά σύμπλοκα, κατανομούνται περαιτέρω στα χυμοτόπια των κυττάρων για να διευκολύνουν τον έλεγχο της κυτοπλασματικής συγκέντρωσης των μεταλλικών ιόντων, εμποδίζοντας έτσι την τοξική δράση τους (Perales-Vela et al., 2006). Μια υπέρ – οικογένεια μέταλλο – δεσμευτικών πρωτεϊνών, εν ονόματι μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins –MTs), έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη συγκέντρωση ελευθέρων μεταλλικών ιόντων στο κυτταρόπλασμα των φυκών, των φυτών και άλλων οργανισμών. Μια σύντομη περιγραφή αυτών των ενώσεων παρουσιάζεται παρακάτω (Gaur and Rai, 2001).

Οι MTs είναι παρούσες σε όλα τα ζωικά φύλα, στους περισσότερους μύκητες και τα φυτά και έχουν σχέση με τη μέταλλο – ομοιόσταση και την αποτοξίνωση (Valls et al., 2001). Πολλές αναφορές έχουν περιγράψει τη δομή, τις λειτουργίες και την γονιδιακή έκφραση των MTs. Όμως, παρά την αύξηση των δεδομένων, διάφορα θέματα παραμένουν αδιευκρίνιστα και η πραγματική λειτουργία αυτών δεν έχει ακόμη αποκαλυφθεί (Carpene et al., 2007).

Σύμφωνα με τη διάταξη των αμινοξικών κατάλοιπων κυστεΐνης (Cysteine – Cys), οι MTs κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- MTs κλάσης I οι οποίες περιέχουν 20 πολύ συντηρημένα κατάλοιπα Cys βάσει των MTs των θηλαστικών και είναι διαδεδομένες στα σπονδυλωτά (Cobbett and Goldsbrough, 2002, Torres et al., 2008)..
- MTs κλάσης II οι οποίες δεν παρουσιάζουν την αυστηρή διάταξη των Cys της κλάσης I. Αυτές έχουν συσταθεί σε μύκητες και φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Cobbett and Goldsbrough, 2002, Torres et al., 2008).
- MTs κλάσης III ονομαζόμενες και φυτοχελατίνες (Phytochelatins – PCs) οι οποίες αποτελούν βραχέα πολυπεπίδια, συναντώμενα σε ανώτερα φυτά, φύκη και σε ορισμένους μύκητες (Souza et al., 2012).

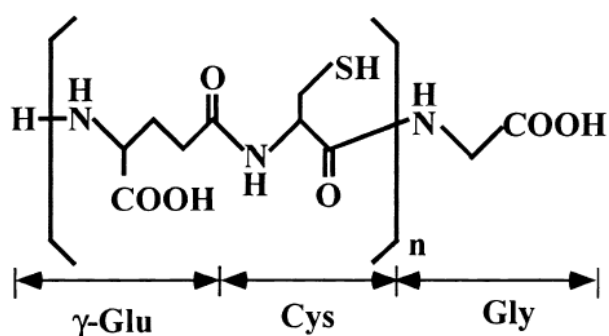
Οι MT-I και MT-II κωδικοποιούνται από δομικά γονίδια. Σε αντίθεση, οι PCs είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και ως εκ τούτου δεν κωδικοποιούνται άμεσα από δομικά γονίδια (Robinson, 1989). Είναι πιθανό ότι οι MTs και οι PCs εκτελούν σχετικά ανεξάρτητες λειτουργίες στη μεταλλική αποτοξίνωση ή / και στο μεταβολισμό. Στα φυτά και τα φύκη, η ζώνη αρμοδιότητας των MTII και των PCs είναι ακόμα ασαφής και μερικές αποδείξεις επισημαίνουν ότι η επιλογή αυτών των μηχανισμών σχετίζεται με διάφορους παράγοντες όπως την ηλικία του οργανισμού και το τύπο των βαρέων μετάλλων (ουσιώδη / μη ουσιώδη), (Perales-Vela et al., 2006, Torres et al., 2008). Παρόλα αυτά, οι PCs και οι MTs θεωρούνται οι καλύτεροι χαρακτηρισμένοι μέταλλο – δεσμευτικοί υποκαταστάτες των φυτικών κυττάρων (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Οι MTs αποτελούν πλούσιες σε Cys, πρωτεΐνες συντιθέμενες στα ριβοσώματα σύμφωνα με τις πληροφορίες του mRNA. Μετά από 20 χρόνια περίπου οι PCs αναγνωρίστηκαν ως μη πρωτεϊνικά πλούσια σε Cys πεπτιδία, εντελώς διαφορετικά όσον αφορά τη δομή και τη βιοσυνθετική τους οδό (Inouhe, 2005). Έτσι λοιπόν, μετά την διασαφήνιση της δομής τους και τη διαπίστωση της εμφάνισής τους στο φυτικό βασίλειο, προτάθηκε ότι οι PCs ήταν λειτουργικά ανάλογες με τις MTs. (Cobbett, 2001).

Οι PCs αποτελούν μια οικογένεια συντεθειμένων ενζυμικά πεπτιδίων, πλούσιων σε Cys (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Ανακαλύφθηκαν το 1985, όταν απομονώθηκαν από κυτταρικό εναιώρημα καλλιεργειών ενός ανώτερου φυτού (από όπου προέκυψε και το πρώτο συνθετικό της ονομασίας τους ως φυτοχελατίνες), ύστερα από έκθεση αυτού σε Cd. Από τότε οι PCs έχουν βρεθεί σε ορισμένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων ανώτερων φυτών, μυκήτων και μικροφυκών. Οι PCs δεν συντίθενται μόνο κατόπιν έκθεσης των εν λόγω οργανισμών σε Cd αλλά και σε άλλα βαρέα μέταλλα (ουσιώδη και τοξικά) όπως Hg, Cu, Zn, και Ni (Hirata et al., 2005, Perales-Vela et al., 2006). Οι PCs δεν έχουν απομονωθεί ποτέ από κύτταρα χωρίς προηγουμένως την έκθεση αυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Η εμφάνιση εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων ($1 \text{ pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ πρωτεΐνης) PCs σε κύτταρα τομάτας, μετά την μεταφορά τους σε φρέσκο μέσο, εξηγήθηκε από το γεγονός ότι το μέσο καλλιέργειας πάντοτε περιείχε Cu και Zn σε ιχνοποσότητες (Gaur and Rai, 2001). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρόλος τους περιλαμβάνει την αποτοξίνωση των οργανισμών από υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και τη διατήρηση της ομοιόστασης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ουσιωδών μεταλλικών ιόντων (Hirata et al., 2005).

Οι PCs αποτελούν βραχεία πεπτιδία που αποτελούνται από 3 αμινοξέα, το γλουταμινικό οξύ (Glutamic acid – Glu), τη Cys και τη γλυκίνη (Glycine – Gly), με τη Cys να συνδέεται με τη γ – καρβοξυλομάδα του Glu (Sriprang and Murooka, 2007). Έτσι, η ανακάλυψη της σύνδεσης αυτής σε πεπτιδία ήταν το σημείο καμπής για την ταξινόμηση αυτών των πεπτιδίων ως τάξη MT-III (Gaur and Rai, 2001).

Οι PCs έχουν γενική πρωτοταγή δομή της μορφής $(\gamma - \text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Gly}$ όπου $n = 2 - 11$ (**Εικόνα 11**) και μοριακό βάρος να κυμαίνεται μεταξύ 2 – 10 kDa (Hirata et al., 2005, Perales-Vela et al., 2006, Torres et al., 2008). Η Cys περιέχει μια σουλφυδρυλομάδα ($-\text{SH}$) η οποία αποτελεί τη θέση δέσμευσης του μετάλλου (Torres et al., 2008). Μόρια της PC με διαφορετικά μήκη αλυσίδας συντίθενται διαδοχικά και σχηματίζουν σύμπλοκα με τα βαρέα μέταλλα (όπως Cd, Cu, Zn, Hg, Ag, και As).

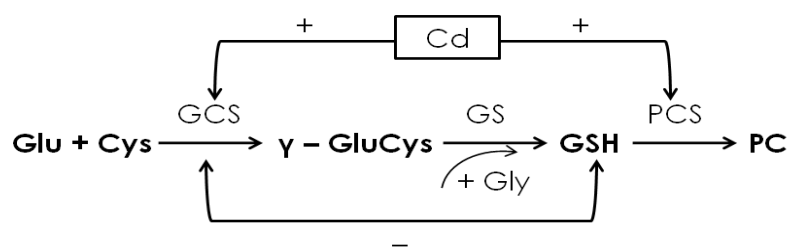


Εικόνα 11. Πρωτοταγής δομή των φυτοχελαιπινών (Hirata et al., 2005).

Έχει βρεθεί ότι η σύνθεση των PCs σχετίζεται με το βαθμό της ρύπανσης ενός υδάτινου περιβάλλοντος. Οι Ahner et al., το 1994, ανίχνευσαν μια τάση παραγωγής των PCs στο φυτοπλαγκτόν ενός κόλπου που λαμβάνει ανθρωπογενείς πηγές βαρέων μετάλλων, με υψηλότερη παραγωγή των PCs σε ζώνες πιο κοντά στην ακτή όπου ήταν πιθανόν να περιέχονταν υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων (Perales-Vela et al., 2006). Η μακριά αλυσίδα της PC μπορεί να δεσμεύει τα βαρέα μέταλλα σε ένα σταθερό σύμπλοκο. Στο ανεκτικό σε Cd^{2+} διάτομο *P. Tricornutum* βρέθηκε ότι το μέγεθος της αλυσίδας είναι μεταξύ $n = 5 - 9$. Το Pb^{2+} επήγαγε μεγάλη αλυσίδα PC στο ίδιο φύκος αλλά σε μικρότερο βαθμός από το Cd^{2+} , ενώ το Cu^{2+} επάγει PC με $n = 2$. Οι Torres et al. (1997) πρότειναν ότι υψηλή μέταλλο - ανοχή στο *P. Tricornutum* δεν οφείλεται μόνο στην αύξηση της παραγωγής PC αλλά και στην αύξηση του μήκους των πεπτιδίων σε σύγκριση με άλλα είδη, όπως των *Chlorella fusca* και *S. bacillaris* (Perales-Vela et al., 2006).

Δομικά, οι PCs σχετίζονται με τη γλουταθειόνη [Glutathione GSH: ($\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}$) - Gly] και θεωρείται ότι είναι τα προϊόντα της βιοσυνθετικής της οδού. Πολλές φυσιολογικές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η GSH είναι το υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση των PCs (Sriprang and Murooka, 2007). Ειδικότερα, γενετικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι γενετικά τροποποιημένα στελέχη με ανεπάρκεια GSH του *S. rombe* καθώς και του *Arabidopsis* παρουσιάζουν έλλειψη PC και υπερευαισθησία στο Cd (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Το μονοπάτι των PCs εμπλέκεται στη σύνθεση της $\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}$ (από το Glu και τη Cys) από τη συνθετάση της $\gamma - \text{γλουταμυλο} - \text{κυστεΐνης}$ ($\gamma - \text{glutamylcysteine synthetase} - \text{GCS}$) και μετά η συνθάση της γλουταθειόνης (Glutathione synthetase - GS) καταλύει τη σύνθεση της GSH (Sriprang and Murooka, 2007). Η PC συνθάση (PC synthase - PCS) καταλύει τη μεταφορά της $\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}$ από τη GSH σε ένα άλλο μόριο της GSH σχηματίζοντας $(\gamma - \text{Glu} - \text{Cys})_2 - \text{Gly}$ (Εικόνα 12). Επίσης καταλύει τη σταδιακή προσθήκη της $\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}$ από τη GSH σε PC ολιγομερή (Gaur and Rai, 2001). Η PCS απαιτεί μεταλλικά ιόντα ως παράγοντες ενεργοποίησης (Hirata et al., 2005). Ο γενικός μηχανισμός που συμμετέχει στη διαδικασία είναι ο εξής: $[\gamma\text{Glu} - \text{Cys}]_n - \text{Gly} + [\gamma\text{Glu} - \text{Cys}] - \text{Gly} \rightarrow [\gamma\text{Glu} - \text{Cys}]_{n+1} - \text{Gly} + \text{Gly}$ (Perales-Vela et al., 2006).



Εικόνα 12. Η σύνθεση των PCs στα φυτά. Συντομογραφίες: Glu: γλουταμινικό οξύ, Cys: κυστεΐνη, GCS: συνθετάση της γ - γλουταμυλο - κυστεΐνης, GS: συνθάση της γλουταθειόνης, Gly: γλυκίνη, GSH: γλουταθειόνη, PCS: PC συνθάση, PC: φυτοχελατίνη (Cobbett, 2001, Mejare and Bulow, 2001).

Παρά το γεγονός ότι μια σειρά από δομικές παραλλαγές των PCs έχουν περιγραφεί σε μερικά φυτικά είδη (όπως $[\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}]_n - \beta - \text{Ala}$, $[\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}]_n - \beta - \text{Ser}$, $[\gamma - \text{Glu} - \text{Cys}]_n - \text{Glu}$), υποτίθενται ότι είναι λειτουργικά ανάλογες των PCs και συντίθενται ουσιαστικά μέσω παρόμοιων βιοχημικών οδών (Cobbett, 2001).

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το Cd^{2+} είναι ο πιο αποτελεσματικός ενεργοποιητής της PCS ακολουθούμενος από τα Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} και άλλα βαρέα μέταλλα ενώ κάποια άλλα ενεργοποιούν σε πολύ μικρότερο βαθμό από το Cd. Επίσης κάποια μεταλλοειδή όπως το As μπορούν να ενισχύσουν την παραγωγή των PCs αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα άλλα βαρέα μέταλλα (Hirata et al., 2005, Perales-Vela et al., 2006). Σε επεξεργασμένα με Cd, κύτταρα του γένους *Chlamydomonas*, πάνω από το 70% του Cd βρέθηκε να δεσμεύεται από τις PCs (Hanikenne et al., 2009).

Το χυμοτόπιο θεωρείται η κυρίαρχη περιοχή αποθήκευσης των μετάλλων στα φυτικά κύτταρα. Η διαμερισματοποίηση στο χυμοτόπιου παίζει σημαντικό ρόλο στην Cd - αποτοξίνωση και ανοχή η οποία εμποδίζει την ελεύθερη κυκλοφορία των Cd ιόντων στο κυτόπλασμα και τα περιορίζει σε συγκεκριμένη περιοχή (Srirang and Murooka, 2007). Σε αντίθεση με τα παραπάνω και όπως έχει δειχθεί και σε άλλα φύκη, τα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα PC - Cd βρίσκονται κυρίως στο χλωροπλάστη στο *Chlamydomonas* (Hanikenne et al., 2009). Οι Soldo et al. (2005) βρήκαν ότι το εκτεθειμένο σε Cu^{2+} *Oocystis nephrocystioides* συσσωρεύσε υψηλή συγκέντρωση του μετάλλου στα θυλακοειδή και το πυρηνοειδές (Perales-Vela et al., 2006).

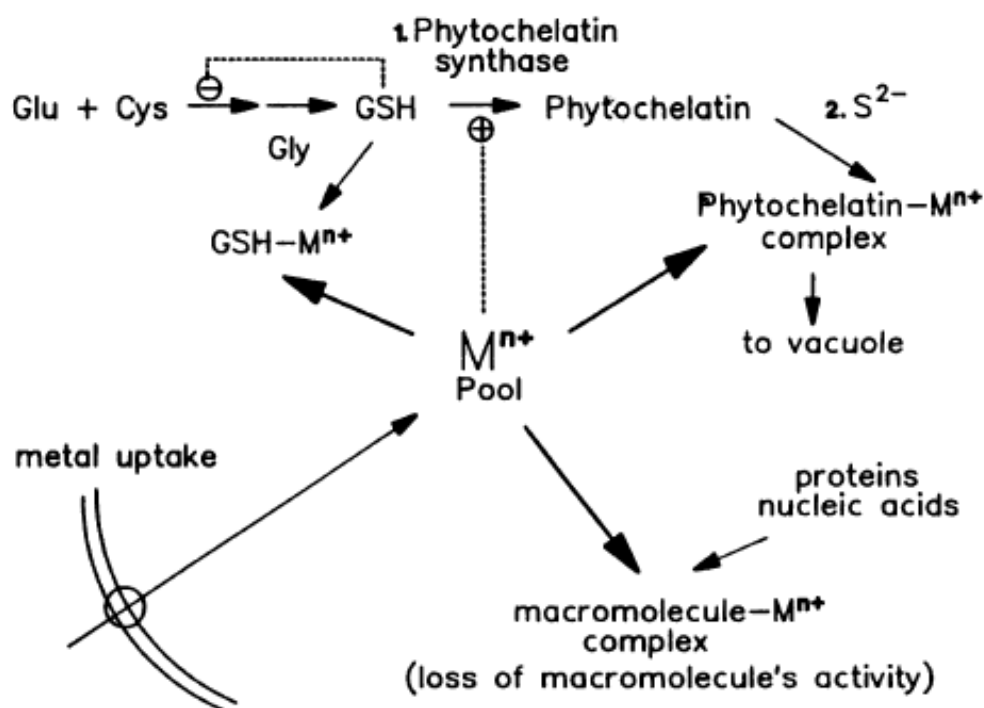
Το 1988, οι PCs απομονώθηκαν από διάφορα χλωροφύκη τα οποία είχαν εκτεθεί σε διάφορα μεταλλικά ιόντα. Μέχρι τότε, διάφορες μελέτες είχαν διεξαχθεί στην σύνθεση των PCs στους πλαγκτονικούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου του θαλάσσιου διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*, του *Dunaliella tertiolecta* και του *Chlamydomonas reinhardtii*. Σημαντικά επίπεδα PCs επίσης βρέθηκαν στα *Euglena gracilis*, *Fragilaria crotonensis*, *Sargassum muticum*, *Porphyridium cruentum* και *Karraphycus alvarezii* (Inouhe, 2005). Η PC βιοσύνθεση μπορεί να προκληθεί από βαρέα μέταλλα όπως Cd^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} και Au^{2+} τόσο in vivo όσο και in vitro (Perales-Vela et al., 2006). Η σύνθεση των PCs συγκρίθηκε σε διάφορα είδη θαλάσσιων φυκών καθώς επηρεάζονταν από διάφορα μέταλλα. Οι PCs

επάγονται στα θαλάσσια φυτά όπως *Salvinia minima*, *Lemna paucicostata*, *Hydrilla verticillata* και *Phragmites australis*. Το πιο αποτελεσματικό μέταλλο στην επαγωγή της PC σύνθεσης σε όλα τα παραπάνω φυτά ήταν το Cd ενώ άλλα μέταλλα ήταν αποτελεσματικά σε διαφορετικό βαθμό. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι ο Zn προκάλεσε ισχυρότερη επαγωγή της PC σύνθεσης στο *Dunaliella tertiolecta* ενώ το Cd και το As είναι γενικά περισσότερο αποτελεσματικά για διάφορα άλλα φυτά. Ο Zn ήταν αναποτελεσματικός για τον σχηματισμό της PC σε κάποια ανώτερα φυτά όπως περιγράφηκε αργότερα (Inouhe, 2005).

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι στο φύκος *Chlamydomonas reinhardtii*, διαπιστώθηκε ότι το Hg^{2+} δεν συμπλοκοποιήθηκε από τη PC, αλλά από τη GSH, παρέχοντας έτσι ενδείξεις για την επέκταση του ρόλου που μπορεί να περιλαμβάνει η GSH, όχι μόνο ως δότης γ – Glu – Cys για τις PCs αλλά και ως αποτοξικό μόριο, επάγοντας την άμεση δέσμευση του μετάλλου (Perales-Vela et al., 2006).

Η GSH είναι σε θέση να δεσμεύσει, να μεταφέρει και να αποθηκεύει διάφορα μέταλλα που επηρεάζουν τη μεταλλική ομοιόσταση σε βιολογικά συστήματα. Μέταλλα που έχουν αναφερθεί να δεσμεύονται από τη GSH είναι τα Cu, Se, Zn, Cr, Hg, As, Ag και Pb (Davidson et al., 2007). Είναι γνωστό ότι το τριπεπτίδιο αυτό συνεισφέρει στην ανοχή ενός μεγάλου εύρους οργανισμών σε μη ουσιώδη μέταλλα. Στο φύκος *Chlamydomonas*, η GSH είναι η κύρια ένωση που επάγεται μετά από έκθεση του σε Hg ενώ οι PCs είναι τα κύρια μέταλλο – δεσμευτικά πεπτίδια που επάγονται παρουσία Cd (Hanikenne et al., 2009). Πιθανόν, η GSH να είναι ο κύριος συμπλοκοποιητής στα φύκη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις μετάλλων ενώ οι PCs να γίνονται σημαντικές σε συγκεντρώσεις μετάλλων που προκαλούν οξεία τοξικότητα (Gaur and Rai, 2001).

Στην **Εικόνα 13**, παρουσιάζεται ένα μοντέλο της σύνθεσης της PC, της μεταλλικής αποτοξίνωσης και της ομοιόστασης. Τα μέταλλα όταν εμβολιάζονται σε ένα κυτταρικό εναιώρημα, εισέρχονται και συσσωρεύονται στο κύτταρο (M^{n+} δεξαμενή). Η γλουταθειόνη (GSH) που υπάρχει στο κύτταρο χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση της PC. Η συγκέντρωση της GSH στο κύτταρο ρυθμίζεται με αναστολή ανάδρασης. Αν υπερπαραχθεί GSH, η ίδια μπορεί άμεσα να δεσμεύσει μέταλλα όπως Ag, Hg αποτελεσματικά και Cd λιγότερο αποτελεσματικά. Τα μέταλλα στο κυτόπλασμα καταλύουν το σχηματισμό της PC η οποία με τη σειρά της δεσμεύει τα μέταλλα προς σχηματισμό συμπλόκου PC – μετάλλου. Το σύμπλοκο αυτό απομονώνει τα μέταλλα από το κυτόπλασμα και τα μεταφέρει στο χυμοτόπιο. Ένα μέρος αυτών μπορεί επίσης να διαμερισματοποιηθεί με πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και ένζυμα. Επίσης τα μέταλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από την M^{n+} δεξαμενή από αποένζυμα και πρωτεΐνες για μεταβολικές διεργασίες (Gaur and Rai, 2001).



Εικόνα 13. Προτεινόμενο μοντέλο της σύνθεσης της φυτοχελαιτίνης (PC), της μεταλλικής αποτοξίνωσης και ομοιόστασης (Gaur and Rai, 2001, Howe and Merchant, 1992).

1.3.6. Σύγκριση της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης

Στη βιοσυσσώρευση, ένα μέρος της προσροφούμενης ουσίας μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου, ελευθερώνοντας έτσι θέσεις σύνδεσης που βρίσκονται στην επιφάνεια αυτού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα επιπλέον ποσότητα της ουσίας να μπορεί να συνδέεται εκεί, σύμφωνα με την πορεία της ισορροπίας της βιορρόφησης. Έτσι δίνεται η δυνατότητα δέσμευσης ακόμα μεγαλύτερης ποσότητας προσροφούμενης ουσίας στη βιομάζα (Chojnacka, 2010).

Όσον αφορά τα 2 μονοπάτια απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων (βιορρόφηση και βιοσυσσώρευση), η βιορρόφηση είναι μια μεταβολικά παθητική διαδικασία που συμβαίνει χωρίς τη συμμετοχή τυχόν μεταβολικών λειτουργιών. Ως εκ τούτου, η βιομάζα που χρησιμοποιείται στη διαδικασία της βιορρόφησης δεν είναι απαραίτητα ζωντανή. Η βιοσυσσώρευση λαμβάνει χώρα υπό την παρουσία ζωντανών κυττάρων και απαιτεί υψηλότερες εισροές θρεπτικών ουσιών και ενέργειας. Επιπλέον, υπάρχει μια ανάγκη να αποφευχθεί η τοξική επίδραση των βαρέων μετάλλων στα κύτταρα η οποία μπορεί να βλάψει τη διαδικασία. Έτσι η διατήρηση ενός υγιούς μικροβιακού πληθυσμού καθίσταται δύσκολη λόγω της τοξικότητας των ρύπων και των ακατάλληλων περιβαλλοντικών παραγόντων (όπως pH και θερμοκρασίας) που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν (Park et al., 2010). Στο πλαίσιο αυτό, η ελάχιστη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών θα πρέπει να καθορίζεται

πριν από τη βιοσυσσώρευση. Ένα σημαντικό κλάσμα, έως 80 – 90% σε ορισμένες περιπτώσεις, που απομακρύνεται μέσω των κυττάρων των φυκών βρίσκεται επί της επιφανείας των κυττάρων (Gaur and Rai, 2001).

Λαμβάνοντας υπόψη όλες αυτές τις πτυχές, η βιοσυσσώρευση ως μέθοδος απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων είναι περισσότερο περίπλοκη και δαπανηρή καθώς απαιτεί πιο πολύπλοκα συστήματα βιοαντιδραστήρων. Παρόλα αυτά, η σύγκριση μεταξύ βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης των βαρέων μετάλλων από τα κύτταρα φυκών είναι πολύ περιορισμένη βιβλιογραφικά (Flouty and Estephane, 2012, Park et al., 2010). Ο **Πίνακας 5** παρουσιάζει μια λεπτομερή σύγκριση των 2 αυτών μεθόδων (Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).

Πίνακας 5. Σύγκριση της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης (Eccles, 1999, Kadukova and Vircikova, 2005, Lo et al., 2014, Zabochnicka-Świątek and Krzywonos, 2014).

Βιορρόφηση	Βιοσυσσώρευση
Κόστος	
Συνήθως χαμηλό. Η βιομάζα μπορεί να ληφθεί από βιομηχανικά απόβλητα. Το κόστος καλύπτει κυρίως τη μεταφορά και την παραγωγή του βιορροφητικού.	Συνήθως υψηλό. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα υπό την παρουσία ζωντανών κυττάρων από τα οποία πρέπει να υποστηριχθεί.
pH	
Επηρεάζει έντονα τη ροφητική ικανότητα των μετάλλων. Ωστόσο, η διαδικασία μπορεί να συμβεί σε ένα ευρύ φάσμα pH.	Σημαντικές αλλαγές στο pH μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τα ζωντανά κύτταρα.
Ικανότητα πρόσληψης	
Πολύ υψηλή καθώς η βιομάζα είναι σε θέση να φιλοξενήσει ένα ποσό προσροφημένων ουσιών σχεδόν τόσο υψηλό όσο και το ξηρό της βάρος.	Χαμηλή καθώς τα ζωντανά κύτταρα είναι ευαίσθητα σε υψηλές συγκεντρώσεις τέτοιων ουσιών. Η βιοσυσσώρευση αντιπροσωπεύει μόνο το 0,5 – 2% του ξηρού βάρους των κυττάρων
Ποσοστό απομάκρυνσης	
Οι περισσότεροι μηχανισμοί εμφανίζονται σε ένα γρήγορο ρυθμό.	Βραδύτερος ρυθμός από ό, τι στην περίπτωση της βιορρόφησης.
Αναγέννηση και επαναχρησιμοποίηση	
Το βιορροφητικό μπορεί να αναγεννηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί σε πολλούς κύκλους.	Λόγω ενδοκυτταρικής συσσωρευσης, η επαναχρησιμοποίηση είναι μάλλον περιορισμένη.
Ανάκτηση μετάλλων	
Με κατάλληλο μέσον έκλουσης, η ανάκτηση των μετάλλων είναι δυνατή.	Εάν είναι ακόμη δυνατόν, η βιομάζα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλους σκοπούς.
Ενεργειακές απαιτήσεις	
Συνήθως χαμηλές.	Ενέργεια απαιτείται για την κυτταρική ανάπτυξη.

1.3.7. Σκοπός της παρούσας έρευνας

Οι τυπικές δοκιμές βιοτοξικότητας αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων των ρύπων στην κυτταρική ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα. Οι δοκιμές αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την αξιολόγηση των δυνητικών επιπτώσεων της ρύπανσης στα υδάτινα οικοσυστήματα, με στόχο την αποτροπή πιθανών βλαβών στο βιόκοσμο με τον καθορισμό των ανώτατων ανεκτικών επιπέδων των τοξικών ουσιών (Pinto et al., 2003). Ο οργανισμός *Chlamydomonas reinhardtii*, έχει χρησιμοποιηθεί ως ένας ικανοποιητικός δείκτης ρύπανσης καθώς είναι απλός και ευρέως διαδεδομένος σε διάφορα περιβάλλοντα. Έτσι, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις τοξικές επιδράσεις των ρύπων στις γενικές μεταβολικές διαδικασίες και στις αποκρίσεις των υδατινών οικοσυστημάτων στη ρύπανση των βαρέων μετάλλων.

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η εκτίμηση της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (Cu, Zn, Ni και As) στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* σε συνάρτηση με το χρόνο (για διάστημα 72 ωρών) καθώς και η εκτίμηση της ικανότητας του να απομακρύνει Cu από υδατικά διαλύματα.

Τα συγκεκριμένα μέταλλα και το As επιλέχθηκαν λόγω του ότι θεωρούνται από τους πιο κοινούς ρύπους βαρέων μετάλλων (Gurta and Sharma, 2014) και λόγω άμεσης διαθεσιμότητας τους για το παρόν πείραμα.

Οι πειραματικές μετρήσεις περιελάμβαναν:

- Την εκτίμηση της ανάπτυξης των καλλιεργειών
- Τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων
- Τη μέτρηση των συνολικών χλωροφυλλών και πρωτεϊνών των κυττάρων
- Την εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu με τη διαδικασία της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης αντίστοιχα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Τα στελέχη του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* που διατέθηκαν για το παρόν πείραμα ήταν τα εξής αγρίου τύπου (wild type strains):

- CC – 1690
- CC – 125

Τα στελέχη αγοράσθηκαν από τον Φορέα παροχής και συντήρησης στελεχών χλαμυδομονάδας, Chlamydomonas Resource Center ο οποίος εδρεύει στο Τμήμα Βιολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου της Μινεσότα, ΗΠΑ.

Ύστερα από επανειλημμένες καλλιέργειες αυτών των στελεχών, διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος CC – 1690 είχε καλύτερη ανάπτυξη (πιο εύρωστα κύτταρα, καλύτερη προσαρμοστικότητα σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού, υψηλότερη κινητικότητα και χαμηλότερο ποσοστό stress). Έτσι, δεδομένου και του ότι αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο και χρησιμοποιούμενο στέλεχος με πλούσια βιβλιογραφική αναφορά, το συγκεκριμένο στέλεχος επιλέχθηκε για το παρόν πείραμα.

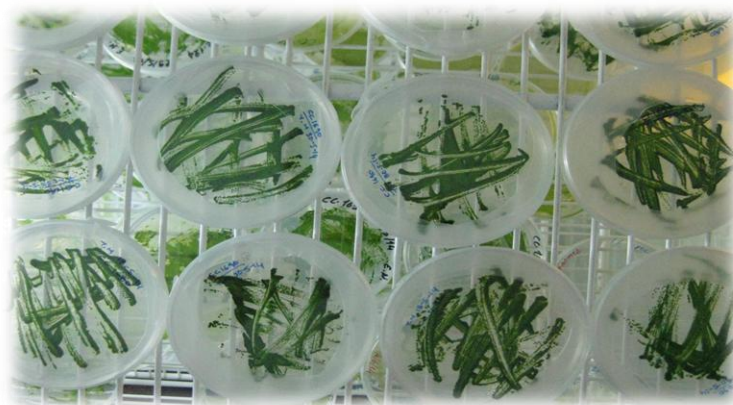
2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Προκειμένου να επιτευχθεί η μακρά συντήρηση των μητρικών καλλιεργειών προς πειραματική χρήση, τα κύτταρα υπό ασηπτικές συνθήκες, σε εστία νηματικής ροής εμβολιάζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα [1,5% άγαρ (*Fluka*)] και διατηρούνταν σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης, υπό ελεγχόμενες συνθήκες (**Πίνακας 6**), για διάρκεια της τάξης του ενός μήνα (**Εικόνα 14**).

Τα κύτταρα του οργανισμού εμβολιάζονταν στο υγρό θρεπτικό μέσο, επίσης υπό ασηπτικές συνθήκες, σε εστία νηματικής ροής έτσι ώστε να αποφευχθεί κάθε πιθανότητα μόλυνσης. Πριν τη χρήση τους, τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121 ° C για 20 λεπτά. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους καθώς και όλων των αντιδραστηρίων ήταν υπερκάθαρο. Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα προ – πλύθηκαν και αφέθηκαν σε HCl 2M για τουλάχιστον 1 ημέρα προκειμένου να απομακρυνθούν οι τυχόν μεταλλικές προσμίξεις της επιφάνειας και ξεπλύθηκαν 4 φορές με υπερκάθαρο νερό πριν τη χρήση τους (Batley and Gardner, 1977).

Πίνακας 6. Επικρατούσες συνθήκες συντήρησης των κυττάρων του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii*.

Θερμοκρασία	≈ 25 °C
Υγρασία	41%
Φωτισμός	300 ± 50 lux



Εικόνα 14. Μακρά συντήρηση του *Chlamydomonas reinhardtii* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Ο οργανισμός αφού καλλιεργήθηκε επανειλημμένες φορές σε διαφορετικά υγρά θρεπτικά μέσα, ετεροτροφικά (οξικό οξύ / σκοτάδι), αυτοτροφικά (CO₂ / φως) και μιξοτροφικά (οξικό οξύ / φως) και αφού αξιολογήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του σε αυτά, τελικά επιλέχθηκε η μιξοτροφική ανάπτυξη του οργανισμού στο Tris – Acetate – Phosphate (TAP) μέσο καλλιέργειας (**Πίνακας 7**) το οποίο εκτιμήθηκε ως το πιο κατάλληλο για τη βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων ενώ ταυτόχρονα αποτελεί και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υγρό μέσο καλλιέργειας (Harris, 2009).

Πίνακας 7. Σύνθεση υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας [Tris – Acetate – Phosphate (TAP) culture medium], (Gorman and Levine, 1965).

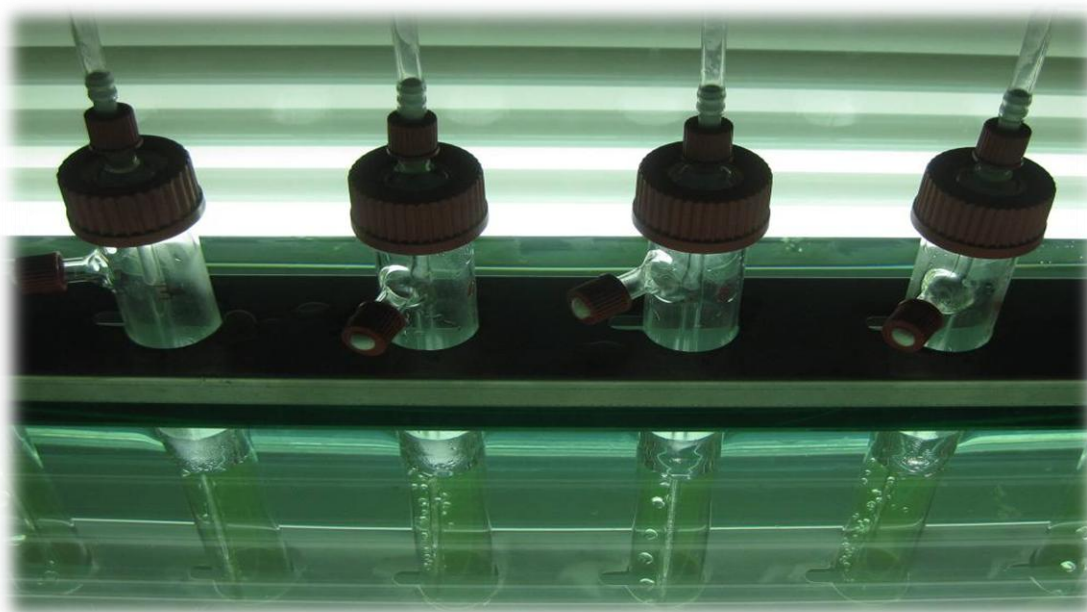
Stock διάλυμα	Ποσότητα στο τελικό διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση στο stock διάλυμα
Tris base	2,42 g · L ⁻¹	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃ (Sigma)	
TAP-salts	25 ml · L ⁻¹	NH ₄ Cl (Fluka)	15 g · L ⁻¹
		MgSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)	4 g · L ⁻¹
		CaCl ₂ · 2H ₂ O (Sigma)	2 g · L ⁻¹
Phosphate solution	0,375 ml · L ⁻¹	K ₂ HPO ₄ (Merck)	28,8 g · 100 ml ⁻¹
		KH ₂ PO ₄ (Merck)	14,4 g · 100 ml ⁻¹
Trace elements solution (Hutner trace elements)	1 ml · L ⁻¹	EDTA disodium salt (Merck)	5 g · 100 ml ⁻¹
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)	2,200 g · 100 ml ⁻¹
		H ₃ BO ₃ (Sigma)	1,140 g · 100 ml ⁻¹

Πίνακας 7. (συνέχεια)

Stock διάλυμα	Ποσότητα στο τελικό διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση στο stock διάλυμα
		MnCl ₂ · 4H ₂ O (Sigma)	0,506 g · 100 ml ⁻¹
		CoCl ₂ · 6H ₂ O (Sigma)	0,161 g · 100 ml ⁻¹
		CuSO ₄ · 5H ₂ O (Sigma)	0,157 g · 100 ml ⁻¹
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O (Sigma)	0,110 g · 100 ml ⁻¹
		FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)	0,499 g · 100 ml ⁻¹
Οξικό οξύ	1 ml · L ⁻¹	CH ₃ COOH (Fluka)	

2.3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η ανάπτυξη του οργανισμού (υγρή καλλιέργεια) πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένους βιοαντιδραστήρες (**Εικόνα 15**). Το εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολόγων Γεωπόνων του Τ.Ε.Ι. Κρήτης, διαθέτει 2 συστήματα (**Εικόνα 16**) τα οποία περιλαμβάνουν δεξαμενή νερού ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, μέσα στην οποία τοποθετούνται γυάλινοι και πρωτίστως αποστειρωμένοι σωλήνες ανάπτυξης, κυλινδρικού σχήματος (10 βιοαντιδραστήρες / σύστημα), με δυνατότητα αυστηρά ελεγχόμενης παροχής αέρα καθώς και φωτεινές πηγές με δυνατότητα ρύθμισης της έντασης φωτισμού. Επιπλέον, κάθε δεξαμενή περιλαμβάνει σύστημα φιλτραρίσματος και ανακύκλωσης νερού.



Εικόνα 15. Ειδικά διαμορφωμένοι βιοαντιδραστήρες μέσα στους οποίους πραγματοποιήθηκε η υγρή καλλιέργεια του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii*.



Εικόνα 16. Ένα εκ των 2 συστημάτων καλλιέργειας του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* που διαθέτει το εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Το κάθε σύστημα περιλαμβάνει δεξαμενή νερού (Α), μέσα στην οποία τοποθετούνται 10 βιοαντιδραστήρες (Β), σύστημα παροχής αέρα (Γ) καθώς και λάμπες ψυχρού φωτισμού (Δ). Η θερμοκρασία ρυθμίζεται από έναν ψηφιακό ελεγκτή θερμοκρασίας (Ε) μέσω ενός σένσορα (ΣΤ) που τοποθετείται μέσα στη δεξαμενή νερού. Το νερό περνά μέσα από φίλτρα (Ζ) με τη βοήθεια αντλιών (Η) και ανακυκλώνεται.

2.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Όσον αφορά τη θερμοκρασία καλλιέργειας του οργανισμού, τα συνήθη εργαστηριακά είδη του *Chlamydomonas* αναπτύσσονται καλά στην περιοχή των 20 – 25 °C. Ο φωτισμός επιλέχθηκε συνεχής καθώς έτσι επιτυγχάνεται ταχεία λογαριθμική ανάπτυξη στο υγρό μέσον (Harris, 2009). Λόγω ύπαρξης μικρών διαφορών στην ένταση φωτισμού μεταξύ των θέσεων των βιοαντιδραστήρων του κάθε συστήματος, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικό πείραμα προκειμένου να ελεγχθεί η ανάπτυξη των κυττάρων του οργανισμού συναρτήσει των θέσεων τοποθέτησης των βιοαντιδραστήρων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του οργανισμού και στους 10 βιοαντιδραστήρες, καλύπτοντας έτσι όλες τις διαθέσιμες θέσεις του ενός εκ των 2 συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε βιοαντιδραστήρα τοποθετήθηκε ίδια ποσότητα εναιωρήματος καλλιέργειας και πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων από κάθε καλλιέργεια ανά τακτά χρονικά διαστήματα (0, 24, 48, 72 και 120 ώρες) για διάστημα 5 ημερών.

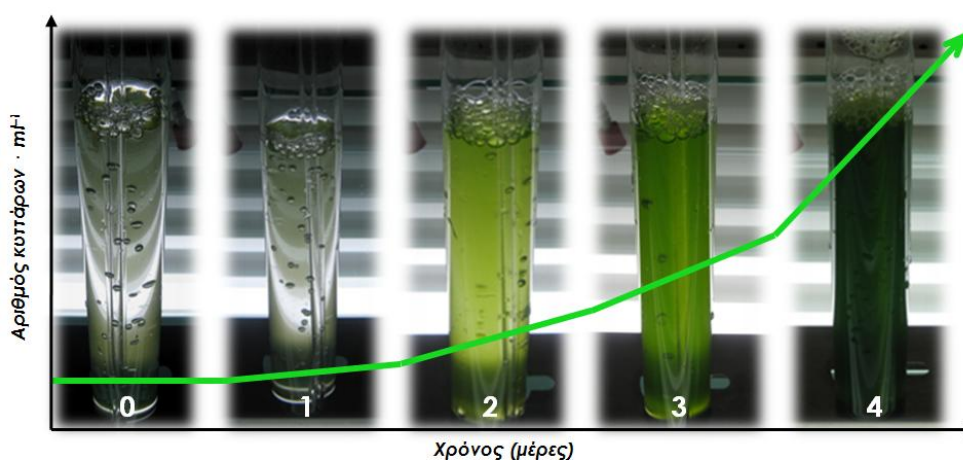
Προκειμένου οι καλλιέργειες να αναδεδούνται, χρησιμοποιήθηκε σύστημα παροχής αέρα, όχι μόνο για τον αερισμό των καλλιιεργειών αλλά και για την αποφυγή της σκίασης των κυττάρων στο εσωτερικό των βιοαντιδραστήρων. Για την εξάλειψη μολυσματικών παραγόντων, ο παρεχόμενος αέρας διοχετευόταν μέσα από φίλτρο κατασκευασμένο από αποστειρωμένο βαμβάκι (Harris, 2009). Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού που επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii*.

Παράμετροι	Συνθήκες
Ποιότητα φωτός	Λαμπτήρες ψυχρού φωτισμού
Διάρκεια φωτισμού	Συνεχής
Ένταση φωτισμού:	5200 lux
Θερμοκρασία:	21 ± 1 °C
Πίεση παρεχόμενου αέρα	0,5 bar
Χωρητικότητα βιοαντιδραστήρων	500 ml
Όγκος καλλιιεργειών	50 – 150 ml
Υγρό μέσο καλλιιεργειας	TAP Medium
pH	7 ± 0,2

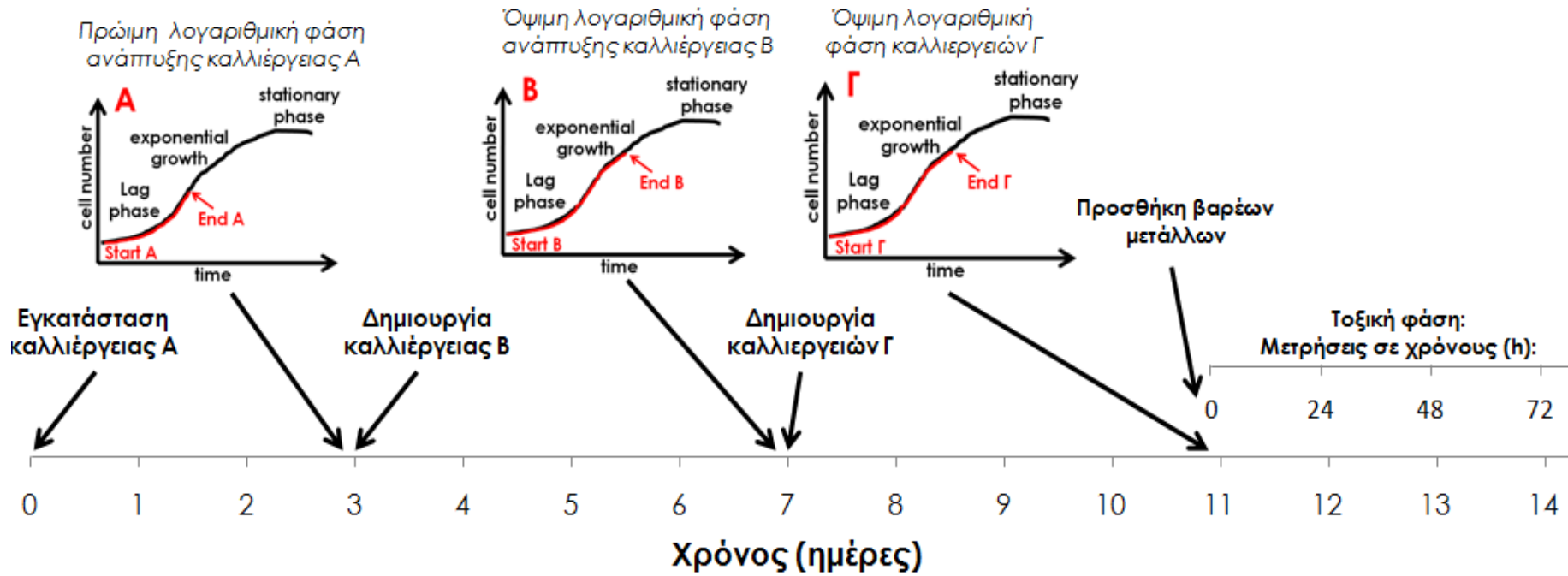
2.5. ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Προκαταρκτικά πειράματα διεξήχθησαν για τη καταγραφή της καμπύλης ανάπτυξης της καλλιέργειας σε σχέση με το χρόνο (**Εικόνα 17**). Στόχος αυτών των πειραμάτων ήταν να βρεθεί η χρονική περίοδος όπου οι καλλιέργειες θα έφταναν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης καθώς αποτέλεσε τη περίοδο έκθεσης του οργανισμού στα βαρέα μέταλλα. Ο λόγος επιλογής αυτού του σταδίου ανάπτυξης του οργανισμού για τη μεταχείριση του με τα βαρέα μέταλλα ήταν το γεγονός ότι τα κύτταρα αυξάνονται σε αριθμό χωρίς παράλληλα να έχουν εξαντληθεί τα αποθέματα θρεπτικών ουσιών στο υγρό μέσο καλλιέργειας (Shehata and Badr, 1980).



Εικόνα 17. Μακροσκοπική απεικόνιση των σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας σε χρόνους της τάξης των ημερών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση stock καλλιέργειας (καλλιέργεια Α) και όγκου 50 ml προκειμένου να επιτευχθεί η σταδιακή προσαρμογή του οργανισμού στις νέες συνθήκες καλλιέργειας. Τη 3^η μέρα της πειραματικής διαδικασίας, όπου η καλλιέργεια Α είχε φτάσει τη πρώιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των κυττάρων με αραιώση της καλλιέργειας Α κατά 1/10. Έτσι δημιουργήθηκε η καλλιέργεια Β. Με αυτή τη διαδικασία επιτεύχθηκε ξανά εκθετική ανάπτυξη του μικροοργανισμού και παράλληλα μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων. Κατά την 7^η μέρα της πειραματικής διαδικασίας, όπου η καλλιέργεια Β έφτασε την όψιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση των καλλιεργειών του πειράματος (καλλιέργειες Γ). Πιο συγκεκριμένα, μικρές ποσότητες εναιωρήματος (γνωστού αριθμού κυττάρων / ml) της καλλιέργειας Β ελήφθησαν προκειμένου να δημιουργηθούν οι καλλιέργειες Γ, με περιεκτικότητα $3 \cdot 10^5$ κύτταρα $\cdot \text{ml}^{-1}$ και όγκου 150 ml η κάθε μια. Οι καλλιέργειες Γ, αφού αφέθηκαν να φτάσουν την όψιμη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (έως την 11^η μέρα της πειραματικής διαδικασίας), μεταχειρίστηκαν με τα βαρέα μέταλλα. Πιο αναλυτικά, σε αυτές προστέθηκαν μεμονωμένα τα βαρέα μέταλλα (Cu, Zn, Ni και As). Ο χρόνος έκθεσης του οργανισμού σε αυτά (τοξική φάση) διήρκησε 3 μέρες (από την 11^η – 14^η μέρα της πειραματικής διαδικασίας), (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18. Χρονοδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για κάθε μεταχείριση με τα βαρέα μέταλλα. Καλλιέργεια A: Η stock καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε αρχικά. Καλλιέργεια B: Η καλλιέργεια που προέκυψε με αραιώση της καλλιέργειας A κατά 1/10. Καλλιέργειες Γ: Οι καλλιέργειες που προέκυψαν από μικρές ποσότητες εναιωρήματος της καλλιέργειας B. Τοξικής φάση: Φάση έκθεσης των καλλιεργείων σε Cu, Zn, Ni και As.

Τα βαρέα μέταλλα με τα οποία μεταχειρίστηκαν οι καλλιέργειες Γ, προστεθήκαν υπό μορφή αλάτων (για τα Cu, Zn και Ni) και οξειδίου (για το As) σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (συμπεριλαμβανομένης και της μηδενικής συγκέντρωσης που αποτέλεσε τον μάρτυρα) της τάξης των mM το ένα, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**. Η επιλογή αυτής της τάξης μεγέθους συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων έγινε με βάση προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με το Cu. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (της τάξης των μM), δεν υπήρχε καμία μετρήσιμη ανταπόκριση του οργανισμού έναντι στο μέταλλο. Αρχικά παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα αυτών (συγκεντρώσεων της τάξης των M και αφού τα διαλύματα αποστειρώθηκαν, αραιώθηκαν κατάλληλα στις υγρές καλλιέργειες ώστε να επιτευχθούν οι επιδιωκόμενες συγκεντρώσεις αυτών.

Πίνακας 9. Ενώσεις και συγκεντρώσεις των προστιθέμενων βαρέων μετάλλων στις υγρές καλλιέργειες του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii*.

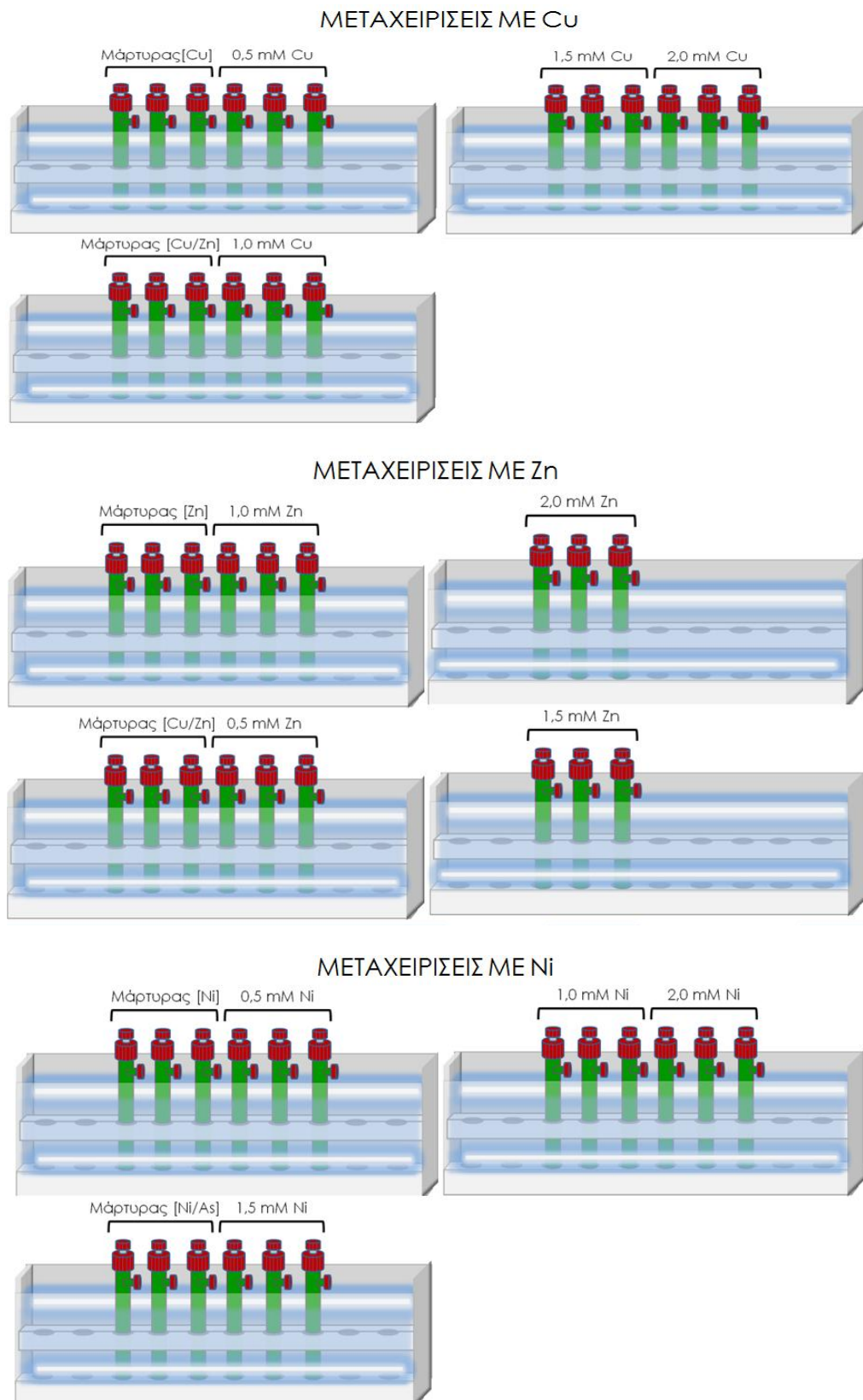
Βαρέα μέταλλα	Ενώσεις βαρέων μετάλλων*	Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (mM)				
Cu	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Zn	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Ni	Nickel Standard for AAS (1000 mg/L Ni in nitric acid)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
As	As ₂ O ₃	0	0,5	1,0	1,5	2,0

*Υψηλής καθαρότητας (Analytical Grade)

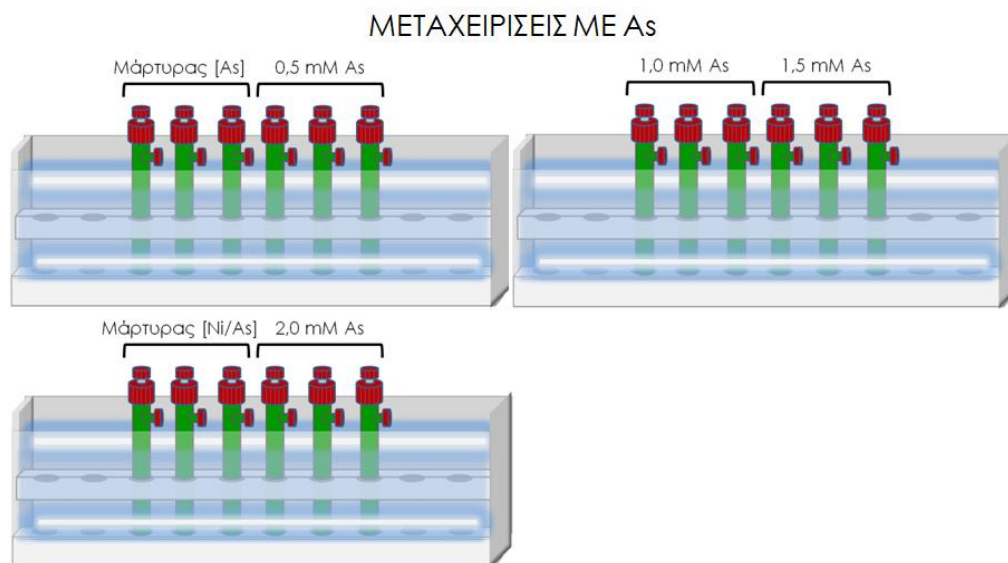
Σημειώνεται ότι το pH των καλλιεργειών ρυθμίστηκε αρχικά στο 6,5 – 7,3 και δεν ελέγχθηκε ξανά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στις **Εικόνες 19, 20** παρουσιάζεται η διάταξη των καλλιεργειών που μεταχειρίστηκαν με τις διάφορες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων.

Κατά τη διάρκεια της τοξικής φάσης (φάση έκθεσης των καλλιεργειών σε Cu, Zn, Ni και As), ελήφθησαν δείγματα μικρών ποσοτήτων (≈ 30 ml) από κάθε καλλιέργεια σε χρόνους: 0, 24, 48, και 72 ώρες μετά τη προσθήκη αυτών και ακολούθησε ανάλυση ως προς:

- Την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των κυττάρων των καλλιεργειών
- Την εκτίμηση των χλωροφυλλών του οργανισμού
- Το ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών πρωτεϊνών
- Την ικανότητα δέσμευσης του Cu από τον μικροοργανισμό (με τη διαδικασία προσρόφησης και βιοσυσσώρευσης) και απομάκρυνσης του από το υγρό μέσο καλλιέργειας.



Εικόνα 19. Διάταξη καλλιεργειών με τις διάφορες μεταχειρίσεις Cu, Zn και Ni.



Εικόνα 20. Διάταξη καλλιέργειών με τις διάφορες μεταχειρίσεις As.

2.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΞΗΡΗΣ ΜΑΖΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Δεδομένη ποσότητα υγρής καλλιέργειας (50 ml) και γνωστού αριθμού κυττάρων τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο falcon και αφού φυγοκεντρήθηκε σε 5.000 x g για 20 min, το ίζημα ζυγίστηκε (g νωπού βάρους) και αφέθηκε προς ξήρανση στους 80 °C για 1 ημέρα. Μετά τη ξήρανση το ίζημα αφέθηκε σε ηρεμία μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και ζυγίστηκε (g ξηρού βάρους). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 4 φορές και ανάλογα τη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει σημαντική διαφορά βάρους μεταξύ κυττάρων διαφορετικής ανάπτυξης (Richmond, 2008). Έτσι με βάση τους υπολογισμούς, $3 \cdot 10^5$ κύτταρα αντιστοιχούν σε περίπου 0,04 mg ξηρής βιομάζας.

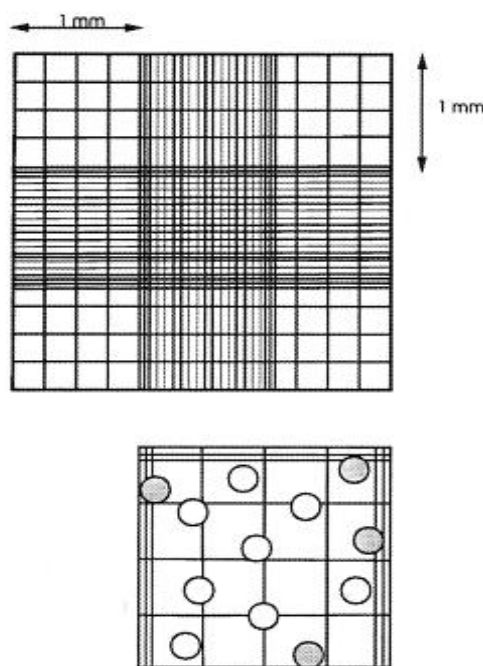
2.7. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Μετά το πέρας των 72 ωρών από τη προσθήκη των βαρέων μετάλλων, οι καλλιέργειες παρατηρήθηκαν και συγκρίθηκαν τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά. Προκειμένου να γίνει δυνατή η σύγκριση αυτή, επιλέχθηκαν οι πιο αντιπροσωπευτικές καλλιέργειες (μεταξύ των εκάστοτε επαναλήψεων ανά περίπτωση). Η μακροσκοπική παρατήρηση έγινε με βάση των χρώμα των καλλιέργειών και τη δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων στα τοιχώματα των

βιοαντιδραστήρων. Η μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιιεργειών έγινε κυρίως με βάση το χρώμα, το σχήμα το μέγεθος των κυττάρων καθώς και με τη τάση δημιουργίας κυτταρικών συσσωματωμάτων.

2.8. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η εκτίμηση της ανάπτυξης των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικά, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πριν και κυρίως μετά την προσθήκη βαρέων μετάλλων και πιο συγκεκριμένα, καταγράφοντας τον αριθμό κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου (Thoma chamber), (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση του αιμοκυτταρόμετρου (Martin, 2013).

Πιο αναλυτικά, σε 90 μL εναιωρήματος καλλιιεργείας προστέθηκαν 10 μL ιωδιούχου διαλύματος [αντιδραστήριο Lugol (Merck)] για την ακινητοποίηση των κυττάρων του οργανισμού και ακολούθησε η καταμέτρηση και αναγωγή αυτών σε 1 ml καλλιιεργείας (Adams, 2011).

Ως προς τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου, μια σταγόνα διαλύματος εφαρμόστηκε σε κάθε πλέγμα της αντικειμενοφόρου πλάκας. Στη συνέχεια, με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου μετρήθηκαν τα κύτταρα που βρίσκονταν στα 4 γωνιακά τετράγωνα το κάθε πλέγματος. Για τον υπολογισμό των κυττάρων ανά μονάδα όγκου διαλύματος (N , κύτταρα / ml) χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση.

$$N = \frac{M.O.}{\Sigma.A.} \cdot \frac{1}{V_{\text{πλέγματος}}}$$

όπου

M.O.: Ο μέσος όρος κυττάρων που προέκυψε από [αριθμός κυττάρων]
την καταμέτρηση αυτών και στα 2 πλέγματα.

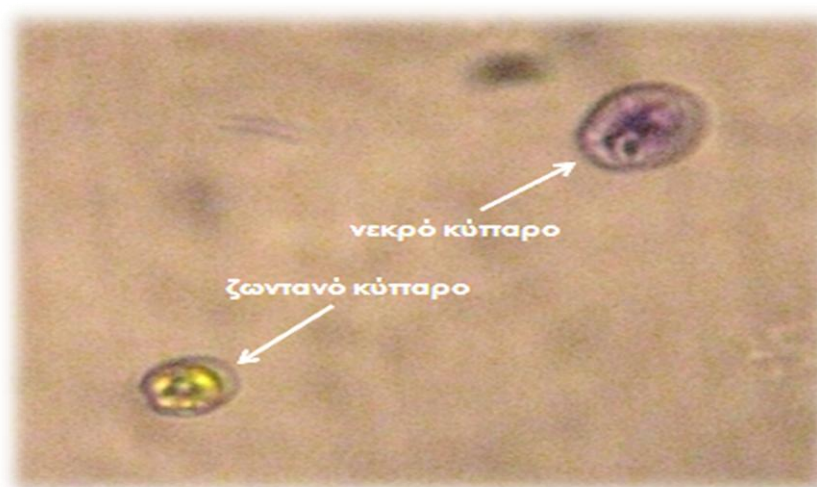
Σ.Α.: Ο συντελεστής αραιώσης της καλλιέργειας. [9/10]

V_{πλέγματος}: Ο όγκος του κάθε πλέγματος. [0,1 · 10⁻³ ml]

2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η βιωσιμότητα των κυττάρων των καλλιεργειών (αριθμός ζωντανών κυττάρων) προσδιορίστηκε με τη τεχνική της χρώσης των νεκρών κυττάρων με διάλυμα κυανού του τρυπανίου [trypan blue 0.4% w/v (*Sigma*)], (Chader, 2006). Η χρωστική αυτή έχει την ιδιότητα να εισέρχεται στα κύτταρα που είναι νεκρά και να τα χρωματίζει (μπλε – καφέ χρώμα). Τα ζωντανά κύτταρα παραμένουν αχρωμάτιστα, αφού η χρωστική δεν εισέρχεται σε αυτά (**Εικόνα 22**).

Πιο συγκεκριμένα, 0,1 ml εναιωρήματος κυττάρων διαλύοταν σε 0,25 ml διαλύματος χρωστικής trypan blue 0,4% w/v και σε 0,15 ml NaCl 0,9% w/v (*Riedel-de Haën*). Μετά το πέρας 5 – 10 λεπτών ηρεμίας του δείγματος έγινε καταγραφή του αριθμού νεκρών κυττάρων μικροσκοπικά με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου, ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε στην **Υποενότητα 2.8**. Για τη παρασκευή του διαλύματος χρωστικής χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Phosphate – buffered saline (PBS) όπου η σύνθεση του παρουσιάζεται στον **Πίνακα 10**.



Εικόνα 22. Μικροσκοπική απεικόνιση των νεκρών και ζωντανών κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii*.

Πίνακας 10. Σύνθεση διαλύματος Phosphate – buffered saline (PBS), (2006).

Συστατικά	Ποσότητα στο τελικό διάλυμα
NaCl (<i>Riedel-de Haën</i>)	8,0 g · L ⁻¹
KCl (<i>Merck</i>)	0,2 g · L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (<i>Merck</i>)	4,0 g · L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ (<i>Merck</i>)	0,24 g · L ⁻¹

2.10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ

Ποσότητα δείγματος 2 ml φυγοκεντρήθηκε σε 4.000 x g για 10 min, ώστε να γίνει η συλλογή των κυττάρων. Στο ίζημα προστέθηκαν 2 – 3 ml αιθανόλης 100% (*Panreac*) για την εκχύλιση των χλωροφυλλών και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 80 °C έως ότου να είναι εμφανής ο αποχρωματισμός των κυττάρων (≈ 5 min). Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 4.000 x g για 10 min και αφού συλλέχθηκε το υπερκείμενο, ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης αυτού στα 665 & 649 nm. Ο υπολογισμός των χλωροφυλλών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις (*Ritchie*, 2006):

$$\text{Chla (}\mu\text{g/ml)} = 13,7 \cdot A_{665} - 5,76 \cdot A_{649}$$

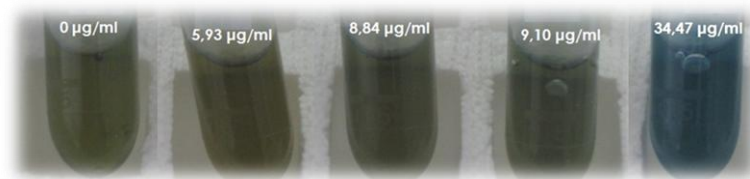
$$\text{Chlb (}\mu\text{g/ml)} = -7,6 \cdot A_{665} + 25,8 \cdot A_{649}$$

$$\text{Total Chl (a + b) (}\mu\text{g/ml)} = \text{Chla (}\mu\text{g/ml)} + \text{Chlb (}\mu\text{g/ml)}$$

2.11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford η οποία βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος μιας χρωστικής όταν υπάρχουν στο διάλυμα μόρια πρωτεΐνης (**Εικόνα 23**), (*Bradford*, 1976). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην παρατήρηση της αλλαγής του χρώματος της χρωστικής όταν αυτή δημιουργεί σύμπλοκο με πρωτεΐνη όπου το σημείο της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα δείγματος 1 ml φυγοκεντρήθηκε σε 4000 x g για 10 min. Στο ίζημα προστέθηκαν 150 μL NaOH 1N (*Merck*) για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Ακολούθησε ανάδευση αυτού και κατόπιν αφέθηκε σε ηρεμία για 15 min. Στη συνέχεια, αφού προετοιμάστηκαν τα δείγματα, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**, μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 595 nm.



Εικόνα 23. Δείγματα διαφορετικής περιεκτικότητας πρωτεϊνών, μεταχειρισμένα με Bradford χρωστική.

Πίνακας 11. Προετοιμασία δειγμάτων προς μέτρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Τυφλό	Δείγματα
10 µL NaOH	10 µL υπερκείμενο
1 ml αντιδραστηρίου Bradford	1 ml αντιδραστηρίου Bradford

Με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε από πρωτεϊνικά διαλύματα αλβουμίνη βοείου (*Bovine serum albumin – BSA(Sigma)*) γνωστών συγκεντρώσεων (εύρους 5 – 100 µg) και με τη μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας στα 595 nm, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνες (µg / ml).

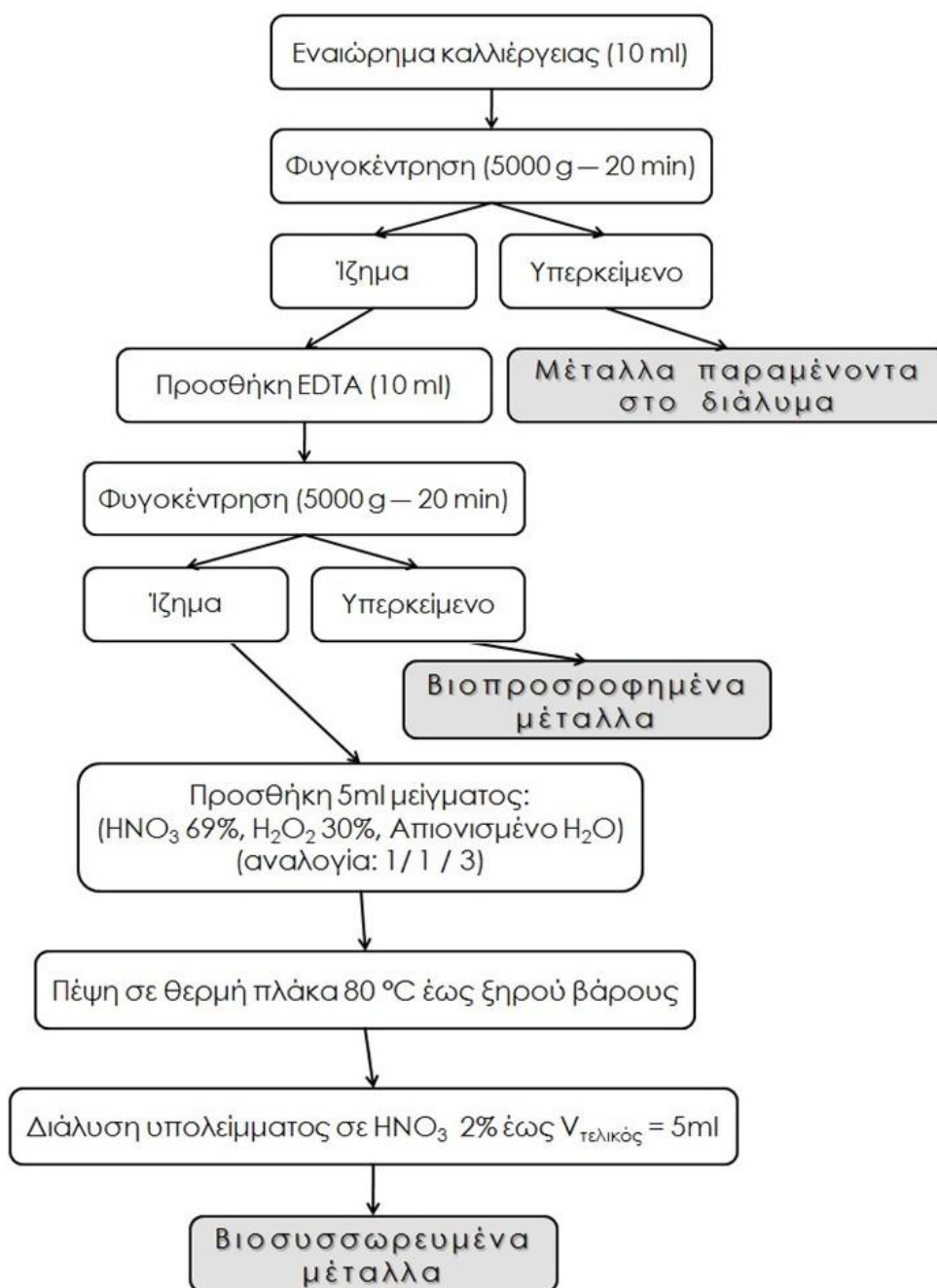
Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου Bradford, 50 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Merck*) διαλύθηκαν σε 25 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 95% (*Panreac*). Το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε καλά και στο τέλος προστέθηκαν σε αυτό 50 ml ορθοφωσφορικού οξέος 85% (*Mallinckrodt*). Το προκύπτον διάλυμα αραιώθηκε σε τελικό όγκο των 500 ml (Bradford, 1976).

2.12. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

2.12.1. Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων προς μέτρηση

Η απομάκρυνση του Cu εκτιμήθηκε με περιοδική συλλογή δειγμάτων κατά την τοξική φάση. Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα εναιωρήματος των καλλιεργειών (10 ml) φυγοκεντρήθηκε σε 5000 x g για 20 min προκειμένου να συλληθούν τα κύτταρα του μικροοργανισμού. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και μετρήθηκε δίνοντας τη ποσότητα των μετάλλων που δεν απομακρύνθηκαν από τα κύτταρα αλλά παρέμειναν στο διάλυμα (**Μέταλλα παραμένοντα στο διάλυμα**). Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml EDTA 0,5 M (*Merck*) και φυγοκεντρήθηκε σε 5.000 x g για 20 min. Το υπερκείμενο που προέκυψε, αναλύθηκε δίνοντας την ποσότητα των μετάλλων που προσροφήθηκαν στην επιφάνεια των κυττάρων (**Βιοπροσροφημένα μέταλλα**). Στο προκύπτον ίζημα προστέθηκαν 5 ml διαλύματος το οποίο αποτελούταν από HNO₃ ≥ 69%

(Sigma), H_2O_2 30% (Panreac) και H_2O σε αναλογία 1/1/3. Ακολούθησε πέψη διαλύματος σε θερμή πλάκα στους 80 °C έως ξηρού βάρους. Κατόπιν στο υπόλειμμα προστέθηκε HNO_3 2% έως ο τελικός όγκος ρυθμιστεί στα 5 ml και ακολούθησε ανάλυση αυτού για την εύρεση της ποσότητας των μετάλλων που συγκρατούνται ενδοκυτταρικά (**Βιοσυσσωρευμένα μέταλλα**), (Bates et al., 1982), (**Εικόνα 24**). Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν διηθήθηκαν (Whatman filter papers, grade 42) και μετά μετρήθηκαν με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS).



Εικόνα 24. Διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση της δέσμευσης του Cu από το *Chlamydomonas reinhardtii*.

2.12.2. Ποσοτικός προσδιορισμός χαλκού

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Cu εκτιμήθηκε με το φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (μοντέλο: Perkin – Elmer 2100 Atomic Absorption Spectrophotometer), (**Εικόνα 25**) με τη τεχνική της φλόγας. Ως οξειδωτικό χρησιμοποιήθηκε αέρας και ως καύσιμο ασετιλίνη. Η βαθμονόμηση της συσκευής έγινε με πρότυπα διαλύματα που κατασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις stock διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης [Copper Standard for AAS – 1000 mg/L (Fluka)]. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης ήταν $r^2 > 0,97$. Το σήμα που σχετίζεται με τον Cu καταγράφηκε στα 324,8 nm (λάμπα κοίλης καθόδου πολυστοιχειακή 30 mA), (**Πίνακας 12**).



Εικόνα 25. Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (Perkin – Elmer 2100).

Πίνακας 12. Λειτουργικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του Cu χρησιμοποιώντας Perkin – Elmer 2100 φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης.

Χαρακτηριστικά	Cu
Καύσιμο	Ακετυλένιο
Οξειδωτικό	Αέρας
Ροή καυσίμου	2L · min ⁻¹
Ροή οξειδωτικού	8L · min ⁻¹
Μήκος κύματος	324,8 nm
Εύρος σχισμής (slit width)	0,70 nm
Χαρακτηριστική συγκέντρωση	0,077 mg · L ⁻¹
Χρόνος μέτρησης	2 sec

2.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το κάθε επιμέρους πείραμα διεξήχθη σε 3 επαναλήψεις οι οποίες ελάμβαναν χώρα ταυτόχρονα. Η κάθε επανάληψη αποτελούσε και μια ξεχωριστή καλλιέργεια κυττάρων. Καθώς λοιπόν οι μετρήσεις για όλες τις συγκεντρώσεις του κάθε προστιθέμενου μετάλλου και του As προέκυψαν από περισσότερα του ενός, πειράματα (**Εικόνες 19, 20**), τα αποτελέσματα (με εξαίρεση αυτά που αφορούν τη δέσμευση του Cu από το χλωροφύκος) εκφράστηκαν ως ποσοστά, αναφερόμενα επί του μάρτυρα έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους. Τα ποσοστά αυτά αναφέρθηκαν ως μέσος όρος των 3 επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση (Standard deviation – SD).

Τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων που αφορούν τη δέσμευση του Cu από το χλωροφύκος εκφράστηκαν ανά κύτταρο καθώς και ανά g ξηρής βιομάζας ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση τους με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

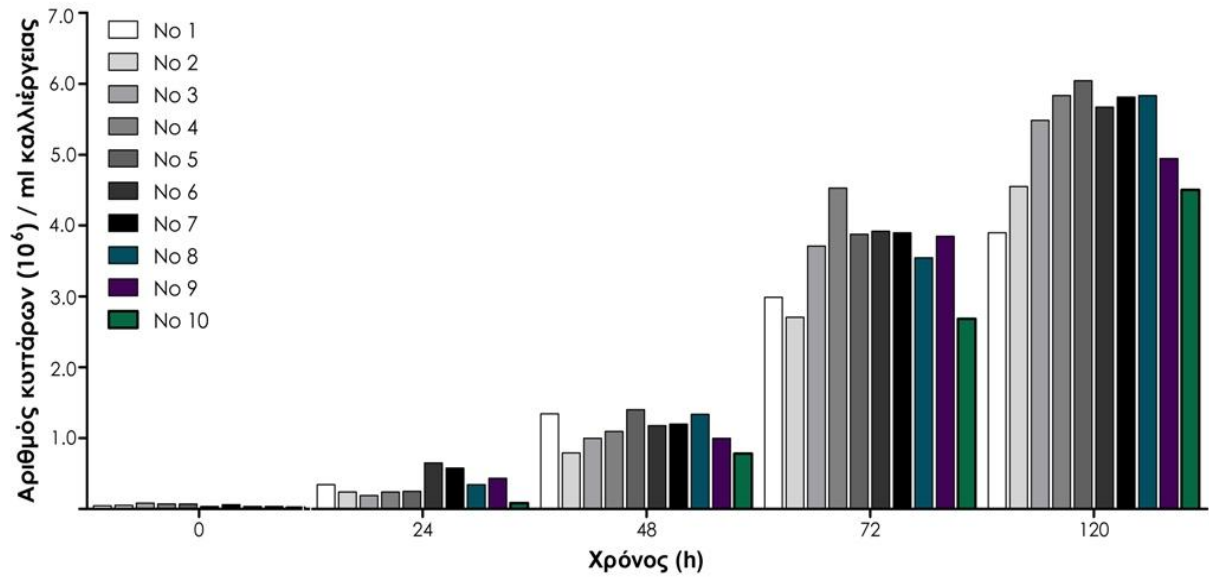
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις στις οποίες υποβλήθηκαν τα εναιωρήματα των καλλιέργειών του μικροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* ο οποίος υποβλήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0,5, 1, 1,5 και 2 mM) βαρέων μετάλλων (Cu, Zn, Ni και As). Στα πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος αγρίου τύπου του *Chlamydomonas reinhardtii* (CC – 1690), ως πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της αντίδρασης στη καταπόνηση του (stress) με βαρέα μέταλλα καθώς και της δυνατότητας του να απομακρύνει Cu από υδατικά διαλύματα.

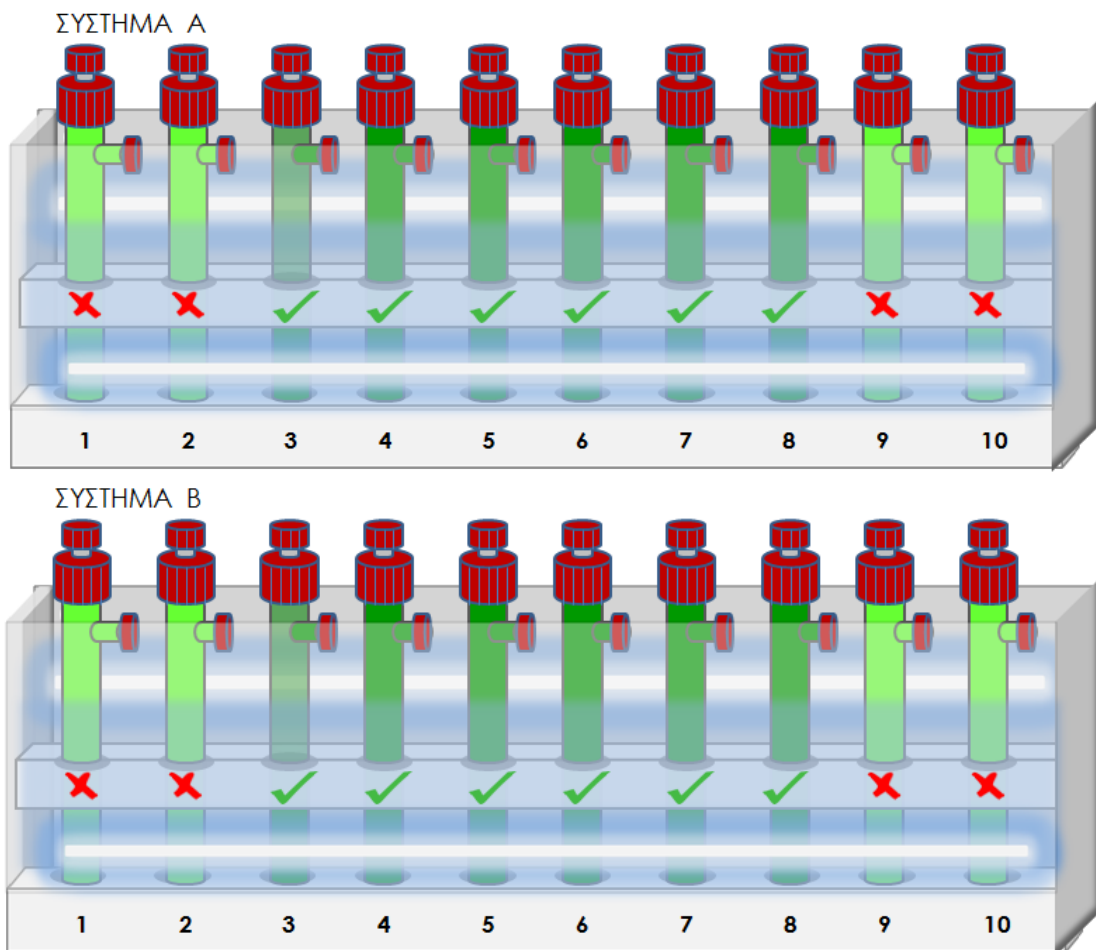
Παρά την αυξανόμενη βιβλιογραφία σχετικά με τις αποκρίσεις των ανώτερων φυτών στο stress των βαρέων μετάλλων, λίγα είναι γνωστά για τα μονοκύτταρα φύκη. Οι μελέτες αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την αξιολόγηση των δυνητικών επιπτώσεων της ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων από τα βαρέα μέταλλα, με απώτερο στόχο να αποφευχθούν πιθανές βλάβες στους ζωντανούς οργανισμούς (Pinto et al., 2003). Επίσης τα μικροφύκη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία των υδάτινων οικοσυστημάτων και αντιπροσωπεύουν εξαιρετικά κατάλληλους βιολογικούς δείκτες των περιβαλλοντικών αλλαγών (Carfagna et al., 2013).

3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Στην **Εικόνα 26** παρουσιάζονται οι μετρήσεις του αριθμού κυττάρων / ml καλλιέργειας σε προκαταρκτικό πείραμα που διεξήχθη (**Υποενότητα 2.4**) προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπήρχε διαφορά στην ένταση φωτισμού μεταξύ των θέσεων των βιοαντιδραστήρων του κάθε συστήματος. Βάσει των αποτελεσμάτων, αποδείχθηκε ότι οι καλλιέργειες στις θέσεις No 1, No 2, No 9 και No 10 είχαν σημαντικά μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από τις υπόλοιπες και έτσι οι θέσεις αυτές αποκλειστήκαν από τις πειραματικές διαδικασίες που ακολούθησαν. Επομένως για το παρόν πείραμα οι διαθέσιμες θέσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν στο σύνολο 12 (6 θέσεις / σύστημα) όπως παρουσιάζονται στην **Εικόνα 27**.



Εικόνα 26. Εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* βάσει της θέσης τοποθέτησης των βιοαντιδραστήρων (No 1, No 2 κτλ).



Εικόνα 27. Διάταξη βιοαντιδραστήρων για τον έλεγχο του ρυθμού ανάπτυξης του οργανισμού βάσει των διαθέσιμων θέσεως στο σύστημα (σύστημα A) καθώς και οι διαθέσιμες / αποκλειόμενες θέσεις για το παρόν πείραμα (σύστημα A και B).

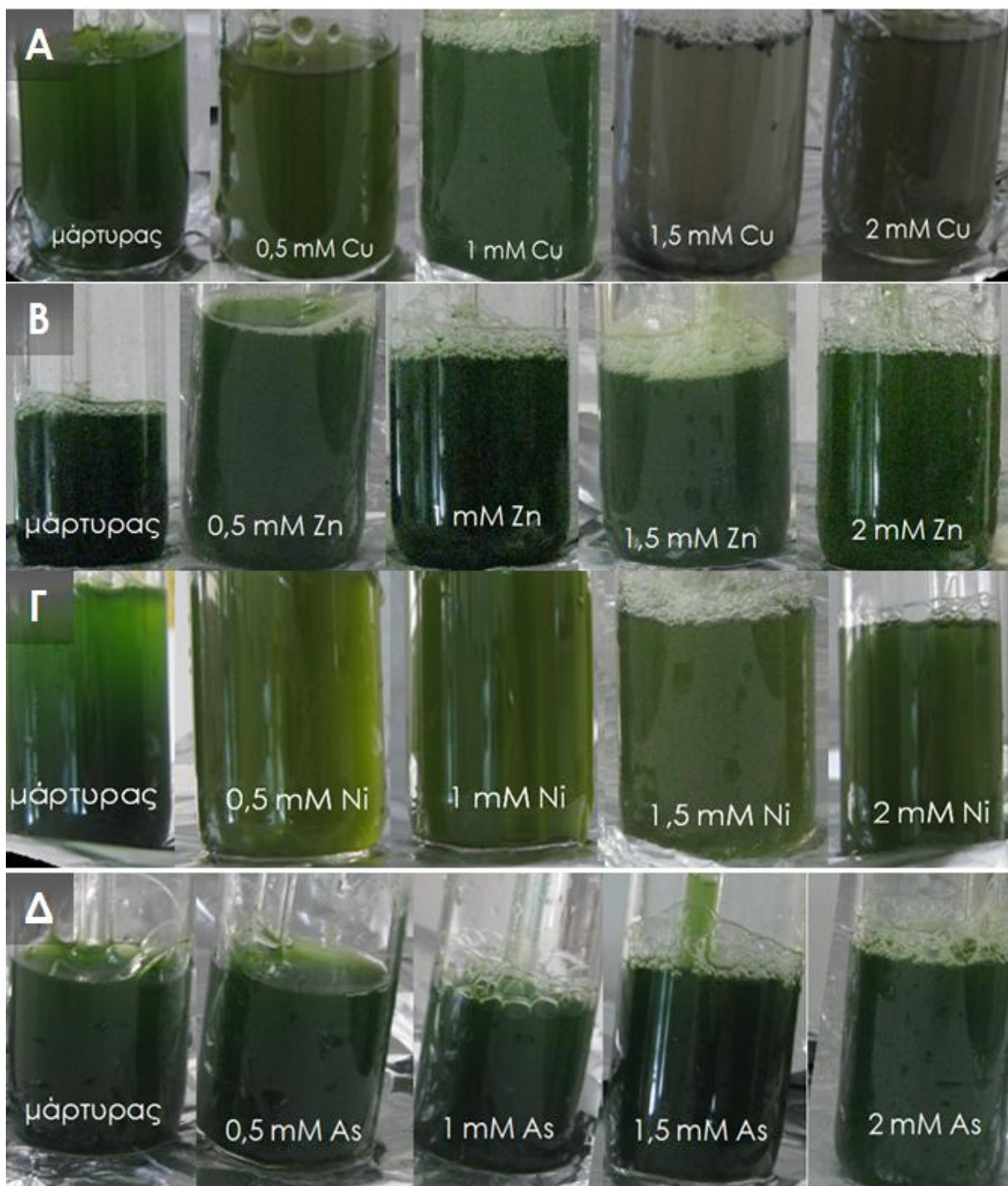
3.2. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Μετά το πέρας των 72 ωρών από τη προσθήκη των βαρέων μετάλλων, οι καλλιέργειες παρατηρήθηκαν και συγκρίθηκαν τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά (**Εικόνες 28 – 33**). Ωστόσο, ήταν δύσκολο να αποτυπωθούν στις εικόνες που ακολουθούν όλες οι παρατηρήσεις που έγιναν. Έτσι τα αποτελέσματα καταγράφηκαν έτσι όπως παρατηρήθηκαν κατά το χρονικό διάστημα διεξαγωγής των πειραμάτων.

Εκ πρώτης όψεως, οι μάρτυρες όλων των διεξαχθέντων πειραμάτων διέθεταν πράσινο βαθύ χρώμα, με τα κύτταρα τους ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλο τον όγκο του υγρού μέσου καλλιέργειας. Αυτό δεν είναι ιδιαίτερα εμφανές αν παρατηρήσει κανείς την **Εικόνα 28** καθώς οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν διαφορετική χρονική περίοδο με διαφορετικό φωτισμό. Επίσης ο χρόνος απομάκρυνσης των βιοαντιδραστήρων από τα συστήματα καλλιέργειας μέχρι τη λήψη της φωτογραφίας διέφερε αρκετά με αποτέλεσμα σε κάποιες καλλιέργειες να υπάρχει καθίζηση των κυττάρων λόγω μη ανάδευσης τους. Αυτό επέδρασε αρνητικά στην απεικόνιση του πραγματικού χρώματος των καλλιιεργειών. Επίσης σε κανέναν από τους μάρτυρες δεν παρατηρήθηκαν συσσωματώματα κυττάρων υπό μορφή πράσινων υπολειμμάτων στα τοιχώματα των βιοαντιδραστήρων. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά, σε κάποιες περιπτώσεις, φαινόταν να χάνονταν με την αύξηση των συγκεντρώσεων των προστιθέμενων βαρέων μετάλλων στις καλλιέργειες. Άλλοτε οι διαφορές αυτές ήταν δυσδιάκριτες, άλλοτε ευδιάκριτες και έντονα εμφανείς.

Στη περίπτωση του Cu και του Ni, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση των μετάλλων, οι καλλιέργειες αποκτούσαν ένα πράσινο – καστανό χρώμα (**Εικόνα 28Α, Γ**). Αυτό ήταν εμφανές στις επεμβάσεις με 1,5 και 2,0 mM Cu ενώ γινόταν δύσκολα αντιληπτό στις επεμβάσεις με Ni (0,5 – 2,0 mM). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αποδόμηση των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες (pheophinitization). Οι Rodriguez et al., 2007 παρατήρησαν ότι οι χλωροφύλλες α και β μετατράπηκαν σε φαιοφυτίνες α και β αντίστοιχα, όταν το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις Cr⁶⁺ μεγαλύτερες των 10 μM.

Όσον αφορά τον Cu, στις καλλιέργειες με 1,5 και 2 mM παρατηρήθηκαν συσσωματώματα στα τοιχώματα των βιοαντιδραστήρων. Σχετικά με τις καλλιέργειες με Zn και το As, δεν υπήρχε καμία εμφανής διαφορά μεταξύ των καλλιιεργειών του μάρτυρα και αυτών με τις διάφορες συγκεντρώσεις του μετάλλου (ή του ημιμετάλλου), (**Εικόνα 28B, Δ**).



Εικόνα 28. Μακροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) μετάλλων (A: Cu, B: Zn, Γ: Ni) και Δ: του ημιμετάλλου As αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.

Η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στον οργανισμό μελετήθηκε και μικροσκοπικά (**Εικόνες 29 – 33**). Η μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών έγινε κυρίως με βάση το χρώμα, το σχήμα το μέγεθος των κυττάρων καθώς και με τη τάση δημιουργίας κυτταρικών συσσωματωμάτων. Παρόλα αυτά, η παρουσίαση των

παρατηρήσεων και η διεξαγωγή συμπερασμάτων ήταν σχετικά δύσκολη καθώς οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρισμένων καλλιέργειών με τα διάφορα βαρέα μέταλλα και τις διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το μάρτυρα, ήταν αρκετά δυσδιάκριτες έως και μη εμφανείς. Επίσης ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στο χρώμα των κυττάρων καθώς σε κάποιες περιπτώσεις, η αλλαγή αυτού σε αποχρώσεις του καφέ – μαύρου οφείλονταν κυρίως στην μεταχείριση αυτών με αντιδραστήριο Lugol (χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση των κυττάρων) παρά στην επίδραση των βαρέων μετάλλων [π.χ. έντονα εμφανές στην περίπτωση του 1,0 mM Cu και 1,5 mM Zn (**Εικόνες 29, 30**)].

Σε γενικές γραμμές και λαμβάνοντας υπόψη συνολικά όλες τις επεμβάσεις με τα βαρέα μέταλλα, οι καλλιέργειες – μάρτυρες παρατηρήθηκαν να διαθέτουν ελλειψοειδή κύτταρα τα οποία φαίνονταν εύρωστα με έντονο πράσινο χρώμα (**Εικόνες 29 – 32**). Αυτό φαινόταν να χάνεται σε κάποιες περιπτώσεις (σε διαφορετικό βαθμό και ανάλογα την επέμβαση) μετά τη προσθήκη των διαφόρων συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων.

Στην περίπτωση του Cu (**Εικόνα 29**), οι καλλιέργειες με 1,5 mM και 2 mM περιείχαν κύτταρα κίτρινου χρώματος. Επίσης στις μεταχειρισμένες με 1,5 και 2 mM Cu και Zn, καλλιέργειες, παρατηρήθηκαν συσσωματώματα 2 – 6 κυττάρων, προσκολλημένα το ένα με το άλλο το οποίο αποτελεί ένδειξη καταπόνησης του οργανισμού (Harris, 2009). Στη περίπτωση του Cu, τα συσσωματώματα παρατηρήθηκαν και μακροσκοπικά (**Εικόνα 28A**). Συσσωματώματα κυττάρων έχουν επίσης παρατηρηθεί στο χλωροφύκος *Scenedesmus obtusiusculus* υπό τη παρουσία Al (Greger and Johansson, 2004). Η συσσωμάτωση κυττάρων έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός άμυνας με τον οποίο οι πληθυσμοί των φυκών τείνουν να μειώσουν τη συνολική επιφάνεια των κυττάρων που εκτίθενται σε ξενοβιοτικές ουσίες (Saison et al., 2010). Θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα μειώνουν την επιφάνεια απορρόφησης τους, μειώνοντας έτσι τη πρόσληψη των θρεπτικών ουσιών (Greger and Johansson, 2004).

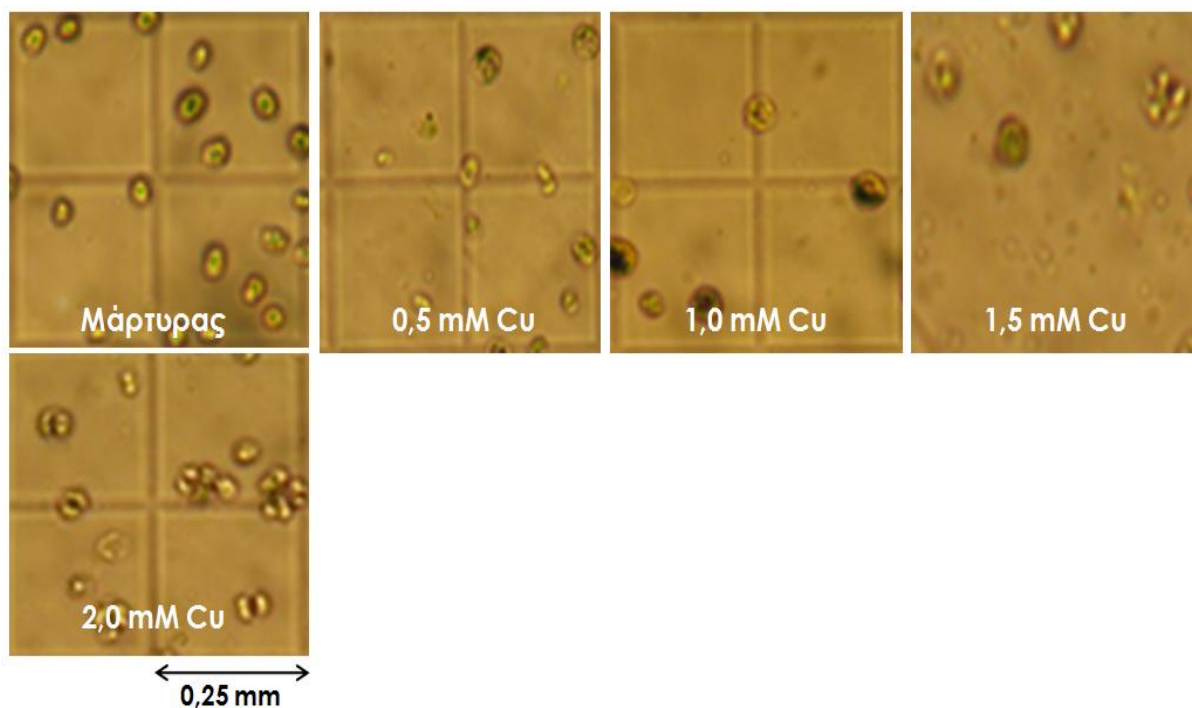
Στην περίπτωση του Cu και του Zn (**Εικόνες 29, 30**), οι καλλιέργειες με 1,5 mM και 2 mM περιείχαν κύτταρα ακανόνιστου σχήματος. Επιπλέον, σε όλες τις επεμβάσεις με Cu, τα κύτταρα φάνηκαν να έχουν μικρότερο μέγεθος από αυτά του μάρτυρα. Αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές στις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu. Αυτή η επίδραση του Cu στο μέγεθος των κυττάρων έχει διαπιστωθεί και από τους Wan Maznah et al., 2012 οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα κύτταρα του *Chlamydomonas* sp., όταν εκτέθηκαν σε διάλυμα με 20 mg/L Cu συρρικνώθηκαν, διπλώθηκαν και άρχισαν να σπάνε. Η κυτταρική επιφάνεια του μικροφύκου όταν αυτό εκτέθηκε σε 5 mg / L Cu ήταν λιγότερο διπλωμένη. Τα κύτταρα μάρτυρες του *Chlamydomonas* sp. ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος και δεν έδειξαν αναδίπλωση της εξωτερικής επιφάνειας σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε διάλυμα με 5 Cu mg/L. Επίσης οι Raize et al., 2004 μελέτησαν την επιφανειακή τοπολογία του φαιοφύκου *Sargassum vulgare* πριν και μετά τη φόρτωση του βιορροφητικού με Cd. Η φορτωμένη με μέταλλο βιομάζα διέφερε μορφολογικά

με αυτή πριν τη μεταχείριση με Cd. Το κυτταρικό τοίχωμα άρχισε να συρρικνώνεται και να αποκτά ραβδωτή υφή. Έτσι απέδωσαν αυτές τις αλλαγές στην ισχυρή σύνδεση του Cd με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες του κυτταρικού τοιχώματος του φαιοφύκους. Έτσι οι αλλαγές στο εξωτερικό σχήμα των κυττάρων μπορεί να οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταλλικών ιόντων και των ενεργών θέσεων στην επιφάνεια αυτών (Wan Maznah et al., 2012).

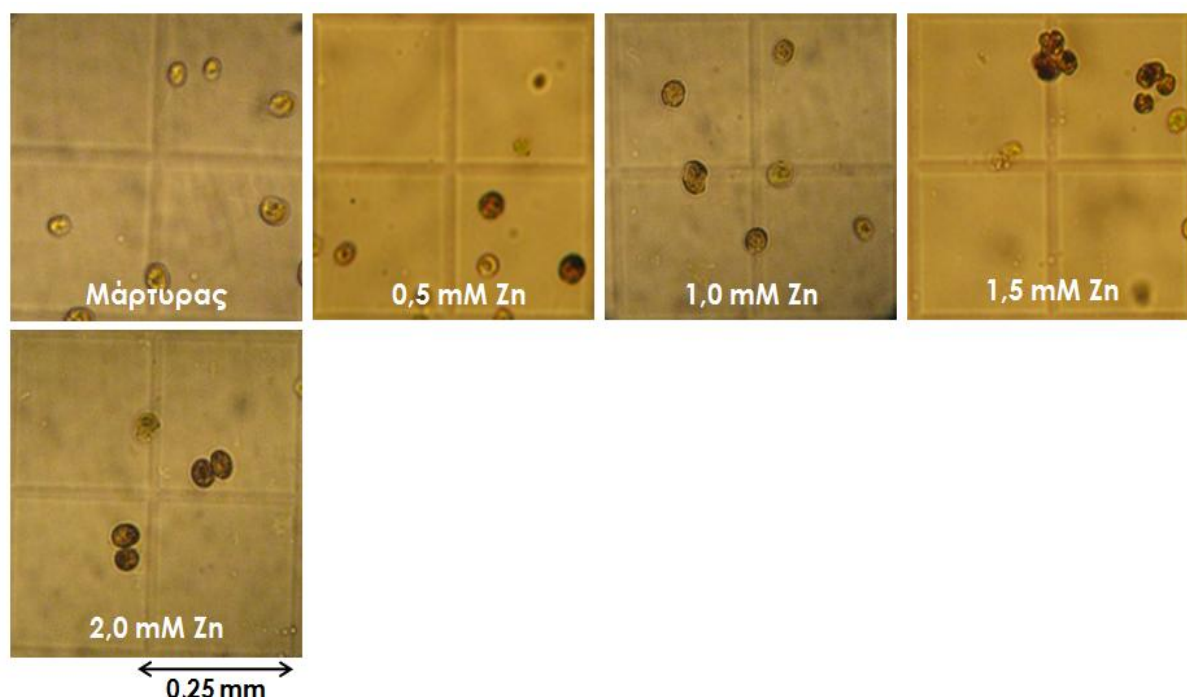
Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα των φυκών που εκτίθενται σε βαρέα μέταλλα μπορούν να υποστούν σοβαρές μορφολογικές μεταβολές (Afkar et al., 2010). Ωστόσο το είδος και η ένταση των μεταβολών αυτών εξαρτάται από το είδος του φύκου, το μέταλλο καθώς και τη συγκέντρωση του (Barceló and Poschenrieder, 2004). Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων ως αποτέλεσμα του stress που προκαλείται από τη παρουσία βαρέων μετάλλων έχουν αναφερθεί και από άλλους μελετητές. Για παράδειγμα, υπό τη παρουσία CuSO_4 150 μM , τα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσίασαν σε κάποιο βαθμό τοξικότητα η οποία αντανάκλασε στην αλλαγή του χρώματος (κίτρινο) και στο σχήμα (Boswell et al., 2002). Επίσης τα κύτταρα του ίδιου οργανισμού, κατόπιν έκθεσης τους σε συγκεντρώσεις HgCl_2 μεγαλύτερες των 2,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, διέφεραν οπτικά ως προς το μάρτυρα σε χρώμα καθώς και στην έκταση της συσσωμάτωσης των κυττάρων (Weiss-Magasic et al., 1997).

Όσον αφορά τις μεταχειρισμένες με Ni και As καλλιέργειες (**Εικόνες 31, 32**), οι διάφορες συγκεντρώσεις αυτών φάνηκαν να μην έχουν δυσμενείς επιδράσεις στη μορφολογία των κυττάρων καθώς δεν ήταν εμφανής κάποια διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα κύτταρα των μεταχειρισμένων με τα βαρέα μέταλλα καλλιεργειών έμοιαζαν σε μεγάλο βαθμό με τα αυτά των μαρτύρων ως προς το σχήμα, το μέγεθος και το χρώμα. Επίσης σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε σημαντικός αριθμός συσσωματωμάτων.

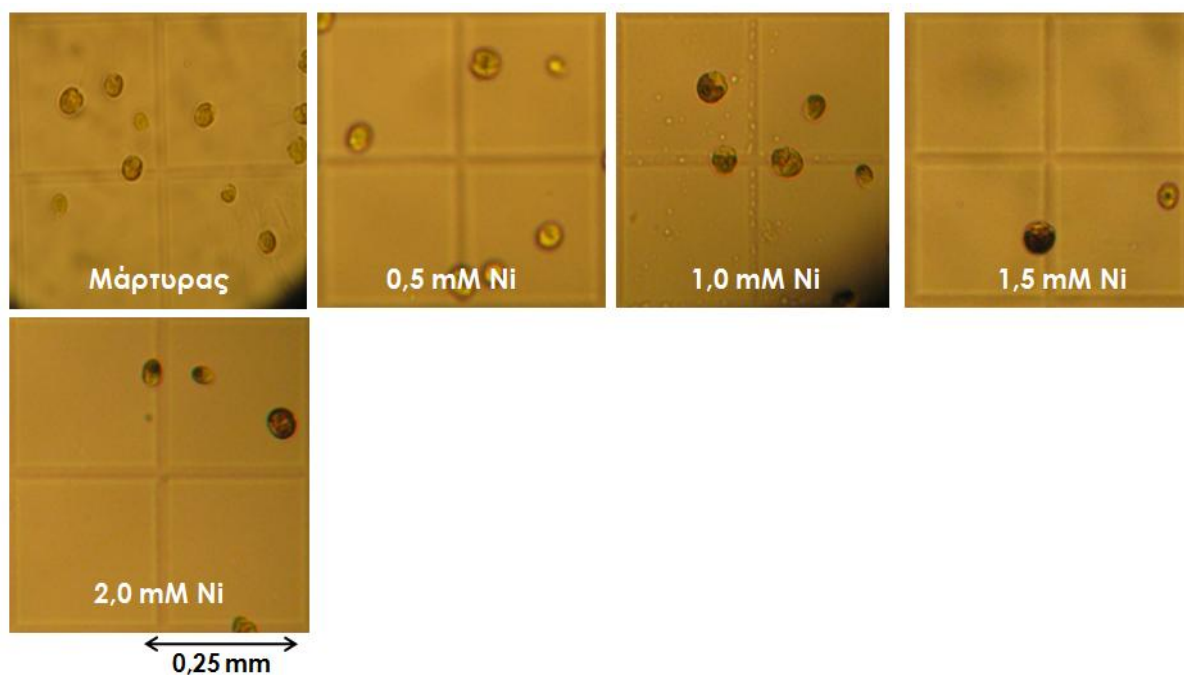
Σε κάποιες επεμβάσεις με μέταλλα (1,5 mM Cu, 1,0 1,5, 2,0 mM Zn και 1,0 mM Ni) ήταν εμφανείς κάποιες δομές παρόμοιες με τα κύτταρα του οργανισμού αλλά κατά πολύ μικρότερες σε μέγεθος από αυτά (**Εικόνα 33**). Οι δομές αυτές πιθανόν να αποτελούσαν σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής. Τα σπόρια αυτά παράγονται προκειμένου ο οργανισμός να επιβιώσει και να ξεπεράσει τις αντίξοες συνθήκες καθώς και να δημιουργηθούν νέα άτομα όταν επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του οργανισμού (Richmond, 2008). Η εγγενής αναπαραγωγή των μικροφυκών προωθείται από την καταπόνηση με Cu γεγονός το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως ένας προστατευτικός μηχανισμός των μικροφυκών έναντι των βαρέων μετάλλων. Η εγγενής αναπαραγωγή, σε ανταπόκριση προς το stress των βαρέων μετάλλων έχει παρατηρηθεί και στα *Scenedesmus* spp. (Harris, 2009, Perales-Vela et al., 2006).



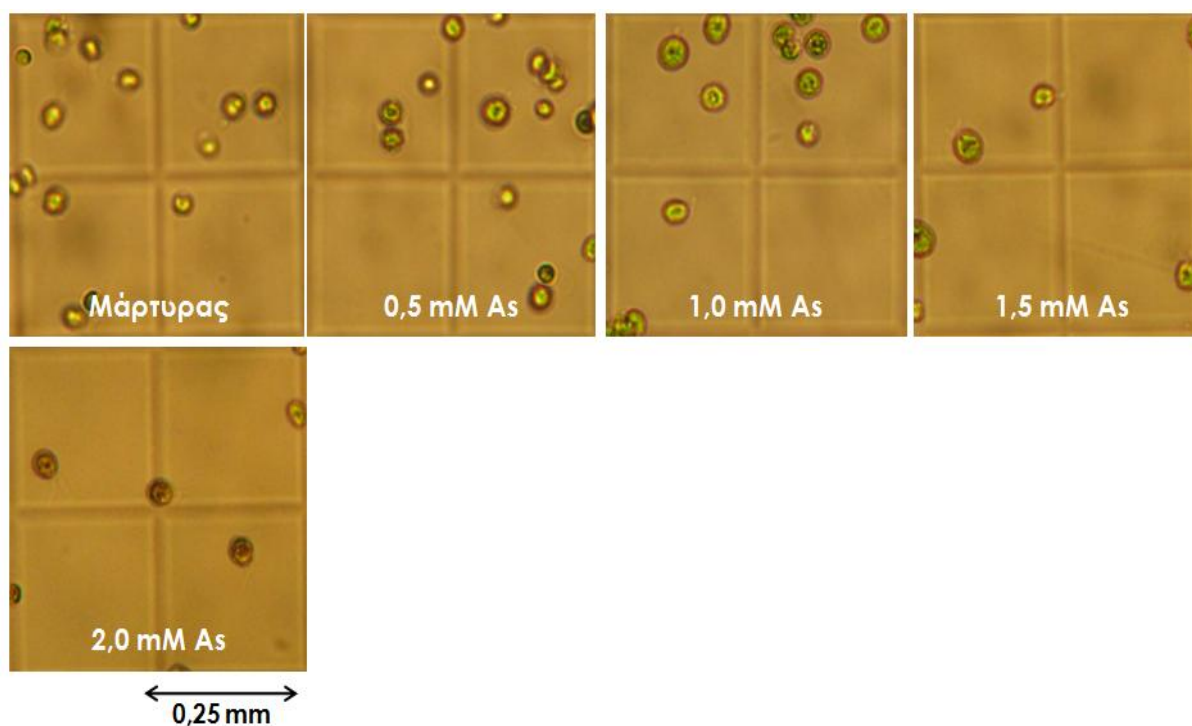
Εικόνα 29. Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) Cu. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.



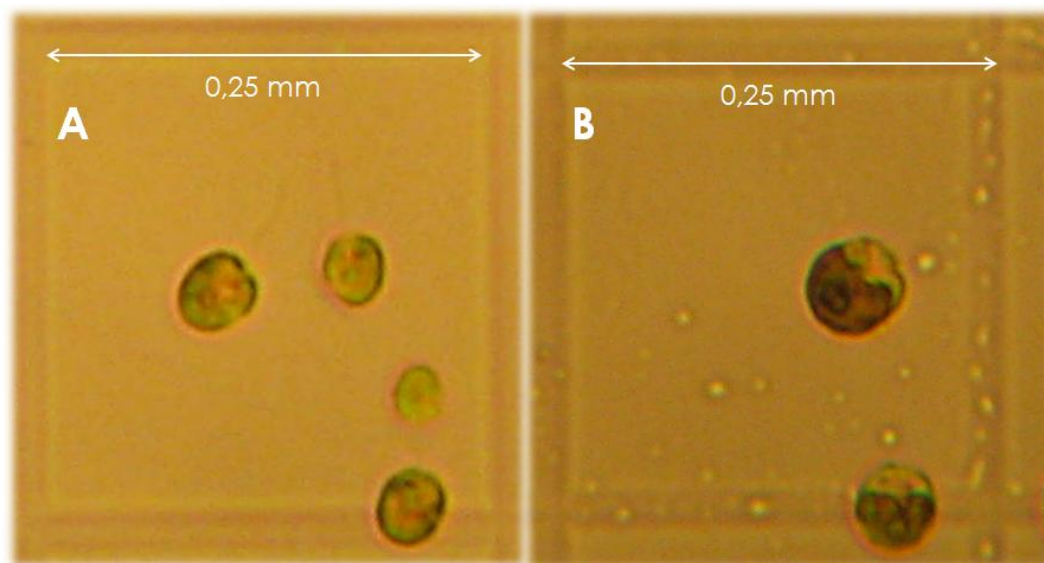
Εικόνα 30. Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) Zn. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.



Εικόνα 31. Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) Ni. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.



Εικόνα 32. Μικροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii*, 72 ώρες μετά τη προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων (0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM) As. Σε κάθε περίπτωση έγινε επιλογή των πιο αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών μεταξύ των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.



Εικόνα 33. Μικροσκοπική παρατήρηση A: κυττάρων (μάρτυρας) και B: κυττάρων και σχηματιζόμενων σπορίων ή παρομοίων δομών, παρουσία δυσχερών συνθηκών ανάπτυξης του *Chlamydomonas reinhardtii* (1,0 mM Ni).

3.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Δεδομένου ότι η αύξηση της καλλιέργειας αντικατοπτρίζει το μεταβολισμό των κυττάρων, έχει χρησιμοποιηθεί ως βασικός δείκτης της τοξικότητας των ιόντων των βαρέων μετάλλων σε μικροοργανισμούς (Arunakumara and Zhang, 2008). Η αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων στο νερό έχει μελετηθεί κατά τις 2 τελευταίες δεκαετίες (Mosleh and Mofeed, 2014). Η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Cu, Zn, Ni και του ημιμετάλλου As στην ανάπτυξη του *Chlamydomonas reinhardtii*, σε υγρό μέσον καλλιέργειας εξετάστηκε προκειμένου να καθοριστούν οι συγκεντρώσεις αυτών που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων χωρίς αυτό να καταργεί την βιωσιμότητά τους.

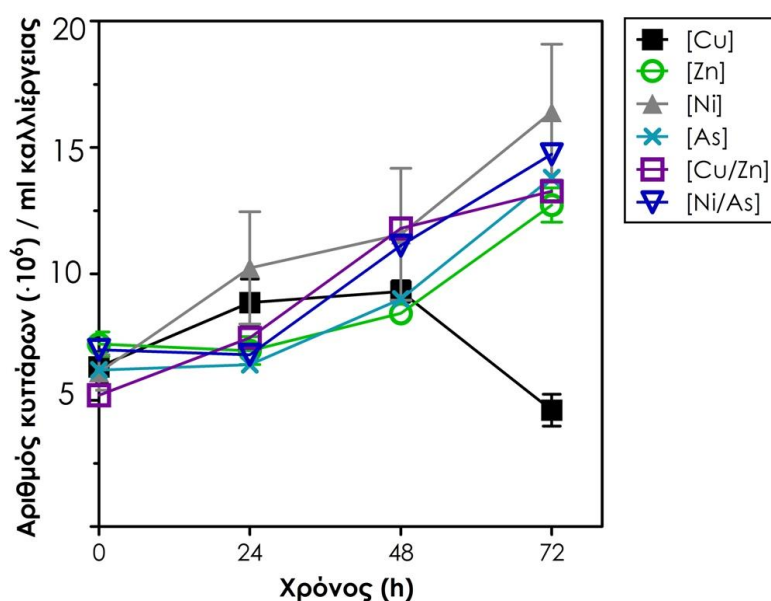
Στα γραφήματα που ακολουθούν (**Εικόνα 34, 35**), παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης που αφορούν τους μάρτυρες της κάθε επιμέρους διεξαχθείσας πειραματικής διαδικασίας καθώς και οι καμπύλες ανάπτυξης των καλλιεργειών του *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης των βαρέων μετάλλων (χρόνος 0), σε διάφορες συγκεντρώσεις και για το χρονικό διάστημα των 72 ωρών από τη στιγμή της προσθήκης τους.

Και στις 6 επεμβάσεις με μέταλλα, οι μάρτυρες αυξήθηκαν σε αριθμό κυττάρων (**Εικόνα 34**). Η αύξηση αυτή κλιμακώθηκε στις 72h για όλες τις περιπτώσεις εκτός από μία (μάρτυρας No [Cu]) που αφορά το πείραμα με τις διάφορες συγκεντρώσεις Cu (0,5, 1,5 και 2,0 mM), (**Εικόνα 19**), όπου παρατηρήθηκε μείωση της αύξησης του αριθμού κυττάρων του μάρτυρα. Σε αυτή τη περίπτωση, πιθανόν να υπήρξε σφάλμα λόγω βλάβης του συστήματος ψύξης των εγκαταστάσεων καλλιέργειας του οργανισμού. Στο διάστημα μεταξύ 48 – 72 ωρών, η

θερμοκρασία των συστημάτων έφτασε τους 30°C και αυτό ίσως να έδρασε ανασταλτικά στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα διάφορα είδη του *Chlamydomonas* αναπτύσσονται καλά σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 – 25°C. Τα περισσότερα στελέχη αγρίου τύπου παρουσιάζουν ανεκτικότητα τόσο σε χαμηλές (15°C) όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες (35°C), (Harris, 2009).

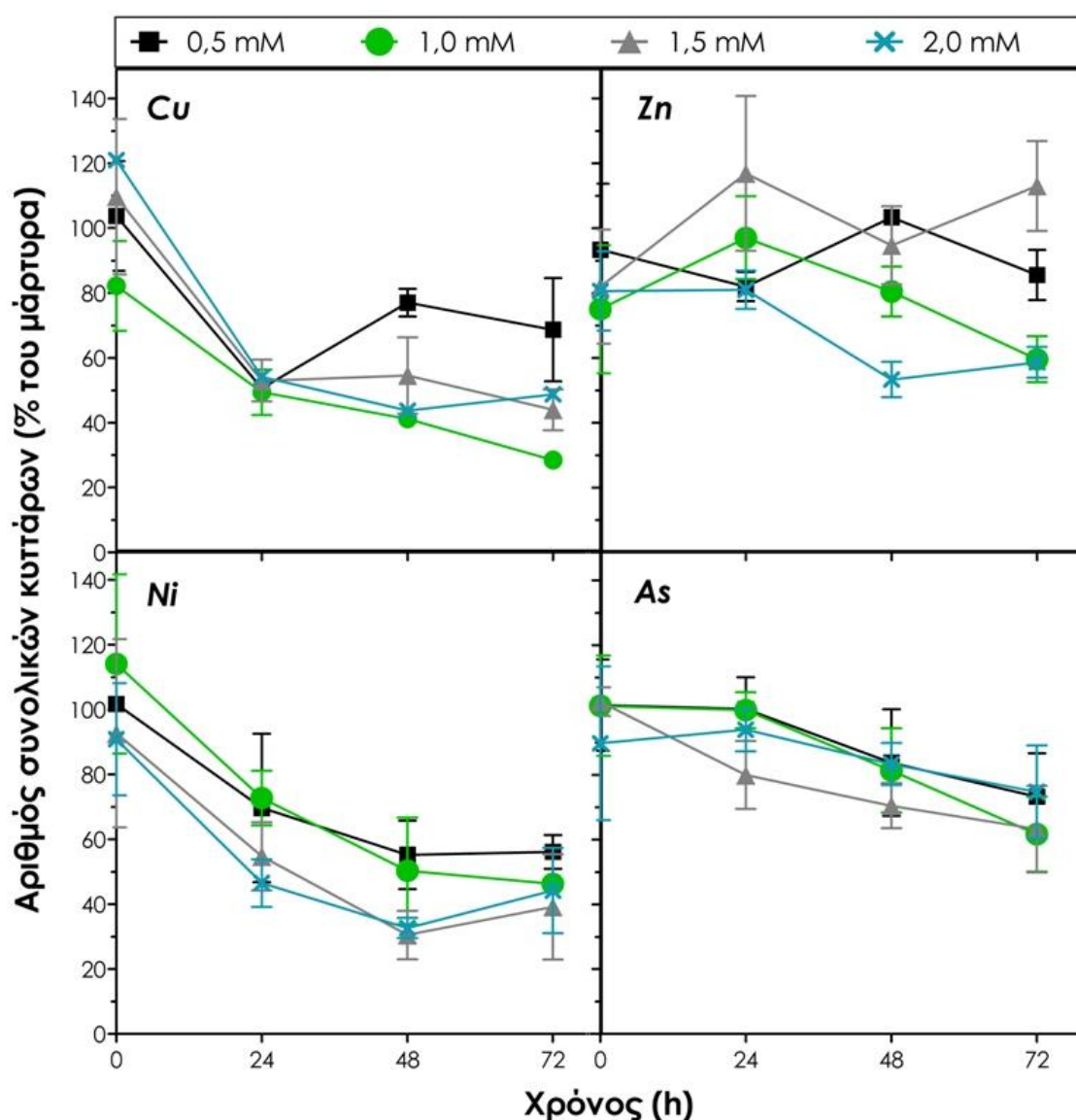
Παρόλα αυτά και στις 6 περιπτώσεις βαρέων μετάλλων, οι μάρτυρες διέθεταν υψηλό αριθμό κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο αριθμός των κυττάρων των μαρτύρων ήταν ίδιος κατά την έναρξη της τοξικής φάσης [$\approx 6,3 \cdot 10^6$ κύτταρα $\cdot \text{ml}^{-1}$ καλλιέργειας κατά το χρόνο (0h)] και κατά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (χρόνος 72h), ο οποίος έφτασε τα ίδια επίπεδα ($\approx 14,2 \cdot 10^6$ κύτταρα $\cdot \text{ml}^{-1}$ καλλιέργειας) με εξαίρεση το μάρτυρα No 1 ο οποίος περιείχε $\approx 4,6 \cdot 10^6$ κύτταρα $\cdot \text{ml}^{-1}$ καλλιέργειας.

Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από την συγκέντρωση αυτών, το χρησιμοποιούμενο είδος των μικροφυκών καθώς και από τη περίοδο έκθεσης τους στα βαρέα μέταλλα (Mosleh and Mofeed, 2014). Παρόλα αυτά, η ανασταλτική δράση των βαρέων μετάλλων που εξετάστηκε στο παρόν πείραμα, ως προς την αύξηση του αριθμού των κυττάρων δεν ήταν γραμμικά εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αυτών στο μέσο καλλιέργειας. Επίσης το χρησιμοποιούμενο μικροφύκος έδειξε διαφορετική ευαισθησία στα διάφορα προστιθέμενα βαρέα μέταλλα (**Εικόνες 35, 36**).



Εικόνα 34. Εκτίμηση της ανάπτυξης των καλλιεργειών των μαρτύρων από κάθε επιμέρους πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Οι μάρτυρες συμβολίζονται έτσι όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 19. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 35**, στη πλειοψηφία τους, οι διάφορες συγκεντρώσεις των προστιθέμενων μετάλλων και του As ανέστειλαν την αύξηση των κυττάρων σε αριθμό, σε σχέση με το μάρτυρα, σε διαφορετικό βαθμό και χρονικό πέρας. Αυτό υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων είχαν κάποια ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του μικροφύκου (Ouyang et al., 2012). Η επίδραση των μετάλλων σε διάφορα είδη φυκών, συμπεριλαμβανομένων των *Chlorella* sp., *Pediastrum duplex*, *Nitzschia palea* και *Anacystis nidulans* έδειξε επίσης μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης. Τη μικρότερη επίδραση φάνηκε να παρουσιάζει το As και ο Zn. Ανεκτικότητα στο As(III) έχει παρατηρηθεί και στα μικροφύκη *Chlorella* sp. και *Monoraphidium arcuatum* (Levy et al., 2005).



Εικόνα 35. Εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Ο Cu και το Ni προκάλεσαν σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων σε σύγκριση με το μάρτυρα, η οποία ήταν έντονα εμφανής από τις πρώτες κιόλας 24 ώρες μετά τη προσθήκη τους. Στο διάστημα αυτό, όλες οι συγκεντρώσεις Cu μείωσαν τον αριθμό κυττάρων στο 50% περίπου επί του μάρτυρα. Παρόλα αυτά, ο αριθμός κυττάρων άρχισε να αυξάνεται μετά τις 24 ώρες για τις καλλιέργειες με 0,5 mM Cu και μετά τις 48 ώρες για τις καλλιέργειες 2,0 mM Cu. Οι καλλιέργειες με 1,5 mM Cu έμειναν σταθερές στο διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών ενώ μειώθηκαν ελάχιστα μεταξύ 48 – 72 ωρών. Οι καλλιέργειες με 1,0 mM Cu έδειξαν σχεδόν σταθερή μείωση του αριθμού των κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια των 72 ωρών. Στο τέλος της τοξικής φάσης, όλες οι καλλιέργειες είχαν χαμηλότερα ποσοστά αριθμού κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα, τα οποία κυμάνθηκαν μεταξύ 28,5 – 68,7%, με τις καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM Cu να εμφανίζουν την μικρότερη και μεγαλύτερη αναστολή αντίστοιχα.

Το Ni επέφερε σημαντική μείωση του ποσοστού του αριθμού κυττάρων επί του μάρτυρα μέχρι τις 48 ώρες σε όλες τις καλλιέργειες. Στο διάστημα αυτό, οι καλλιέργειες με 0,5 και 1 mM έφτασαν τα 55,2 και 50,3% επί του μάρτυρα, ενώ οι καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM έφτασαν τα 30,5 και 32,6% αντίστοιχα. Μετά τις 48 ώρες, οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM εμφάνισαν σχεδόν σταθερό ποσοστό κυττάρων (56,1 και 46,2% αντίστοιχα) ενώ οι καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Ni ελαφρώς αυξημένο ποσοστό κυττάρων επί του μάρτυρα (39,1 και 44,2% αντίστοιχα).

Μετά το πέρα των 72 ωρών και σε σύγκριση με την έναρξη της τοξικής φάσης (0h), οι προστιθέμενες συγκεντρώσεις Zn (0,5, 1,0 και 2,0 mM) οδήγησαν σε μείωση του ποσοστού του αριθμού κυττάρων επί του μάρτυρα. Το ποσοστό αυτό έφτασε το 85,5% για τις καλλιέργειες με 0,5 mM Zn, το 59,6% για τις καλλιέργειες με 1,0 mM Zn και το 58,6 για τις καλλιέργειες με 2,0 mM Zn. Σε αντίθεση, οι καλλιέργειες με 1,5 mM Zn αυξήθηκαν φτάνοντας τα 113,0% επί του μάρτυρα. Κατά τη διάρκεια της τοξικής φάσης, όλες οι καλλιέργειες παρουσίασαν μια αυξομείωση του ποσοστού του αριθμού κυττάρων τους. Αυτή η τάση αυξομείωσης ήταν περισσότερο έντονη για τις καλλιέργειες με 0,5 και 1,5 mM Zn όπου η τάση άλλαζε ανά 24 ώρες.

Κατόπιν προσθήκης του As, ο αριθμός κυττάρων άρχισε να μειώνεται αλλά σε μικρή έκταση. Το As ανέστειλε ελαφρώς την αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Έως και τις πρώτες 24 ώρες δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των μεταχειρισμένων με As καλλιεργειών σε σχέση με το μάρτυρα, εκτός από αυτή με 1,5 mM As η οποία μειώθηκε κατά 20,1%. Μετά το πέρα των 24 ωρών, οι μεταχειρισμένες με As καλλιέργειες μειώθηκαν αλλά όχι σημαντικά. Κατά το τέλος της τοξικής φάσης (72h), οι καλλιέργειες παρουσίασαν σχεδόν ίδιο ποσοστό αριθμού κυττάρων μεταξύ τους, το οποίο κυμαινόταν μεταξύ 61,7 – 74,4%.

Η μείωση της αύξησης που προκαλείται από τα βαρέα μέταλλα μπορεί να είναι συνέπεια της παρεμβολής των μετάλλων σε μεταβολικές διεργασίες που συνδέονται με την φυσιολογική ανάπτυξη, ειδικά τη πρωτεϊνοσύνθεση και διάφορες φωτοσυνθετικές διαδικασίες όπως η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης (Wan Maznah et al., 2012). Οι Choudhary et al.,

2007 ανέφεραν ότι η αναστολή της ανάπτυξης του κυανοφύκου *Spirulina platensis* παρουσία Cu, Zn και Pb, θα μπορούσε να οφείλεται στη αναστολή της κανονικής διαίρεσης του. Η μείωση του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης που προκαλείται από μέταλλα οφείλεται κατά κύριο λόγο στην σύνδεσή τους με σουλφυδρυλομάδες οι οποίες είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της διαίρεση του φυτικού κυττάρου (Choudhary et al., 2007, Ouyang et al., 2012). Έχει προταθεί ότι τα μέταλλα αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση των μικροφυκών με δέσμευση τους στις θειολικές ομάδες της τουμπουλίνης, η οποία είναι σημαντική στο σχηματισμό της ατράκτου κατά την διάρκειά της μίτωσης (Abalde et al., 1995).

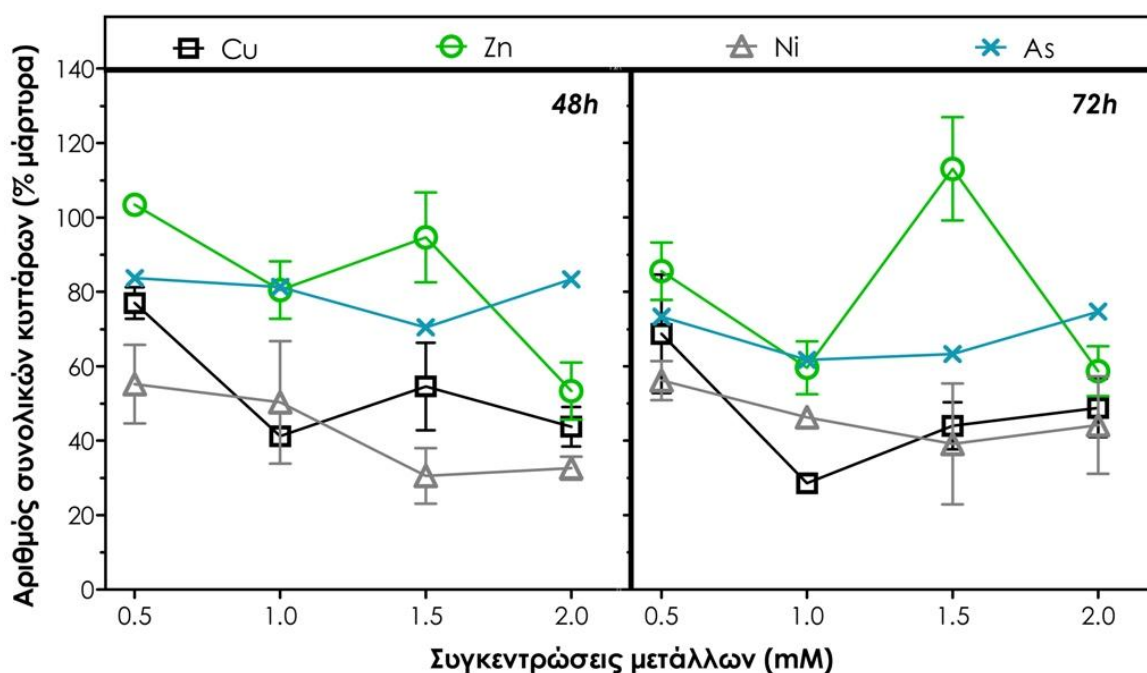
Ως άλλη μια πιθανή αιτία αναστολής της αύξησης των φυκών που έχει αναφερθεί είναι η υποβάθμιση του ινδολ-3-οξικού οξέος (IAA) το οποίο προάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των φυτών. Τα βαρέα μέταλλα επάγουν την δραστηριότητα της υπεροξειδάσης η οποία υποβαθμίζει το IAA (Arunakumara and Zhang, 2008, Gupta and Sharma, 2014). Στο γεγονός αυτό απέδωσαν οι Mosleh and Mofeed, 2014 την υποβάθμιση της ανάπτυξης του *Scenedesmus obliquus* σε συγκεντρώσεις Cu υψηλότερες των 5 ppm. Παρόλα αυτά πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή καθώς στα *Chlamydomonas* spp. και άλλα μονοκύτταρα φύκη, η παρουσία IAA δεν είναι προς το παρόν αποδεδειγμένη (Ludwig-Müller, 2011).

Στην **Εικόνα 36** γίνεται σύγκριση μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων των μετάλλων καθώς και του As στην ανάπτυξη των καλλιεργειών, που αφορά μόνο τους 2 τελευταίους χρόνους της τοξικής φάσης (48 και 72h). Το Cu και το Ni φαίνεται να επέδρασαν περισσότερο δυσμενώς στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Το Ni στις περισσότερες προσπιθέμενες συγκεντρώσεις φαίνεται να ανέστειλε την ανάπτυξη του οργανισμού σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υπόλοιπα μέταλλα και το As. Τα λιγότερο τοξικά στην αύξηση φαίνεται να ήταν ο Zn και το As καθώς μείωσαν σε μικρότερο βαθμό τον αριθμό κυττάρων σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης η τάση με την οποία τα διάφορα βαρέα μέταλλα με τις διάφορες συγκεντρώσεις τους επηρέασαν τον αριθμό κυττάρων των καλλιεργειών φαίνεται να ήταν ίδια και για τους 2 χρόνους της τοξικής φάσης (48 και 72h). Για παράδειγμα, για τις καλλιέργειες με 0,5 mM βαρέων μετάλλων, ο Zn είχε τη μικρότερη επίδραση στο ποσοστό του αριθμού κυττάρων επί του μάρτυρα και στις 48 και στις 72 ώρες ενώ τη πιο δυσμενή επίδραση είχε το Ni και στις 2 περιπτώσεις. Από την άλλη, οι καλλιέργειες με 0,5 mM As είχαν σχεδόν το ίδιο ποσοστό αριθμού κυττάρων επί του μάρτυρα με τις καλλιέργειες με 0,5 mM Cu σε αυτό το χρονικό διάστημα (48 – 72h). Οι καλλιέργειες με 1,0 mM Zn είχαν το ίδιο ποσοστό αριθμού κυττάρων με αυτό του 1,0 mM As και για τους 2 χρόνους.

Επομένως η σειρά τοξικότητας στην ανάπτυξη του *Chlamydomonas reinhardtii* ανάμεσα στα εξεταζόμενα βαρέα μέταλλα και για τους 2 επιλεγμένους χρόνους είναι Ni > Cu > As > Zn για τις 48 ώρες και Ni ≈ Cu > As > Zn για τις 72 ώρες (κατά φθίνουσα σειρά τοξικότητας). Οι Pereira et al., 2005 κατέληξαν στα ίδια σειρά τοξικότητας για το Cu και Ni όταν τα φύκη

Selenastrum capricornutum και *Gonium pectorale* εκτέθηκαν στα παραπάνω μέταλλα για 96 ώρες. Το ίδιο βρέθηκε και για το χλωροφύκος *Scenedesmus* sp. (Shehata and Badr, 1980).

Αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά το Cu και το Ni έχουν ληφθεί για τη σειρά τοξικότητας στην αύξηση του χλωροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* το οποίο εκτέθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,05 – 1,00 mg · L⁻¹) Cu, Ni και Cr. Η σειρά αυτή ήταν Cu > Ni > Cr (Wong and Chang, 1991). Επίσης σε άλλη διεξαχθείσα μελέτη, η σειρά τοξικότητας στην αύξηση του *Chlorella vulgaris* σε συγκεντρώσεις μετάλλων 0,05 – 5 μmol · L⁻¹ ήταν Cu > Cd > Pb > Cr > Zn μετά από 24 ώρες ενώ η σειρά αυτή άλλαξε σε Cu > Cr > Cd > Zn > Pb μετά από 96 ώρες (Ouyang et al., 2012), γεγονός που δείχνει την επίδραση του χρόνου έκθεσης στα βαρέα μέταλλα, στη τοξικότητα ενός οργανισμού. Επιπλέον, για το κυανοφύκος *Spirulina platensis* και το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* έχει βρεθεί ότι ο Cu είναι πιο τοξικός στην αύξηση του οργανισμού σε σχέση με το Zn το οποίο συμφωνεί με τα παρόντα αποτελέσματα (Choudhary et al., 2007, Mosleh and Mofeed, 2014).



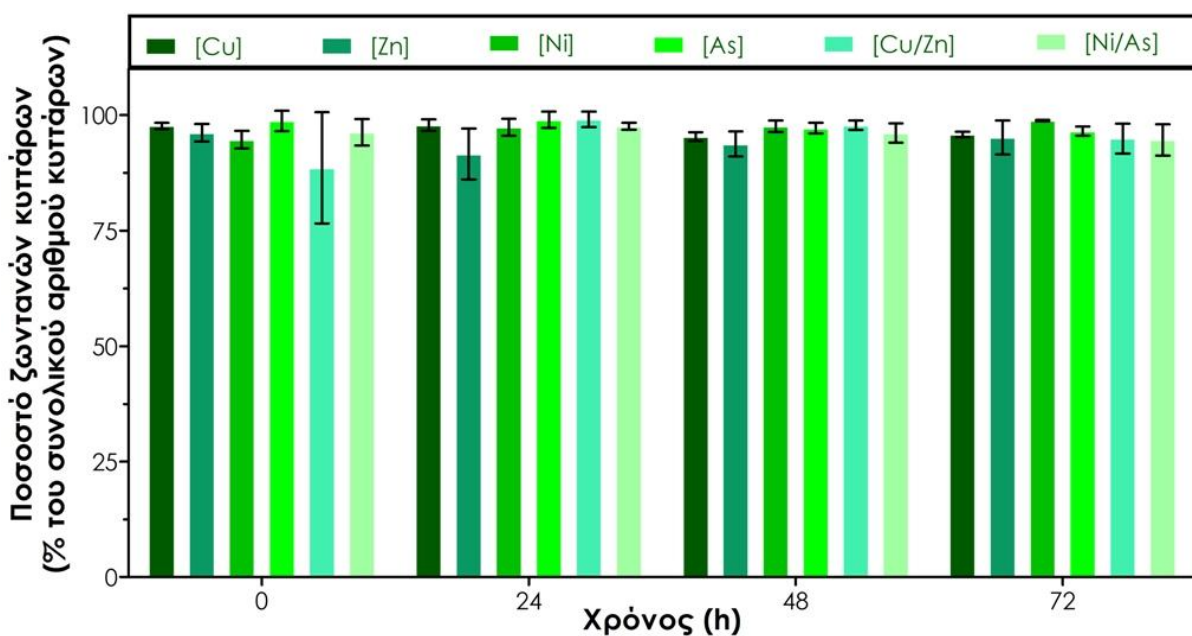
Εικόνα 36. Εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

3.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων που παρέχουν μια εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων σε καλλιεργημένα κύτταρα, η ανάλυση της βιωσιμότητας είναι η παλαιότερη και πιο διαδεδομένη τεχνική. Ένα από τα κύρια κριτήρια που χρησιμοποιούνται στους ποσοτικούς προσδιορισμούς

βιωσιμότητας είναι η ακεραιότητα της μεμβράνης. Τα κύτταρα που έχουν χάσει την ακεραιότητα της πλασματικής τους μεμβράνης και έχουν γίνει διαπερατά σε εξωτερικές ενώσεις (όπως χρωστικές ουσίες) θεωρούνται μη βιώσιμα και μεταβολικά μη ενεργά (Abalde et al., 1995). Επίσης η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι απαραίτητη καθώς αφορά άμεσα το μηχανισμό βιοσυσσώρευσης ο οποίος απαιτεί μεταβολικά ενεργά συνεπώς ζωντανά κύτταρα.

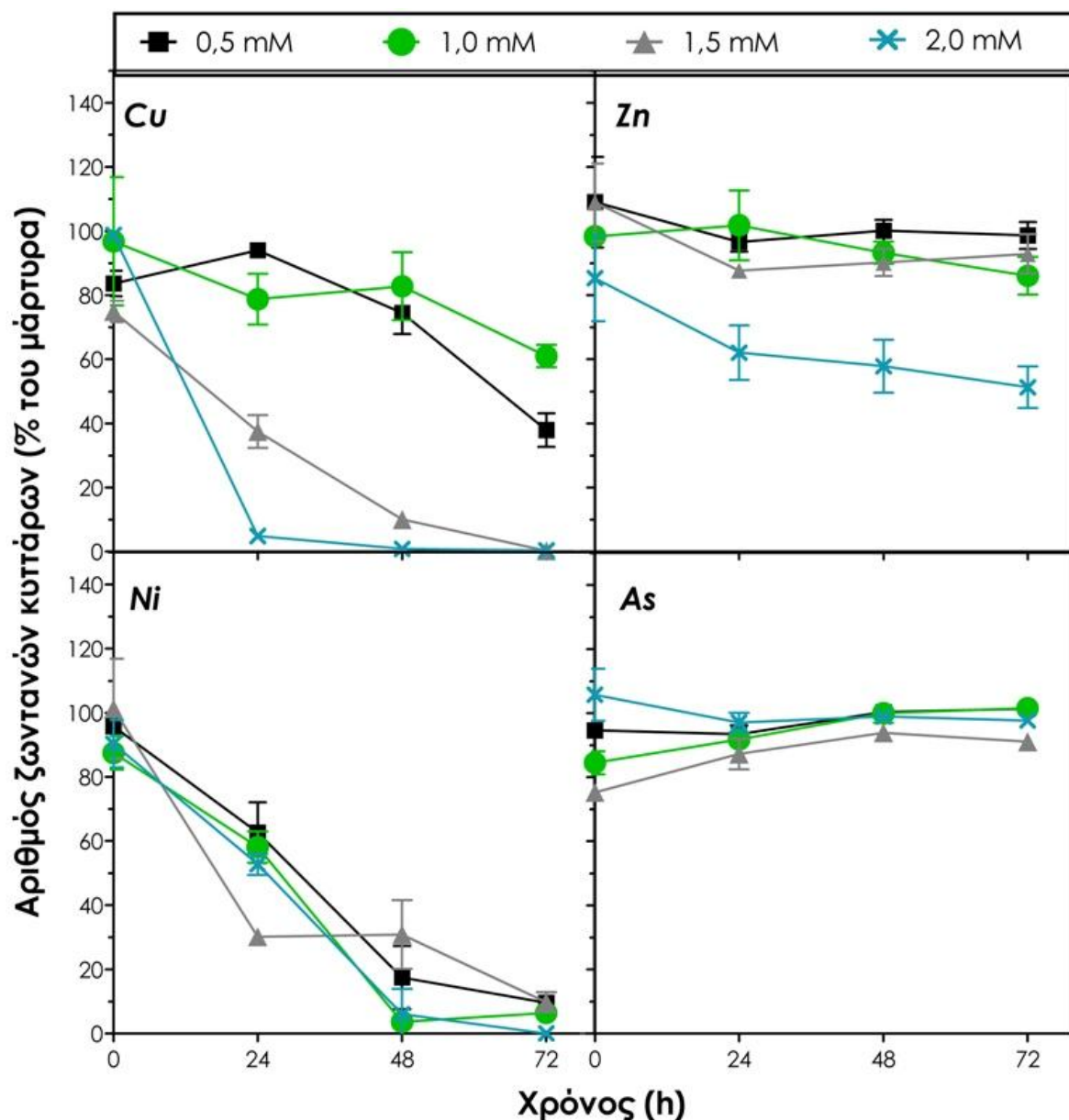
Στα επόμενα γραφήματα (**Εικόνες 37 – 41**) παρατίθενται τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων (αριθμός ζωντανών και νεκρών κυττάρων) των μαρτύρων και των μεταχειρισμένων με βαρέα μέταλλα καλλιιεργειών, κατά τη διάρκεια της τοξικής φάσης. Στην **Εικόνα 39**, οι αρνητικές τιμές του αριθμού των νεκρών κυττάρων (% του μάρτυρα) στα γραφήματα του Zn και του As προκύπτουν καθώς ο αριθμός ζωντανών κυττάρων των αντίστοιχων καλλιιεργειών με Zn και As είναι ελαφρά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των μαρτύρων.



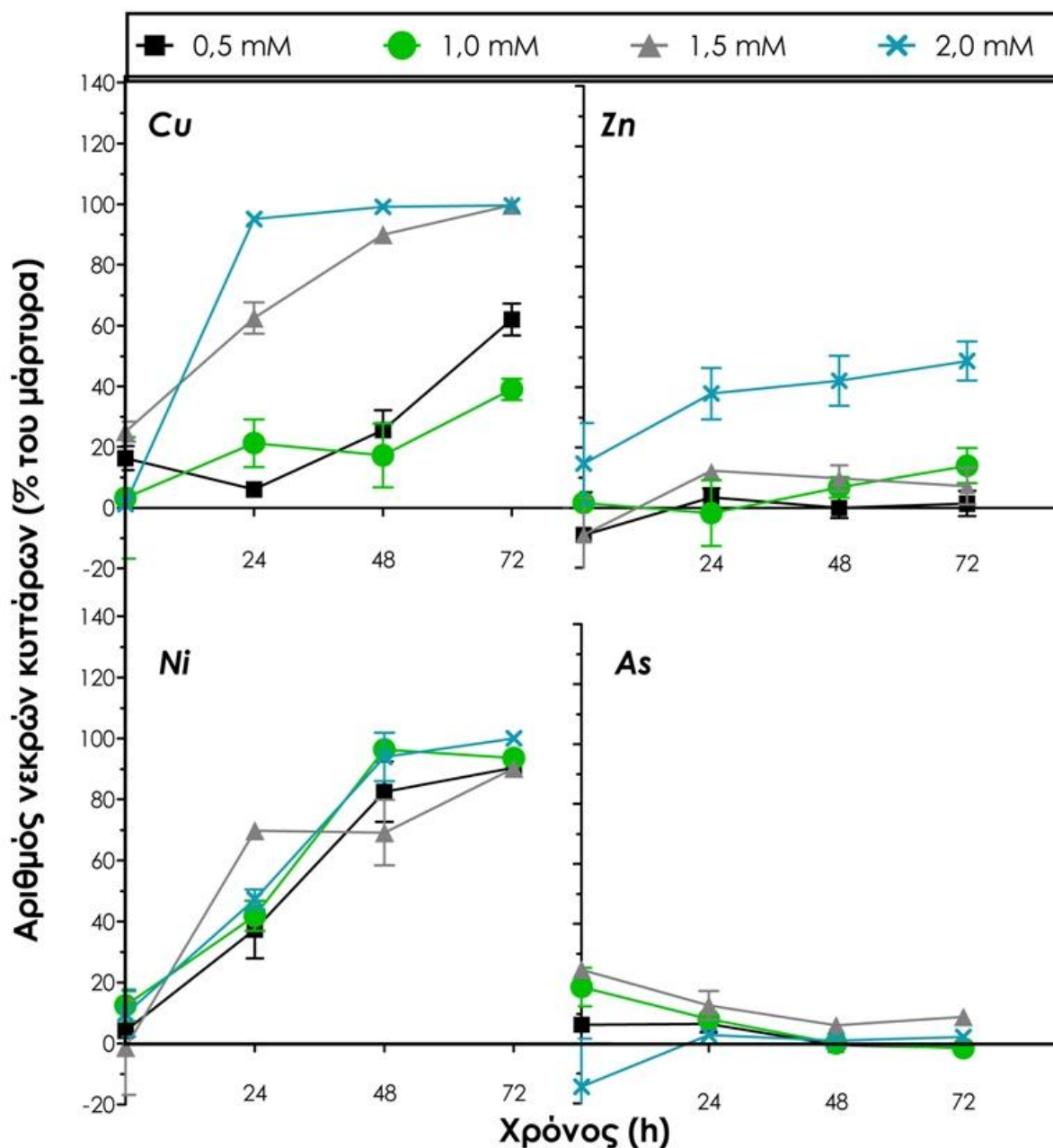
Εικόνα 37. Εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (ως ποσοστά επί του συνολικού αριθμού κυττάρων των καλλιιεργειών) των μαρτύρων από κάθε επιμέρους πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Οι μάρτυρες συμβολίζονται έτσι όπως παρουσιάζονται στην **Εικόνα 18**. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιιεργείες.

Και στις 6 επεμβάσεις με μέταλλα, οι μάρτυρες διατήρησαν τη βιωσιμότητα τους (αριθμός ζωντανών κυττάρων), (**Εικόνα 37**) σε αρκετά υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια των 72 ωρών (88,6 – 100%). Σε αντίθεση με τους μάρτυρες, οι καλλιιεργείες στις οποίες προστέθηκαν τα βαρέα μέταλλα παρουσίασαν καθόλου έως και σημαντική μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, σε διαφορετική έκταση ανά περίπτωση (**Εικόνες 38, 39**).

Όσον αφορά το Cu, έως και μετά τα μέσα της τοξικής φάσης (0 – 48h), οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM Cu διατήρησαν τη βιωσιμότητά τους (αριθμός ζωντανών κυττάρων) σε σχετικά υψηλά επίπεδα ενώ κατά το τέλος της τοξικής φάσης (72h), αυτή έφτασε στα 38 και 61% επί του μάρτυρα, αντίστοιχα. Εν αντιθέσει, οι καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Cu παρουσίασαν μείωση του ποσοστού ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα από το πρώτο κιόλας 24ώρο. Η μείωση αυτή κλιμακώθηκε στις 72 ώρες φτάνοντας σε επίπεδα κοντά στο 0% επί του μάρτυρα (0,3 και 0,4% αντίστοιχα).



Εικόνα 38. Εκτίμηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.



Εικόνα 39. Εκτίμηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Οι καλλιέργειες με τις διάφορες συγκεντρώσεις Zn, φαίνεται να διατήρησαν τη βιωσιμότητά τους (αριθμός ζωντανών κυττάρων) σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Εξαιρεση αποτέλεσαν οι καλλιέργειες με 2,0 mM Zn. Σε αυτές, μετά το πέρας των 72 ωρών, η βιωσιμότητα (αριθμός ζωντανών κυττάρων) έφτασε στο 51,3% (μείωση κατά 34%).

Το Ni επηρέασε σημαντικά τον αριθμό ζωντανών / νεκρών κυττάρων των καλλιεργειών καθώς όλες οι προστιθέμενες συγκεντρώσεις του μείωσαν τη βιωσιμότητα των καλλιεργειών (αριθμός ζωντανών κυττάρων). Κατά το διάστημα των πρώτων 48 ωρών της τοξικής φάσης, η

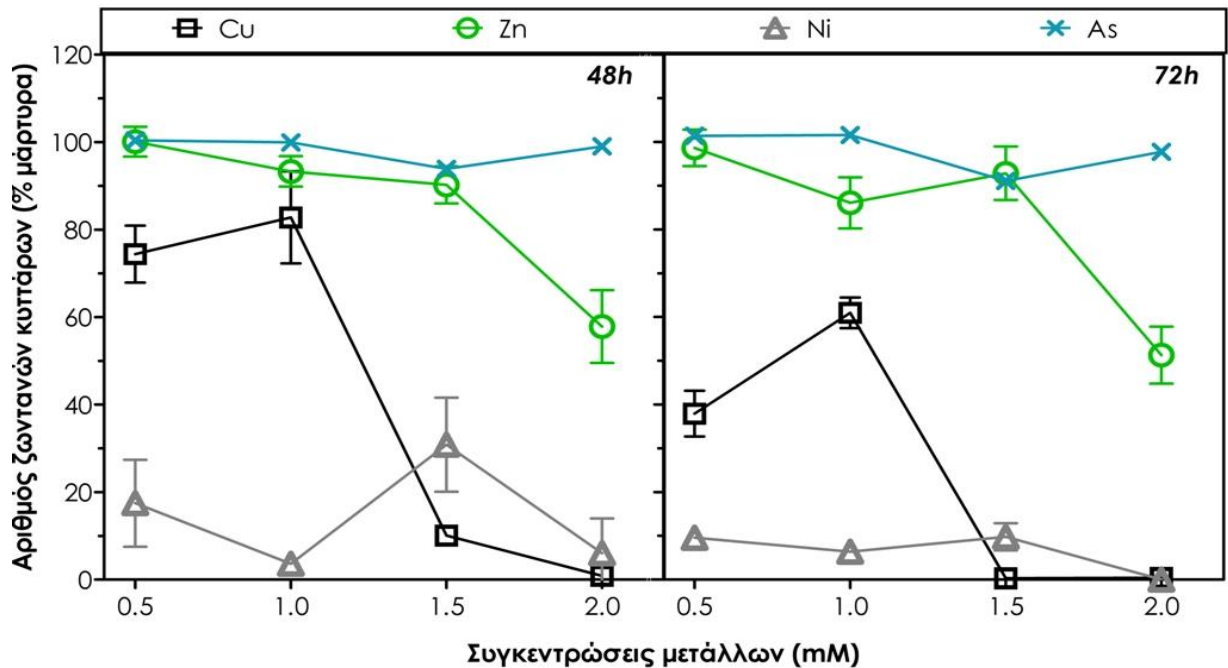
θνησιμότητα (αριθμός νεκρών κυττάρων) σχεδόν όλων των καλλιέργειών αυξήθηκε κατά ένα τρόπο ανάλογο με το χρόνο. Μετά το πέρας των 72 ωρών, όλες οι καλλιέργειες είχαν ποσοστό νεκρών κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα, μεγαλύτερο του 90%.

Στη περίπτωση του As, καλλιέργειες φάνηκαν να μην επηρεάζονται από τη προσθήκη αυτού στις διάφορες συγκεντρώσεις. Η βιωσιμότητα τους (αριθμός ζωντανών κυττάρων) παρέμεινε στα ίδια υψηλά επίπεδα με αυτά του μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης τους σε αυτό.

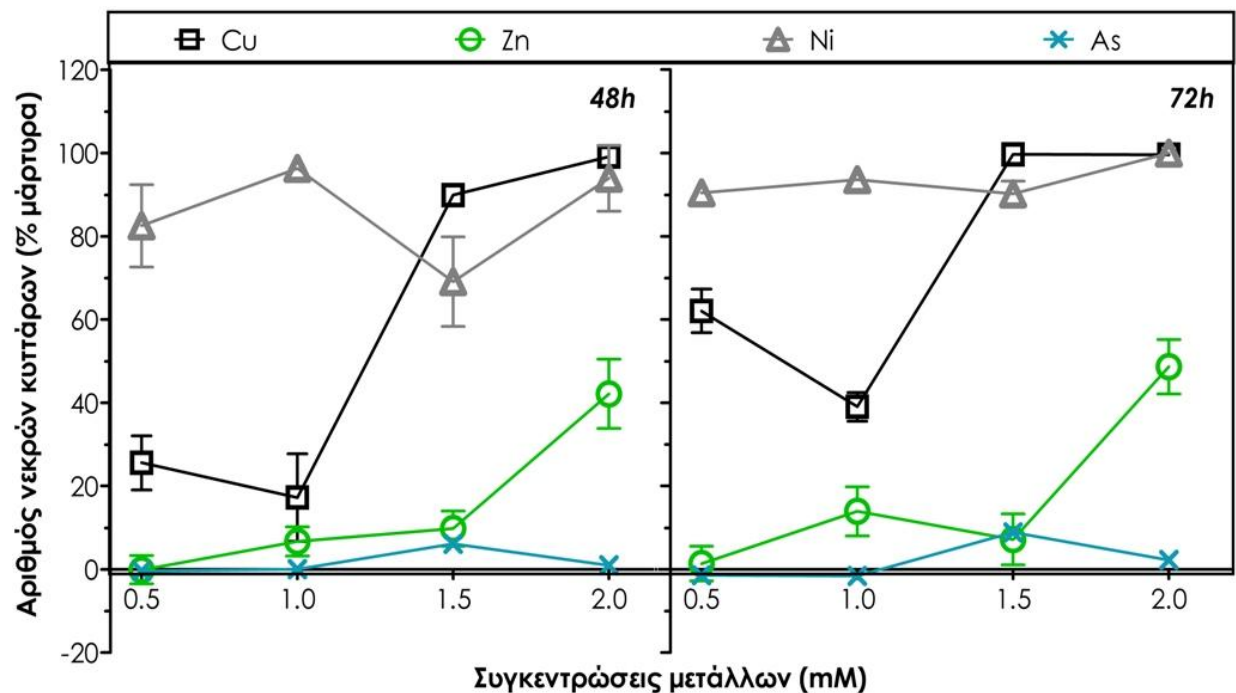
Στις **Εικόνες 40, 41** γίνεται σύγκριση μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων των μετάλλων καθώς και του As στη βιωσιμότητα (αριθμός ζωντανών/νεκρών κυττάρων) των καλλιέργειών, που αφορά μόνο τους 2 τελευταίους χρόνους της τοξικής φάσης (48 και 72h). Είναι φανερό ότι το Ni (σε μεγαλύτερο βαθμό) και ο Cu (σε μικρότερο βαθμό) είχαν τη μεγαλύτερη δυσμενή επίδραση στην βιωσιμότητα των κυττάρων του οργανισμού ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Το Ni επέφερε σημαντική μείωση των ζωντανών κυττάρων ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (όπως 0,5 mM). Ο Cu επέφερε παρόμοια αποτελέσματα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από το Ni (Cu 1,5 mM). Από όλα τα προστιθέμενα βαρέα μέταλλα, μόνο ο Cu και το Ni επέφεραν καθολικό κυτταρικό θάνατο. Αυτό παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις $\geq 1,5$ mM για το Cu στις 72 ώρες και στα 2,0 mM για το Ni στις 72 ώρες αντίστοιχα.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, το As, σε όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις του φαίνεται να μην επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων των καλλιέργειών. Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων των καλλιέργειών ήταν στα ίδια επίπεδα με το μάρτυρα και στις 48 και στις 72 ώρες και ανεξάρτητα από τη προστιθέμενη συγκέντρωση του στις καλλιέργειες. Το ίδιο σχεδόν παρατηρήθηκε και για το Zn αλλά σε μικρότερο βαθμό. Οι καλλιέργειες με 0,5 – 1,5 mM Zn είχαν σχετικά υψηλά επίπεδα ζωντανών κυττάρων και για τους 2 επιλεγμένους χρόνους της τοξικής φάσης. Όταν όμως αυξήθηκε η συγκέντρωση του Zn στις καλλιέργειες, ο αριθμός νεκρών κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα.

Επομένως η σειρά τοξικότητας στη βιωσιμότητα των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* ανάμεσα στα εξεταζόμενα βαρέα μέταλλα είναι Ni > Cu > Zn > As για τις 48 και 72 ώρες (κατά φθίνουσα σειρά τοξικότητας).



Εικόνα 40. Εκτίμηση της του αριθμού ζωντανών κυττάρων (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.



Εικόνα 41. Εκτίμηση της του αριθμού νεκρών κυττάρων(ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

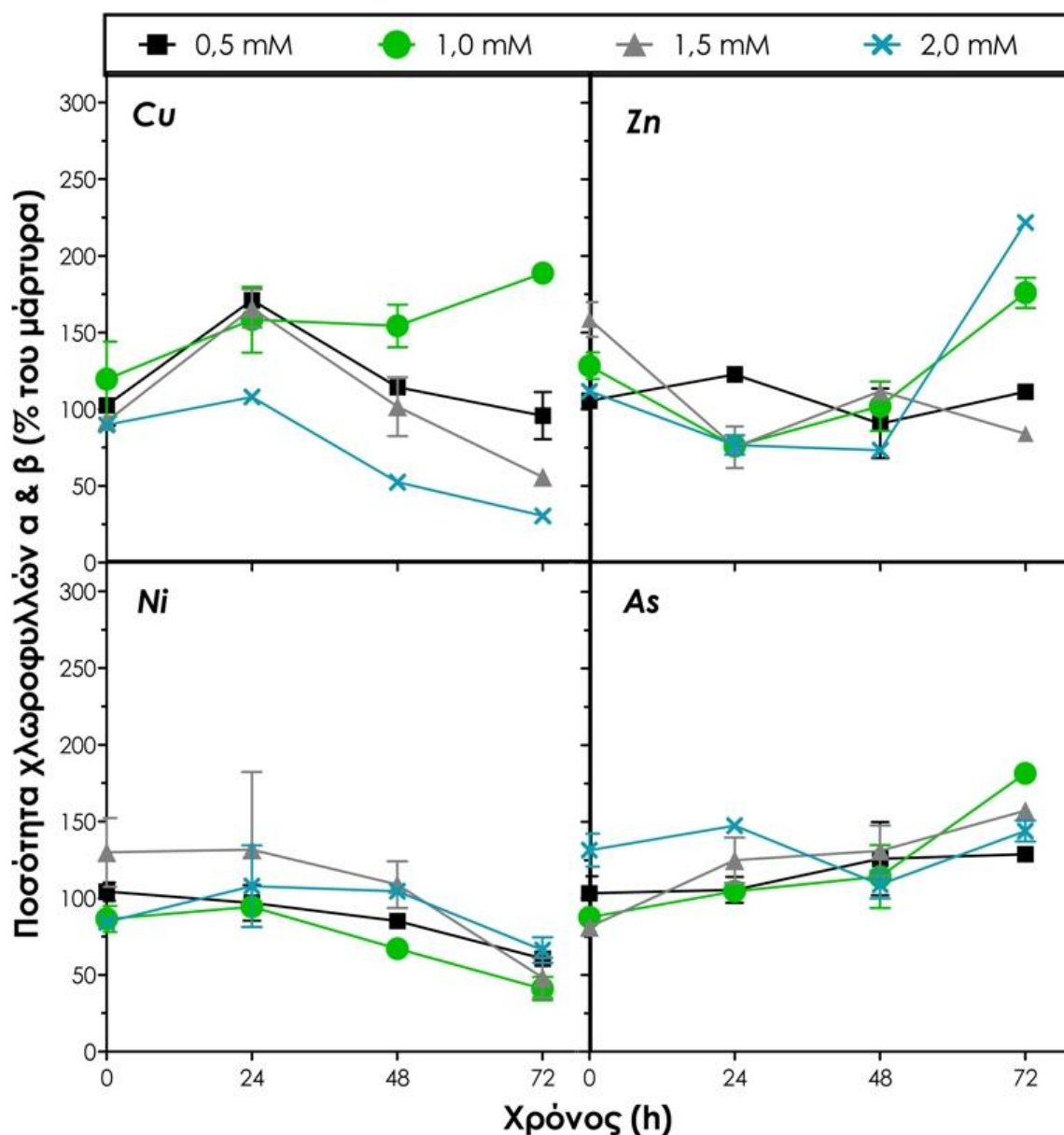
3.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ

Μια άλλη παράμετρος που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ικανότητας προσαρμογής των μικροφυκών είναι η παραγωγή χρωστικών ουσιών, επειδή αντικατοπτρίζει την κυτταρική βιωσιμότητα που σχετίζεται με τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Ajayan and Selvaraju, 2012). Η μέτρηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας αποτελεί μια καλή μέθοδο για την ανίχνευση πιθανής κατάστασης stress, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αφορούν τα βαρέα μέταλλα (Arpenroth, 2010a). Στα γραφήματα που ακολουθούν (**Εικόνες 42, 43**), παρουσιάζονται οι μετρήσεις των χλωροφυλλών (α+β) που πραγματοποιήθηκαν κατά τη τοξική φάση, εκφρασμένες ως ποσοστό % του μάρτυρα.

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 42**, ο Cu επέφερε αύξηση των συνολικών χλωροφυλλών (α+β) τις πρώτες 24 ώρες. Οι καλλιέργειες με 0,5, 1,0 και 1,5 mM Cu έφτασαν τα ίδια σχεδόν ποσοστά σε συνολικές χλωροφύλλες μεταξύ τους (158,4 – 171,1% επί του μάρτυρα). Οι καλλιέργειες με 2,0 mM αύξησαν τις συνολικές τους χλωροφύλλες (α+β) σε μικρότερη έκταση από τις υπόλοιπες η οποία αύξηση αυτών έφτασε το 108,1% σε σχέση με το μάρτυρα. Μετά το διάστημα αυτό, οι καλλιέργειες με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Cu άρχισαν να μειώνουν τις χλωροφύλλες τους έως το τέλος της τοξικής φάσης, με αποτέλεσμα μετά το πέρας των 72 ωρών να έχουν το μικρότερο ποσοστό συνολικών χλωροφυλλών σε σχέση με το μάρτυρα (95,8, 55,7 και 30,5% αντίστοιχα). Αυτό επιβεβαιώνει τη μικροσκοπική παρατήρηση που έγινε προηγουμένως (**Εικόνα 29**), όπου τα κύτταρα των καλλιεργειών με 1,5 και 2,0 mM Cu ήταν κίτρινου χρώματος. Εν αντιθέσει, στο τέλος της τοξικής φάσης, οι καλλιέργειες με 1,0 mM Cu αύξησαν το ποσοστό των συνολικών χλωροφυλλών το οποίο στο τέλος της τοξικής φάσης έφτασε το 188,7% επί του μάρτυρα.

Οι συνολικές χλωροφύλλες των καλλιεργειών με τις συγκεντρώσεις Ni αφού παρουσίασαν σχεδόν ίδιο (για τις καλλιέργειες με 0,5, 1,0 και 1,5 mM Ni) έως και ελαφρά αυξημένο (για τις καλλιέργειες με 2,0 mM Ni) ποσοστό σε σχέση με το μάρτυρα έως τις πρώτες 24 ώρες, μετά οι χλωροφύλλες των καλλιεργειών με όλες τις συγκεντρώσεις Ni μειώθηκαν στο 45% περίπου επί του μάρτυρα για τις καλλιέργειες με 1,0 και 1,5 mM και στο 63% περίπου για αυτές με 0,5 και 2,0 mM Ni.

Σε αντίθεση, ο Zn, σε όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις του (εκτός των 0,5 mM), τις πρώτες 24 ώρες επέφερε μείωση των συνολικών χλωροφυλλών που έφτασε περίπου το 75% επί του μάρτυρα. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες με 1,0 και 2,0 mM παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού αυτού το οποίο έφτασε το 176 και 221,9% αντίστοιχα έως το τέλος της τοξικής φάσης. Οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,5 mM Zn παρουσίασαν αυξομείωση του ποσοστού των συνολικών χλωροφυλλών με περιοδικότητα ανά 24 ώρες όπου τελικά μετά τις 72 ώρες, οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,5 mM Zn έφτασαν τα 111,5 και 84,1% επί του μάρτυρα αντίστοιχα.



Εικόνα 42. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλες (α+β) κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Οι καλλιέργειες με όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις As, παρουσίασαν ελαφρά αύξηση των συνολικών χλωροφυλλών καθ' όλη τη διάρκεια της τοξικής φάσης η οποία τελικά έφτασε το 128,9, 181,7, 157,2 και 144,1% επί του μάρτυρα για τις καλλιέργειες με 0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 mM As αντίστοιχα.

Η μείωση των συνολικών χλωροφυλλών (α + β) που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Cu και στις καλλιέργειες με όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Ni, στο τέλος της τοξικής φάσης, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα μέταλλα αυτά υποκαθιστούν το Mg στο μόριο των χλωροφυλλών. Έχει δειχθεί ότι πολλά μέταλλα (όπως Cd, Hg, Pb, Cu, Zn, και

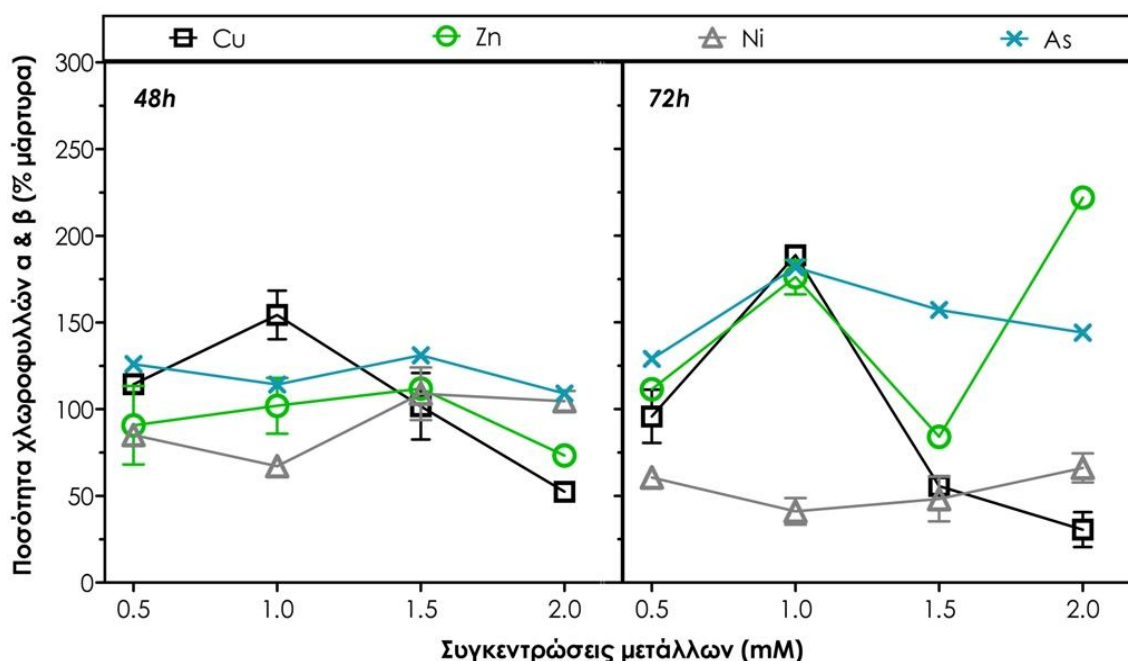
το Ni) μπορούν να αντικαταστήσουν το Mg στο μόριο της χλωροφυλλών με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε ανενεργά μόρια [heavy metal substituted chl: (hms – chls)], (Kürper et al., 2002, Sabatini et al., 2009, Solymosi and Bertrand, 2012, Wan Maznah et al., 2012).

Επίσης, η μείωση των συνολικών χλωροφυλλών που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με τις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις Cu και Ni, συνοδεύτηκε και με μια αλλαγή του χρώματος των καλλιεργειών σε πράσινο – καστανό χρώμα όπως παρατηρήθηκε μακροσκοπικά (**Εικόνα 28A, Γ**), η οποία αλλαγή αποδόθηκε στη πιθανή αποδόμηση των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες. Σε πειράματα που διεξήχθησαν με το μικροφύκος *Scenedesmus quadricauda* παρουσία Cu, ο σχηματισμός Cu – Chl στα μεταχειρισμένα με Cu κύτταρα συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό φαιοφυτινών (Kürper et al., 2002). Ο σχηματισμός Cu – Chl των χλωροφυλλών του συμπλόκου συλλογής φωτός LHC II μπορεί να προκαλέσει μια διαμορφωτική αλλαγή στο σύμπλοκο οδηγώντας κάποια Mg – chl στο όξινο περιβάλλον του θυλακοειδούς αυλού. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στη παραγωγή φαιοφυτινών (Kürper et al., 2002).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι τα είδη που αναπτύσσονται και απομονώνονται από ρυπασμένες περιοχές, έχουν υψηλότερη αντοχή και ικανότητα συσσώρευσης βαρέων μετάλλων (Arica et al., 2005, Bayramođlu et al., 2006, Souza et al., 2012). Επίσης η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων διαφέρει αρκετά μεταξύ των ποικίλων διεξαχθέντων πειραμάτων, ανάλογα τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις τους, το χρησιμοποιούμενο στέλεχος του οργανισμού, το χρόνο έκθεσης του καθώς και τον αριθμό των κυττάρων του που χρησιμοποιήθηκε.

Για παράδειγμα, στη παρούσα εργασία, η μείωση των συνολικών χλωροφυλλών σημειώθηκε στις συγκεντρώσεις 1,5 και 2,0 mM Cu μετά το πέρας των 24 ωρών και έως το τέλος της τοξικής φάσης, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν (0,5 και 1,0 mM Cu), οι χλωροφύλλες των καλλιεργειών έμειναν τουλάχιστον στα ίδια επίπεδα με το μάρτυρα μετά τις 72 ώρες. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι Boswell et al., 2002 παρατήρησαν μείωση στο περιεχόμενο των συνολικών χλωροφυλλών όταν το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* εκτέθηκε σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτές του παρόντος πειράματος (150 – 200 μM CuSO_4). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ενόψει τοξικής φάσης. Οι Boswell et al. πρόσθεσαν το Cu σε 10^5 κύτταρα $\cdot \text{ml}^{-1}$ ενώ στο παρόν πείραμα ο Cu προστέθηκε σε καλλιέργειες με $6,3 \cdot 10^6$ κύτταρα $\cdot \text{ml}^{-1}$. Είναι γνωστό ότι οι υψηλές πυκνότητες κυττάρων μπορούν να μειώσουν το τοξικό φορτίο στα κύτταρα (Abalde et al., 1995, Levy et al., 2005). Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από πειράματα που διεξήχθησαν στα *Chlorella* sp. και *S. capricornutum* σχετικά με τη κυτταρική πυκνότητα, έδειξαν ότι η τοξικότητα του Cu μειώθηκε όταν αυξήθηκε η αρχική κυτταρική πυκνότητα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για άλλα μέταλλα συμπεριλαμβανομένων των Cu, Zn και Cd (Franklin et al., 2002).

Στην **Εικόνα 43** γίνεται σύγκριση μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων των μετάλλων καθώς και του As στο περιεχόμενο των καλλιεργειών σε χλωροφύλλες (α+β), που αφορά μόνο τους 2 τελευταίους χρόνους της τοξικής φάσης (48 και 72h). Τα δεδομένα της **Εικόνας 43** δείχνουν ότι η δράση των βαρέων μετάλλων στη συγκεκριμένη εξεταζόμενη παράμετρο δεν ήταν γραμμικά εξαρτώμενη με τη συγκέντρωση αυτών στο μέσο καλλιέργειας. Παρόλα αυτά, σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός του Ni, ήταν εμφανής μια αύξηση της περιεκτικότητας των συνολικών χλωροφυλλών σε σχέση με το μάρτυρα κυρίως στο 1,0 mM του εκάστοτε βαρέως μετάλλου κατά το τέλος της τοξικής φάσης (72h).



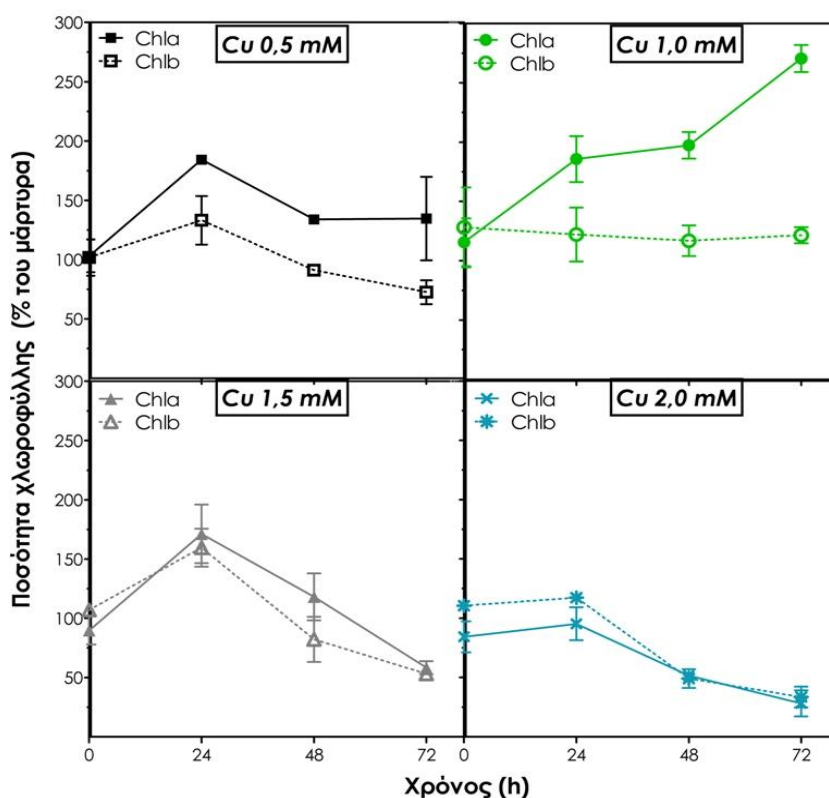
Εικόνα 43. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλες (α+β) κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Επομένως η σειρά τοξικότητας στο περιεχόμενο των χλωροφυλλών των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* ανάμεσα στα εξεταζόμενα βαρέα μέταλλα είναι Ni \approx Zn \approx Cu > As για τις 48 ώρες και Ni > Cu > Zn > As για τις 72 ώρες (κατά φθίνουσα σειρά τοξικότητας). Οι Mosleh and Mofeed, 2014 κατέληξαν ότι η σειρά τοξικότητας ήταν Cd > Cu > Zn όταν το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* εκτέθηκε για 96 ώρες στα συγκεκριμένα μέταλλα. Στην ίδια σειρά τοξικότητας (Cu > Zn) κατέληξαν και άλλοι ερευνητές για διάφορα χλωροφύκη που απομονώθηκαν από ρυπασμένα με μέταλλα εδαφικά δείγματα (Kalinowska and Pawlik-Skowrońska, 2008).

Το μέγιστο της περιεκτικότητας των συνολικών χλωροφυλλών που παρατηρήθηκε για 1,0 mM Cu, Zn και As στις 72 ώρες, το οποίο φτάνει κατά μέσο όρο το 181,9% επί του μάρτυρα έχει

καταγραφεί και σε άλλες μελέτες. Η διεγερτική επίδραση του Cu στις χλωροφύλλες παρατηρήθηκε όταν το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* εκτέθηκε σε 10^{-9} M όπου οι χλωροφύλλες α και β αυξήθηκαν σταδιακά κατά τη περίοδο της έκθεσης του μικροφύκου στο μέταλλο, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ο Cu προκάλεσε σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλες. Οι Afkar et al., 2010 υποστήριξαν ότι το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί είτε ως αποτέλεσμα της απαίτησης του μικροφύκου σε Cu για τις μεταβολικές διεργασίες του είτε στην παραγωγή κάποιας οργανικής ένωσης η οποία μειώνει την τοξικότητα του μετάλλου.

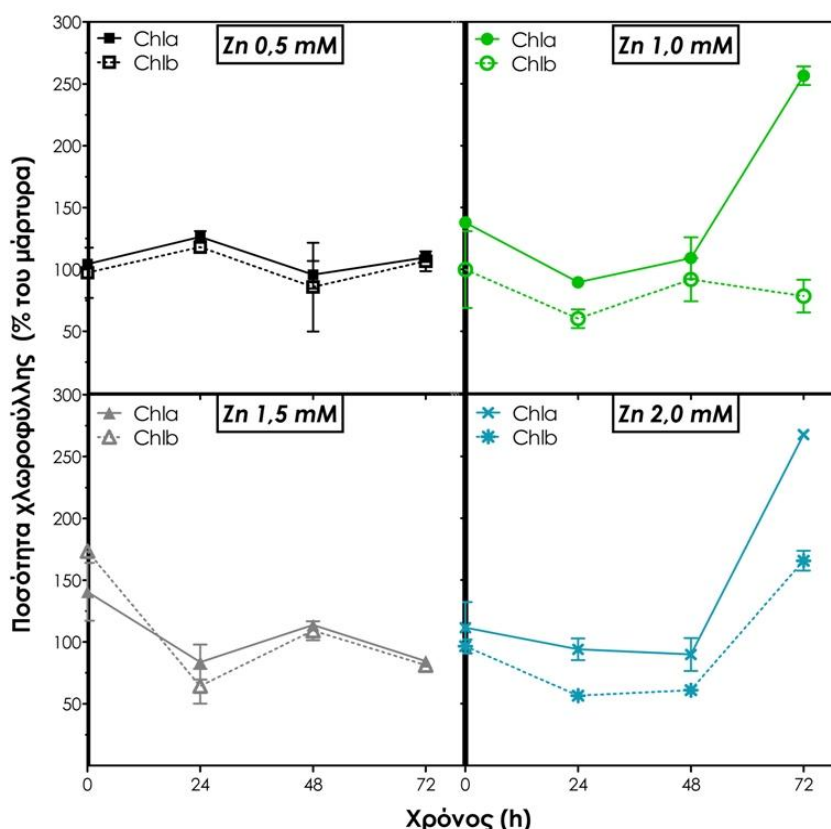
Στις **Εικόνες 44 - 48** απεικονίζονται τα αποτελέσματα του περιεχομένου των χλωροφυλλών α και β ξεχωριστά, προκειμένου να εξεταστεί το ποια από τις χλωροφύλλες α και β επηρεάστηκε πιο δυσμενώς από τη παρουσία των βαρέων μετάλλων.



Εικόνα 44. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιέργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης Cu για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Εξετάζοντας την αύξηση που παρατηρήθηκε στο ποσοστό των συνολικών χλωροφυλλών (α+β), στις καλλιέργειες με όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu κατά το διάστημα των πρώτων 24 ωρών, γίνεται αντιληπτό πως και οι 2 χλωροφύλλες αυξήθηκαν αλλά σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μία (**Εικόνα 44**). Η αύξηση αυτή ήταν μεγαλύτερη για τη

χλωροφύλλη α από την αύξηση της χλωροφύλλης β για όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu ακόμα και για τις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu όπου η χλωροφύλλη α αυξήθηκε από 84,3% (0h) στο 95,2% (24h) επί του μάρτυρα ενώ η χλωροφύλλη β αυξήθηκε από 110,4% (0h) στο 117,2% (24h) αντίστοιχα. Μετά το διάστημα των 72 ωρών, η χλωροφύλλη β μειώθηκε από την έναρξη της τοξικής φάσης (0h) σε μεγαλύτερη έκταση από τη χλωροφύλλη α για τις καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Cu, ενώ για τις καλλιέργειες με 0,5 mM Cu κατά το τέλος της τοξικής φάσης η χλωροφύλλη β μειώθηκε κατά 29,1% σε αντίθεση με τη χλωροφύλλη α που αυξήθηκε κατά 31,5%.

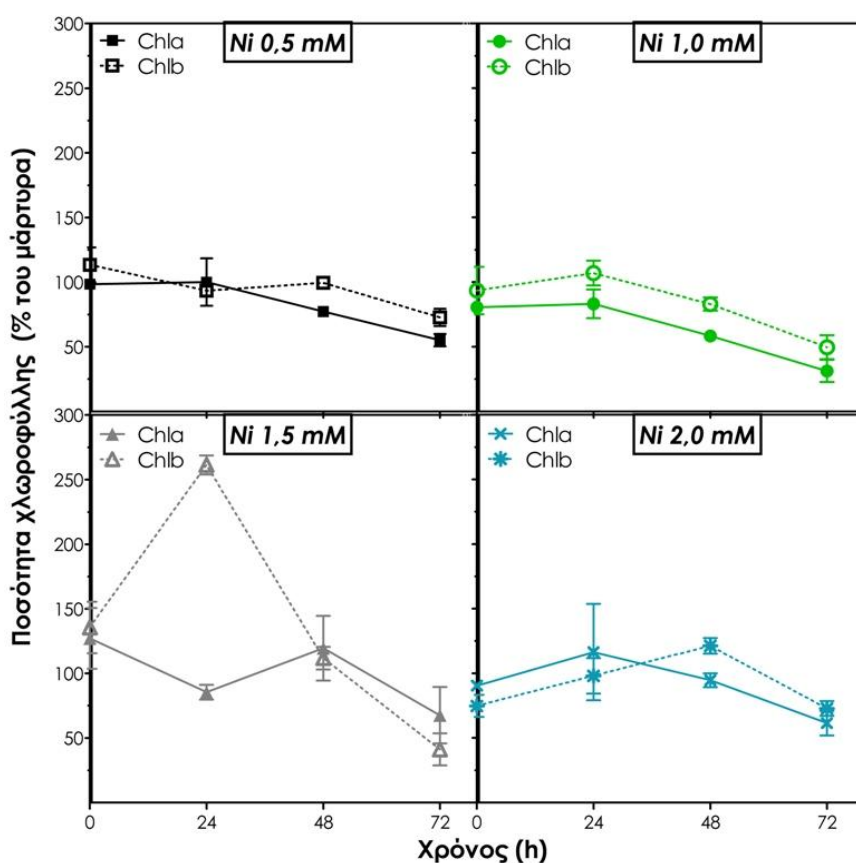


Εικόνα 45. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης Zn για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Στη περίπτωση του Zn (**Εικόνα 45**), παρατηρήθηκε μείωση των συνολικών χλωροφυλλών (α+β) για όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις (εκτός των 0,5 mM), τις πρώτες 24 ώρες. Εξετάζοντας τα ποσοστά της χλωροφύλλης α και β επί του μάρτυρα για το διάστημα αυτό, προέκυψε ότι η μείωση αυτή προέκυψε από τη μείωση και των 2 χλωροφυλλών ξεχωριστά, με τη χλωροφύλλη β να ελαττώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τη χλωροφύλλη α όσον αφορά τις καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Zn. Οι καλλιέργειες με 1,0 mM Zn μείωσαν τα ποσοστά χλωροφυλλών με τη μεγαλύτερη ελάττωση να παρατηρείται στη χλωροφύλλης α σε σχέση με

αυτή της χλωροφύλλης β. Η αύξηση των συνολικών χλωροφυλλών (α+β) που παρατηρήθηκε στο τέλος της τοξικής φάσης (72 ώρες) για τις καλλιέργειες με 1,0 και 2,0 mM Zn σε σύγκριση με την έναρξη της τοξικής φάσης, ήταν αποτέλεσμα της αύξησης μόνο της χλωροφύλλης α αφού η χλωροφύλλη β μειώθηκε για τη περίπτωση του 1,0 mM Zn και της αύξησης και των 2 χλωροφυλλών για τη περίπτωση του 2,0 mM Zn.

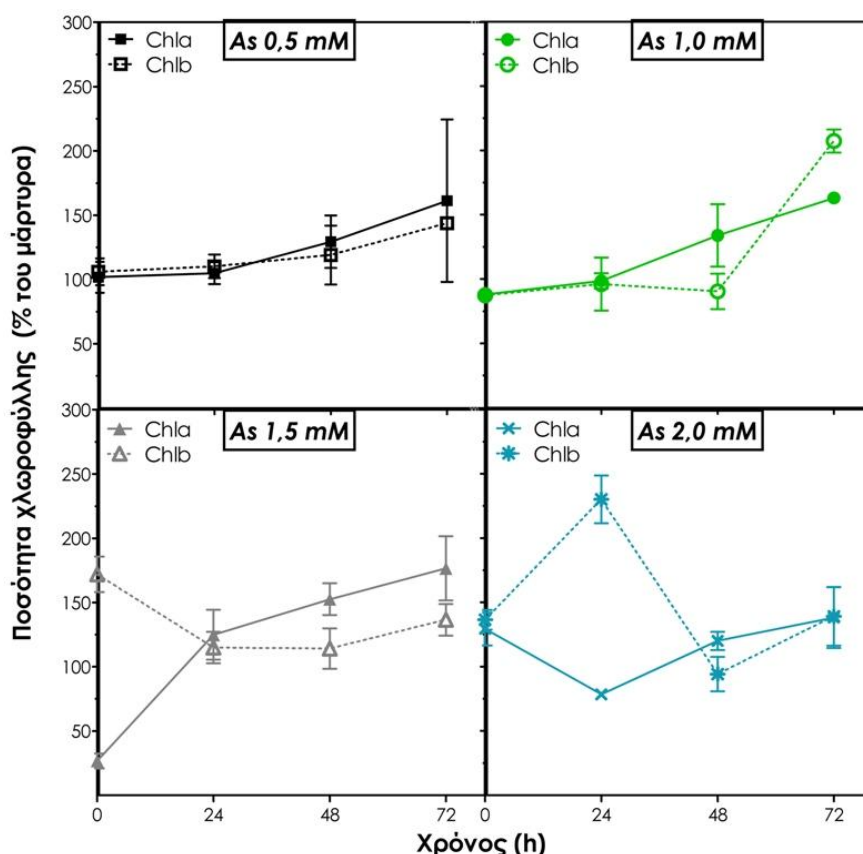
Η αντίστοιχη περιοδικότητα αυξομείωσης των συνολικών χλωροφυλλών (α+β) που παρουσιάστηκε στις καλλιέργειες με 0,5 και 1,5 mM Zn παρουσιάστηκε αντίστοιχα και στις χλωροφύλλες α και β ξεχωριστά. Τελικά η ελάχιστη αύξηση που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με 0,5 mM Zn αποδόθηκε στις εξίσου ελάχιστες αυξήσεις των χλωροφυλλών α και β (5,2 και 9,3% αντίστοιχα), ενώ η μείωση των συνολικών χλωροφυλλών που παρατηρήθηκε για τις καλλιέργειες με 1,5 mM Zn συνοδεύτηκε με μείωση της χλωροφύλλης β (μείωση κατά 92,2%) και της χλωροφύλλης α (μείωση κατά 56,1%) αντίστοιχα.



Εικόνα 46. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης Νί για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Στο τέλος της τοξικής φάσης, οι καλλιέργειες με τις διάφορες συγκεντρώσεις Νί είχαν μικρότερα ποσοστά χλωροφύλλης α και β σε σχέση με το μάρτυρα (**Εικόνα 46**). Η

χλωροφύλλη α μειώθηκε σχεδόν το ίδιο με τη χλωροφύλλη β για τις καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM Νί από την έναρξη έως το τέλος της τοξικής φάσης. Η μείωση αυτή υπολογίστηκε κατά 44% κατά μέσο όρο. Αντίθετα οι καλλιέργειες με 1,5 mM μείωσαν τη χλωροφύλλη α κατά 59,6% και τη χλωροφύλλη β μείωση κατά 94,4% σε σχέση με το χρόνο 0h. Αντίστοιχα, οι καλλιέργειες με 2,0 mM Νί μείωσαν μόνο το ποσοστό της χλωροφύλλης α ενώ η χλωροφύλλη β παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο με αυτό που παρατηρήθηκε κατά την έναρξη της τοξικής φάσης.

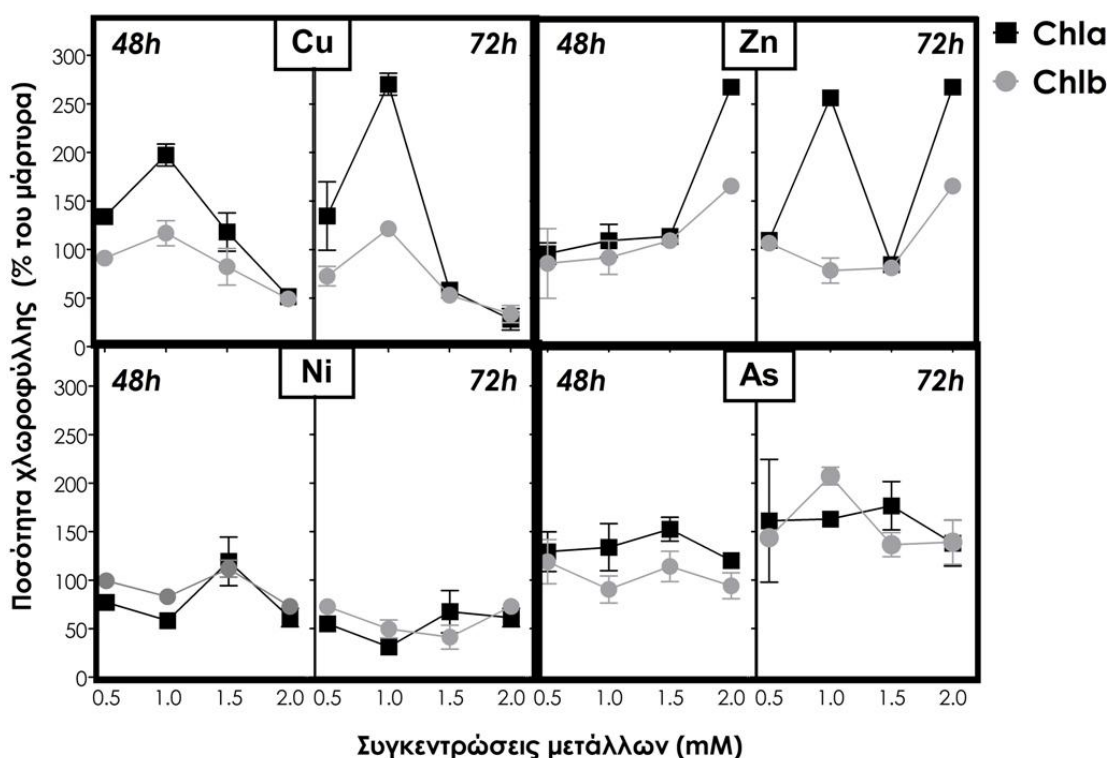


Εικόνα 47. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Οι καλλιέργειες με όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις As (**Εικόνα 47**), παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού της χλωροφύλλης α καθ' όλη τη διάρκεια της τοξικής φάσης. Αντίθετα η χλωροφύλλη β, από την έναρξη έως το τέλος της τοξικής φάσης, ενώ αυξήθηκε για τις καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM As, μειώθηκε για τις καλλιέργειες με 1,5 mM As και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα που παρατηρήθηκαν για το χρόνο 0h, για τις καλλιέργειες με 2,0 mM As. Παρόλα αυτά, όλες οι καλλιέργειες, ανεξαρτήτου προστιθέμενης ποσότητας As, παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά χλωροφύλλης α και β σε σχέση με το μάρτυρα. Για τις καλλιέργειες με 0,5 mM As η αύξηση που παρατηρήθηκε για τις 2 χλωροφύλλες ήταν μεγαλύτερη για τη

χλωροφύλλη α ενώ αντίθετα οι καλλιέργειες με 1,0 mM As παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης της χλωροφύλλης β.

Στην **Εικόνα 48** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ των χλωροφυλλών α και β για κάθε προστιθέμενο μέταλλο(ειδές) που αφορούν μόνο τους τελευταίους χρόνους της τοξικής φάσης (48 και 72h). Στις περισσότερες περιπτώσεις που αφορούν τις επεμβάσεις με Cu, Zn, τα ποσοστά της χλωροφύλλης α των καλλιεργειών ήταν μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα της χλωροφύλλης β επί του μάρτυρα. Παρόλα αυτά, σε κάποιες προστιθέμενες συγκεντρώσεις οι χλωροφύλλες α και β είχαν σχεδόν τα ίδια ποσοστά επί του μάρτυρα (π.χ. Cu 1,5 και 2,0 mM στις 72 ώρες). Όσον αφορά τις καλλιέργειες με τις διάφορες συγκεντρώσεις Ni, και στους 2 χρόνους της τοξικής φάσης, η χλωροφύλλη β είχε ελαφρώς μεγαλύτερα ποσοστά επί του μάρτυρα σε σχέση με τα αντίστοιχα της χλωροφύλλης α, για τις περισσότερες προστιθέμενες συγκεντρώσεις. Τέλος στη περίπτωση του As για τις 48 ώρες, οι καλλιέργειες είχαν μεγαλύτερα ποσοστά χλωροφύλλης α από ότι χλωροφύλλης β σε σχέση με το μάρτυρα, ανεξαρτήτου προστιθέμενης συγκέντρωσης του μεταλλοειδούς. Στο τέλος της τοξικής φάσης (72h), το μοτίβο άλλαξε με τη χλωροφύλλη β να έχει μεγαλύτερα και ίσα ποσοστά (επί του μάρτυρα) με τη χλωροφύλλη α για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις 1,0 και 2,0 mM αντίστοιχα.



Εικόνα 48. Εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Από τα παραπάνω θα μπορούσε να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η χλωροφύλλη β επηρεάστηκε περισσότερο δυσμενώς από τη χλωροφύλλη α σε σχέση με τα αντίστοιχα ποσοστά του μάρτυρα. Παρόλα αυτά, η χλωροφύλλη β είναι λιγότερο επιρρεπής από τη χλωροφύλλη α στην υποκατάσταση του Mg από άλλα μέταλλα με αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ανενεργά hms – chls (Kürper et al., 2002).

Οι Rai et al., 1991 παρατήρησαν ότι η χλωροφύλλη β υπέστη τη μεγαλύτερη αναστολή από τις υπόλοιπες χρωστικές (χλωροφύλλη α και καροτενοειδή) όταν το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* εκτέθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις Zn και Hg. Επίσης ο Zn έχει δείξει περισσότερο ανασταλτικά αποτελέσματα επί της χλωροφύλλης β σε σχέση με τη χλωροφύλλη α για τα φύκη *Scenedesmus obliquus* και *Scenedesmus quadricauda* (Omar, 2002) το οποίο είναι σύμφωνο με τα παρόντα αποτελέσματα.

Αντίθετα οι Abalde et al., 1995, οι οποίοι μελέτησαν το περιεχόμενο του μικροφύκου *Dunaliella tertiolecta* σε χρωστικές, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το περιεχόμενο της χλωροφύλλης α και των καροτενοειδών επηρεάστηκε περισσότερο δυσμενώς από τη παρουσία του Cu ($8 - 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) σε σύγκριση με το περιεχόμενο της χλωροφύλλης β. Η χλωροφύλλη β παρέμεινε σταθερή στις διάφορες καλλιέργειες, κατά την διάρκεια του χρόνου (0, 24 και 48h), χωρίς διαφορές μεταξύ των καλλιεργειών με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις Cu και του μάρτυρα.

3.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η ανάπτυξη είναι το καθαρό αποτέλεσμα ενός συνόλου μεταβολικών διεργασιών και ο τρόπος δράσης των ρύπων μπορεί να αξιολογηθεί με απλές κυτταροτοξικές παραμέτρους. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αποτελεί μια τέτοια αξιόπιστη παράμετρο (Niestroy et al., 2014). Για να γίνει η ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, αρχικά κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με το προσδιορισμό της BSA (αλβουμίνη βοείου ορού) σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 49**, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι προστιθέμενες ποσότητες βαρέων μετάλλων, ευνόησαν την αύξηση των πρωτεϊνών σε σχέση με το μάρτυρα, κατά το πρώτο διάστημα των 24 ωρών. Στο Cu φαίνεται πως μόνο οι συγκεντρώσεις 1,5 και 2,0 mM είχαν δυσμενή επίδραση στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά, κατά τις πρώτες 24 ώρες, οι καλλιέργειες με τις μικρότερες συγκεντρώσεις Cu (0,5 και 1,0 mM) παρουσίασαν αύξηση του περιεχομένου τους σε πρωτεΐνες σε σχέση με το μάρτυρα. Ο Cu επέφερε μια αύξηση κατά 111,9% (για τις καλλιέργειες με 0,5 mM Cu: 95,7% το χρόνο 0h και 207,6 το χρόνο 24h) και 135,1% αντίστοιχα (για τις καλλιέργειες με 1,0 mM Cu: 151,9% το χρόνο 0h και 287,0 το χρόνο 24h) ενώ οι μεγαλύτερες προστιθέμενες συγκεντρώσεις παρέμειναν σχεδόν σταθερές και στο ίδιο ποσοστό με το μάρτυρα έως τις 48 ώρες. Τελικά η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη όλων

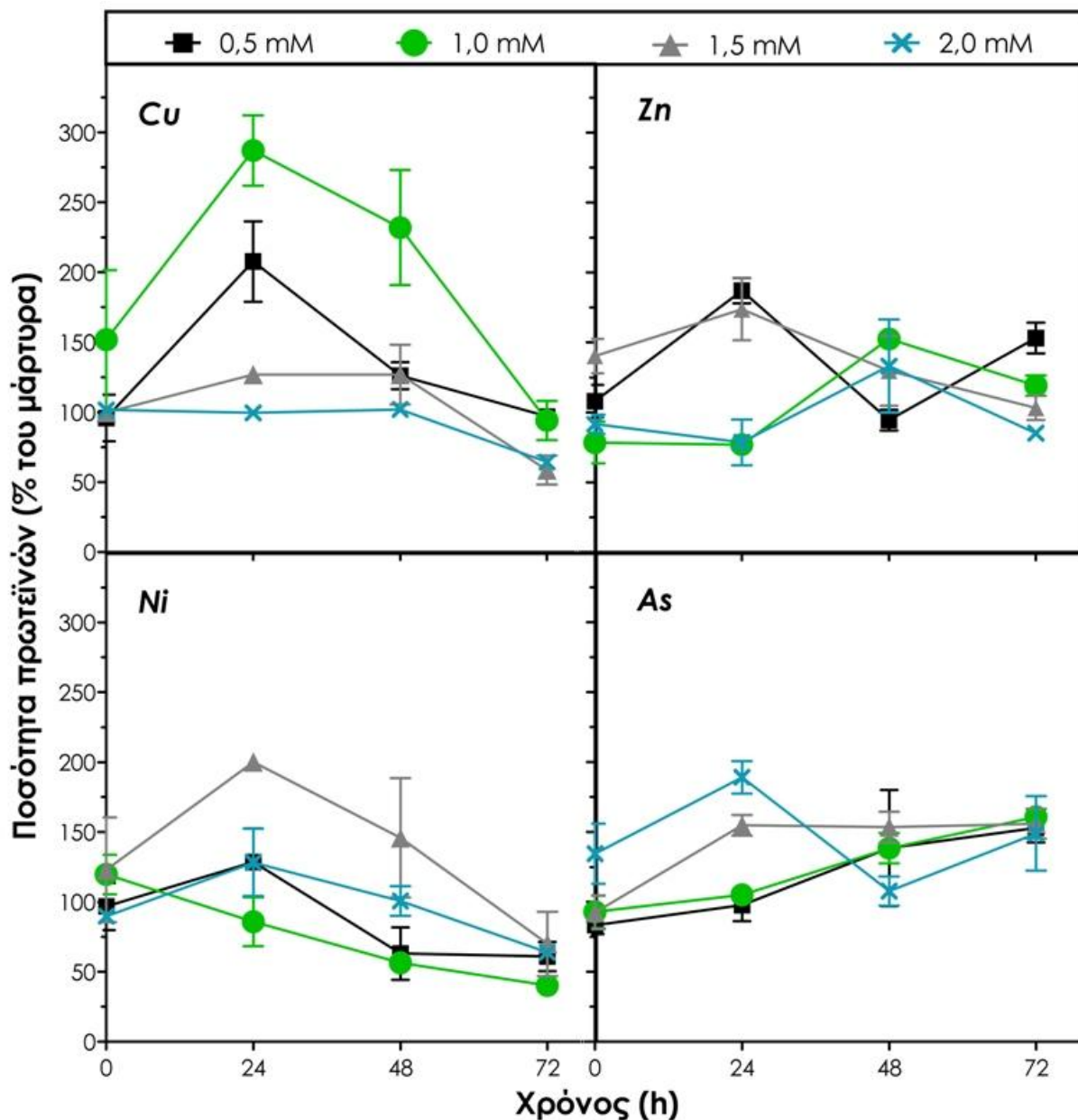
των καλλιεργειών με Cu μειώθηκε φτάνοντας στις 72 ώρες το ίδιο σχεδόν ποσοστό με το μάρτυρα για τις καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM Cu και μικρότερο από αυτόν κατά περίπου 50% για τις καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Cu.

Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στο Ni. Όλες οι συγκεντρώσεις, εκτός του 1,0 mM Ni, επέφεραν μια αύξηση στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών των καλλιεργειών σε σχέση με το μάρτυρα κατά το διάστημα του πρώτου 24ώρου. Η αύξηση αυτή ήταν μικρότερης έκτασης από αυτή που παρατηρήθηκε στο Cu. Οι καλλιέργειες με 1,5 mM Ni αύξησαν σε μεγαλύτερο βαθμό από τις υπόλοιπες με Ni καλλιέργειες το περιεχόμενο των πρωτεϊνών τους σε σχέση με το μάρτυρα (αύξηση κατά 77,2%). Μετά το διάστημα αυτό και μέχρι το τέλος της τοξικής φάσης οι καλλιέργειες μείωσαν το περιεχόμενο τους σε πρωτεΐνες σε σχέση με το μάρτυρα το οποίο έφτασε σχεδόν το 65% για αυτές τις καλλιέργειες με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Ni. Οι καλλιέργειες με 1,0 mM Ni έδειξαν μειωτική τάση στο σύνολο των πρωτεϊνών τους από την αρχή της τοξικής φάσης η οποία κλιμακώθηκε στις 72 ώρες, φτάνοντας το ποσοστό των 40,1% επί του μάρτυρα.

Όσον αφορά τις μεταχειρίσεις με Zn, οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM επέδειξαν συνολικά αύξηση της περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνες η οποία από το 108,0 και 78,5% που ήταν αντίστοιχα στην αρχή της τοξικής φάσης έφτασε το 153,2 και 119,2% στο τέλος της τοξικής φάσης. Αντίθετα οι καλλιέργειες με 1,5 mM Zn μειώθηκαν από το 140,3% στην αρχή της τοξικής φάσης (0h) στο 103,3% στις 72 ώρες ενώ αυτές με 2,0 mM Zn παρέμειναν σχεδόν σταθερές (91,6% στις 0h και 85,2% στις 72h). Κατά το πρώτο 24ωρο, οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,5 mM αυξήθηκαν κατά 79 και 33,4% επί του μάρτυρα αντίστοιχα. Ωστόσο, οι υπόλοιπες προστιθέμενες συγκεντρώσεις Zn (1,0 και 2,0 mM) δεν επέφεραν σχεδόν καμία αλλαγή στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών των καλλιεργειών σε σχέση με το μάρτυρα για το διάστημα αυτό. Μετά τις 24 ώρες, οι καλλιέργειες με 1,5 mM άρχισαν να μειώνουν την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες η οποία έφτασε στο ίδιο επίπεδο με το μάρτυρα κατά το τέλος της τοξικής φάσης. Αντίθετα, οι καλλιέργειες με 0,5, 1,0 και 2,0 mM επέδειξαν μια αυξομείωση της περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνες με περιοδικότητα 24 ώρες.

Το As φαίνεται να επέδρασε θετικά στην περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε σχέση με το μάρτυρα, σε όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις του. Οι καλλιέργειες με όλες σχεδόν τις συγκεντρώσεις του As, από την έναρξη έως το τέλος της τοξικής φάσης, παρουσίασαν μια αύξηση κατά 66% περίπου επί του μάρτυρα. Εξαιρέση αποτελούν οι καλλιέργειες με 2,0 mM As η οποίες αύξησαν το περιεχόμενο των πρωτεϊνών τους αλλά σε μικρότερο βαθμό από τις υπόλοιπες (κατά 14,5% επί του μάρτυρα). Οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM As παρουσίασαν μια σχεδόν σταθερή αύξηση του ποσοστού αυτού, καθ' όλη τη διάρκεια της τοξικής φάσης. Οι καλλιέργειες με 1,5 mM As παρουσίασαν μια αύξηση κατά 62,4% ενώ μετά και μέχρι το τέλος της τοξικής φάσης παρέμειναν σχεδόν σταθερές. Από την άλλη, η συγκέντρωση των 2,0 mM As επέφερε και αυτή αύξηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών σε πρωτεΐνες κατά 54,6% επί

του μάρτυρα στο διάστημα των πρώτων 24 ωρών ενώ μετά από μια μείωση που παρουσιάστηκε στις 48 ώρες, οι καλλιέργειες και πάλι αύξησαν το ποσοστό τους σε πρωτεΐνες φτάνοντας στα ίδια επίπεδα με τις υπόλοιπες μεταχειρισμένες καλλιέργειες.



Εικόνα 49. Εκτίμηση της περιεκτικότητας (ως ποσοστά επί του μάρτυρα) των καλλιιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* σε πρωτεΐνες κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

Η επαγωγή των πρωτεϊνών σε σχέση με το μάρτυρα που παρατηρήθηκε κατά το πρώτο διάστημα των 24 ωρών, στις περισσότερες προστιθέμενες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων μπορεί να αποδοθεί στην σύνθεση των μέταλλο – δεσμευτικών πρωτεϊνών (μεταλλοθειονίνες)

βοηθώντας έτσι το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* να επιβιώσει. Η αύξηση του συνόλου των πρωτεϊνών που παρατηρήθηκε κατά το πρώτο 24ωρο έκθεσης του οργανισμού κυρίως σε Cu και Ni, σε συνδυασμό με μια σημαντική μείωση της ανάπτυξης του οργανισμού (**Εικόνα 35**) κατά το διάστημα αυτό, μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι οργανισμός κατασκευάζει πρωτεΐνες κυρίως για την επιβίωση του παρά για την ανάπτυξη του.

Αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες υπό το stress που προκαλούν τα βαρέα μέταλλα έχουν αναφερθεί και από άλλους μελετητές για διάφορα φύκη (όπως *Spirulina platensis*, *Anabaena* sp. και *Odontella mobilis*), (Manimaran et al., 2012, Sabatini et al., 2009). Πιθανότατα η αύξηση αυτή μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας στις δυσμενείς επιδράσεις των βαρέων μετάλλων, μέσω της σύνθεσης προστατευτικών ενζύμων. Η αύξηση αυτή μπορεί να αντανakλά και στην αύξηση των φυτοχελαινών οι οποίες συμμετέχουν σε μηχανισμούς κυτταρικής αποτοξίνωσης μέσω σχηματισμού μεταλλικών συμπλόκων (Sabatini et al., 2009).

Ενδεικτικά αναφέρεται η αύξηση στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί στο *Anabaena doliolum* υπό του stress Ni. Σε 96 ώρες έκθεσης του σε συγκεντρώσεις Ni: 0 – 50μM, το κυανοφύκος αυτό παρουσίασε αύξηση της περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνες κατά τις 48 ώρες. Μετά το διάστημα αυτό και έως το πέρας των 96 ωρών, οι πρωτεΐνες του οργανισμού μειώθηκαν αλλά όχι λιγότερο από αυτές του μάρτυρα (Shukla et al., 2009).

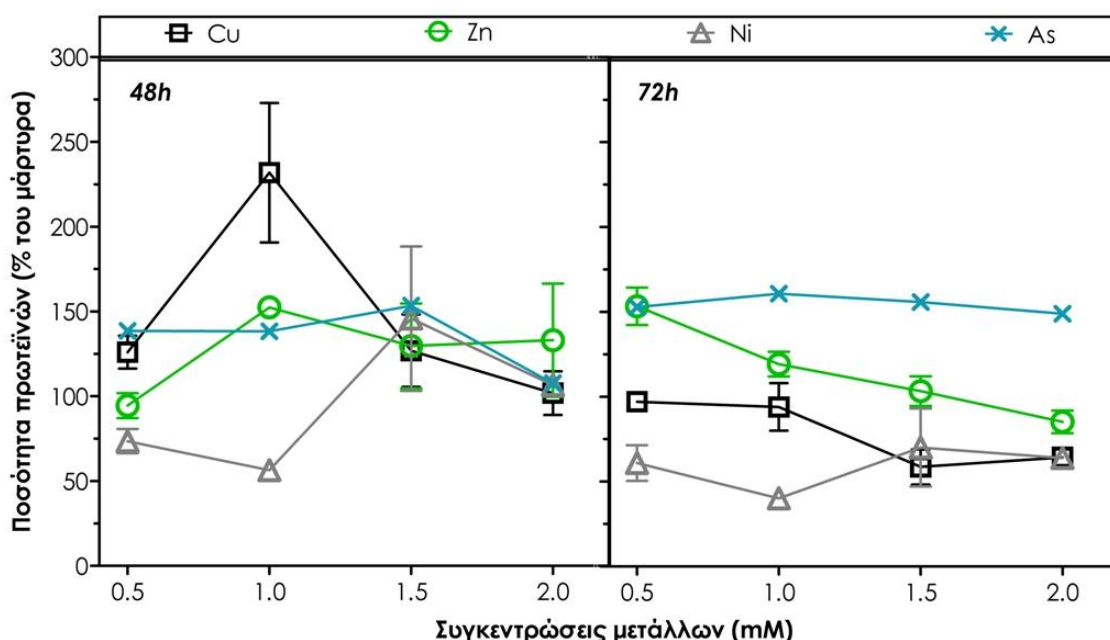
Παρόμοια, οι Niestroy et al., 2014 απέδωσαν τα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης που παρατηρήθηκαν στο μικροφύκος *C. marina* var. *marina*, κατόπιν 24ωρης έκθεσης αυτού σε χαμηλές συγκεντρώσεις Cu (0,1, 0,3 και 1μM), στην πιθανή αύξηση των πρωτεϊνών και των ενζύμων (όπως φυτοχελαινές υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάση, παράγοντες μεταγραφής κ.ά.). Οι Carfagna et al., 2013 παρατήρησαν μείωση των συνολικών πρωτεϊνών σε σχέση με το μάρτυρα, στο μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* όταν αυτό εκτέθηκε για 24 ώρες σε 250 μM Pb και Cd αντίστοιχα. Έτσι λοιπόν υπέθεσαν ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν μια εφεδρική πηγή N και S για να εξασφαλίσει το μικροφύκος την ανάπτυξη των κυττάρων του.

Στην **Εικόνα 50** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων των μετάλλων καθώς και του As στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών των καλλιεργειών, που αφορά μόνο τους 2 τελευταίους χρόνους της τοξικής φάσης (48 και 72h). Τα δεδομένα της **Εικόνας 50** δείχνουν ότι στις 48h, μια αύξηση του περιεχομένου των καλλιεργειών σε πρωτεΐνες παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με μικρές συγκεντρώσεις προστιθέμενων βαρέων μετάλλων. Αυτό παρατηρήθηκε για το 1,0 mM Cu και Zn καθώς και για το 1,5 mM As και Ni αντίστοιχα. Η αύξηση των βαρέων μετάλλων στις καλλιέργειες πέρα από αυτές τις συγκεντρώσεις επέφερε μείωση των συνολικών πρωτεϊνών του οργανισμού η οποία όμως δεν έπεφτε κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα.

Στις 72 ώρες, η συνολική περιεκτικότητα των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* σε πρωτεΐνες μειώθηκε βαθμιαία κατά ένα τρόπο εξαρτώμενο από την συγκέντρωση του Zn και

του Cu στο μέσο. Αυτό δεν παρατηρήθηκε για το Ni όπου η περιεκτικότητα των καλλιεργειών σε πρωτεΐνες δεν επηρεάστηκε από τις διάφορες προστιθέμενες συγκεντρώσεις του. Αντιθέτως έμεινε πρακτικά σταθερή για όλες σχεδόν τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις, με εξαίρεση το 1,0 mM Ni όπου παρουσιάστηκε μια μικρή μείωση στη περιεκτικότητα των πρωτεϊνών των καλλιεργειών. Επίσης, καμία σημαντική αλλαγή στο συνολικό περιεχόμενο των πρωτεϊνών δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii* στις 72 ώρες υπό τη παρουσία των διάφορων συγκεντρώσεων του As.

Επομένως η σειρά τοξικότητας στο περιεχόμενο των πρωτεϊνών των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* ανάμεσα στα εξεταζόμενα βαρέα μέταλλα είναι Ni > Zn > Cu > As για τις 48 ώρες και Ni > Cu > Zn > As για τις 72 ώρες (κατά φθίνουσα σειρά τοξικότητας).



Εικόνα 50. Εκτίμηση της ποσότητας των πρωτεϊνών των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης μετάλλων (Cu, Zn και Ni) και του ημιμετάλλου As για τους χρόνους 48 και 72h της τοξικής φάσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες.

3.7. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΑΠΟ ΤΟ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Στις **Εικόνες 51 – 54** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την ικανότητα των κυττάρων του *Chlamydomonas reinhardtii* να απομακρύνουν Cu από το υδατικό διάλυμα. Στην **Εικόνα 51** παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του Cu σε δείγματα που ελήφθησαν ανά 24 ώρες, κατά τη διάρκεια της τοξικής φάσης (72 ώρες) και αναφέρονται α)

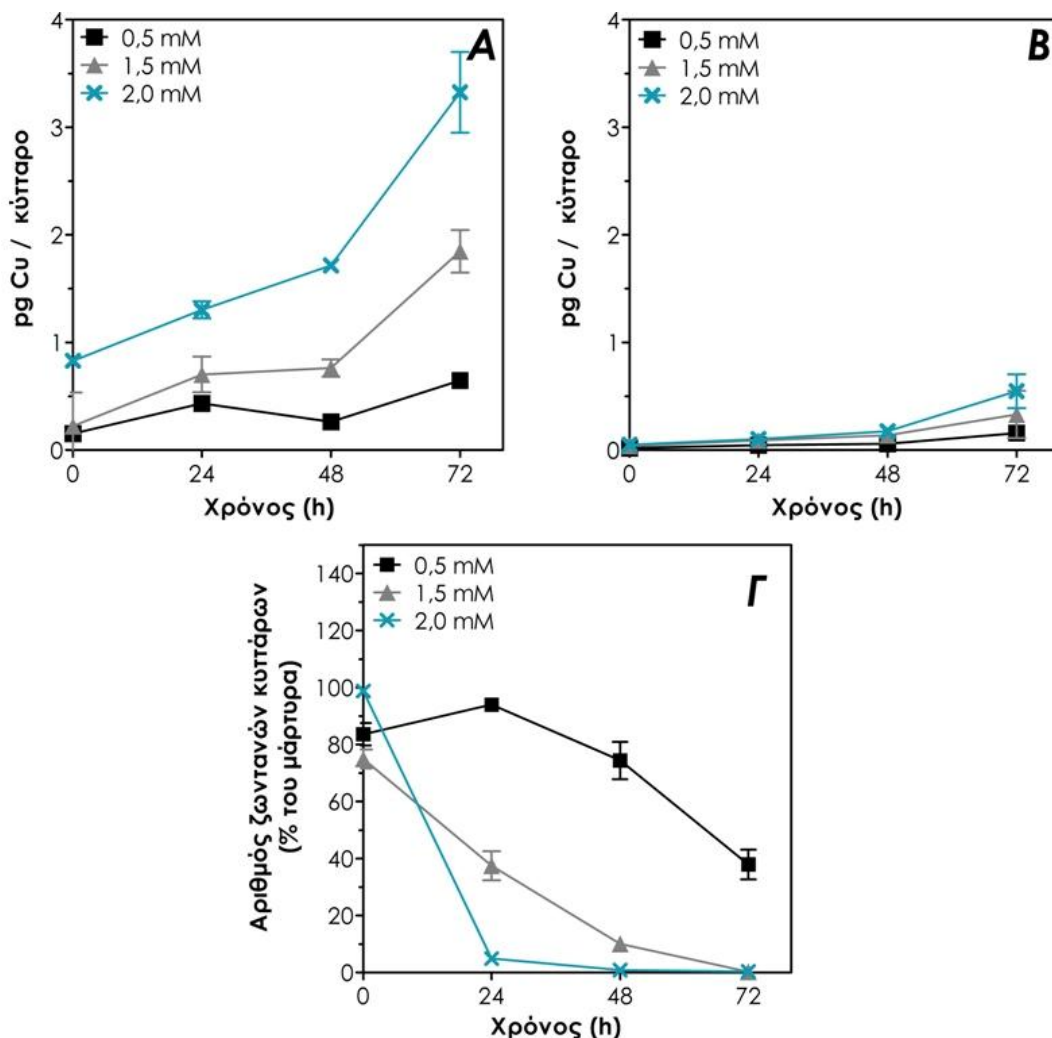
στη ποσότητα του Cu που δεσμεύτηκε επιφανειακά στα κύτταρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης (**Εικόνα 51A**), β) στη ποσότητα του Cu που δεσμεύτηκε στο εσωτερικό των κυττάρων με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης (**Εικόνα 51B**) και γ) στη βιωσιμότητα των καλλιέργειών (ποσοστό ζωντανών κυττάρων επί του μάρτυρα) καθώς από αυτή εξαρτάται ο τρόπος δέσμευσης του Cu στα κύτταρα (**Εικόνα 51Γ**).

Όσον αφορά και τις 2 διαδικασίες δέσμευσης των βαρέων μετάλλων από τα μικροφύκη (βιορρόφηση και βιοσυσσώρευση), λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας ζωντανά και μη προ – επεξεργασμένα κύτταρα. Μεταξύ των 2 διαδικασιών, πολύ λιγότερες μελέτες αφορούν τη διαδικασία βιοσυσσώρευσης των βαρέων μετάλλων. Υπενθυμίζεται ότι η βιορρόφηση είναι μια μεταβολικά ανεξάρτητη διαδικασία ενώ η βιοσυσσώρευση απαιτεί μεταβολικά ενεργά κύτταρα για να συμβεί. Διευκρινίζεται ότι οι τα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii* συντηρήθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε στερεό και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα αντίστοιχα, εκ των οποίων και τα 2 περιείχαν Cu σε ιχνοποσότητες (**Πίνακας 7**). Επομένως για να γίνει δυνατή η καθαρή δυνατότητα δέσμευσης Cu από το υδατικό διάλυμα στις επιλεγμένες προστιθέμενες συγκεντρώσεις του μετάλλου, στην **Εικόνα 51A και B** τα αποτελέσματα παρουσιάζονται κατόπιν αφαίρεσης των αντίστοιχων τιμών του μάρτυρα.

Τα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii* έδειξαν μια ικανότητα προσρόφησης Cu από τη πρώτη στιγμή που ήρθαν σε επαφή με τις υψηλές συγκεντρώσεις αυτού του μετάλλου. Η ποσότητα του δεσμευμένου Cu στην επιφάνεια των κυττάρων, στην αρχή της τοξικής φάσης (0h) ήταν 0,15, 0,22 και 0,83 $\mu\text{g Cu} / \text{κύτταρο}$ για τις καλλιέργειες με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Cu αντίστοιχα (**Εικόνα 51A**). Η ποσότητα αυτή αυξανόταν με το πέρασμα του χρόνου για όλα τα κύτταρα των καλλιέργειών με όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις του Cu. Στο τέλος της τοξικής φάσης, η ποσότητα του προσροφούμενου Cu έφτασε τα 0,65, 1,85 και 3,33 $\mu\text{g Cu} / \text{κύτταρο}$ για τις καλλιέργειες με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Cu αντίστοιχα.

Στο διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών, οι καλλιέργειες με 0,5 και 1,5 mM Cu εμφάνισαν μια μικρή μείωση ή σταθερότητα της ποσότητας του προσροφημένου Cu στα κύτταρα των καλλιέργειών. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μερική αποδέσμευση μικρών ποσοτήτων Cu από την κυτταρική επιφάνεια των ζωντανών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Kadukona and Vircikona, 2005). Η παραγωγή εκκρίσεων από το μικροφύκος και η απελευθέρωση τους στο υγρό μέσον θα μπορούσε να δικαιολογήσει το φαινόμενο αυτό. Ενώσεις που εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας και είναι υπεύθυνες για τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του Cu έχουν αναφερθεί για μια σειρά φυκών, συμπεριλαμβανομένων των *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*, και *Thalassiosira weissflogii* (Franklin et al., 2002, Kola et al., 2004). Είναι πιθανόν, αυτές οι εκκρινόμενες ουσίες να έχουν δεσμεύσει το Cu από το κυτταρικό τοίχωμα πριν εκκριθούν στο περιβάλλον μέσον. Οι Gledhill et al. (Gaur and Rai, 2001) δεν ήταν σε θέση να εξακριβώσουν αν οι εξωκυτταριοί υποκαταστάτες εκκρίθηκαν ήδη συμπλοκοποιημένοι με το Cu ή αν

απελευθερώθηκαν για να τον δεσμεύσουν έπειτα στο εξωτερικό περιβάλλον. Παρ' όλα αυτά, έτειναν στη πρώτη εκδοχή για τη δυνατότητα αποτοξίνωσης του *Fucus vesiculosus* από τον Cu^{2+} .



Εικόνα 51. Εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu από το υδατικό διάλυμα για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. Α: Ο προσροφημένος Cu (pg Cu / κύτταρο) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε επιφανειακά στα κύτταρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης. Β: Ο συσσωρευμένος Cu (pg Cu / κύτταρο) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε εντός των κυττάρων με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης. Γ: Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων των καλλιεργειών του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii* κατόπιν προσθήκης Cu για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση) όπως παρουσιάστηκε και παραπάνω στην **Εικόνα 38**. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (**Πίνακας 7**). Έτσι τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αφού έχουν αφαιρεθεί πρωτίστως οι αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Μετατροπές μονάδων για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu: 0,5 mM = 31,77 ppm, 1,5 mM = 95,32 ppm, 2,0 mM = 127,09 ppm.

Στην **Εικόνα 51A** παρατηρήθηκε μια έντονη αύξηση του προσροφημένου Cu στην επιφάνεια των κυττάρων μεταξύ 48 και 72 ωρών. Όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική συγκέντρωση του Cu στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερη ήταν η ποσότητα του προσροφούμενου Cu μέσω της

βιορρόφησης. Το αντίθετο παρατηρήθηκε για τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων των καλλιεργειών (**Εικόνα 51Γ**), ο οποίος στο διάστημα αυτό μειωνόταν με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του Cu στο διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι με την αύξηση του Cu στο αρχικό διάλυμα, ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων των καλλιεργειών μειώνεται με αποτέλεσμα η αύξηση των νεκρών κυττάρων να συνοδεύεται με περισσότερα κυτταρικά θραύσματα. Η θραύση του κυτταρικού τοιχώματος προσφέρει μεγαλύτερη επιφάνεια άρα και θέσεις πρόσδεσης του Cu (Button and Hostetter, 1977).

Η μεταλλική προσρόφηση στα κύτταρα των φυκών είναι γενικά μια ταχεία διαδικασία με τη κατάσταση ισορροπίας του Cu μεταξύ της επιφάνειας των κυττάρων και του διαλύματος να επιτυγχάνεται στα πρώτα λεπτά της έκθεσης του οργανισμού στα μέταλλα (Arica et al., 2005, Chojnacka, 2010, Franklin et al., 2002, Kola et al., 2004, Shanab et al., 2012). Για παράδειγμα, οι Flouty and Estephane, 2012 οι οποίοι εξέτασαν τη βιορρόφηση και βιοσυσσώρευση των μετάλλων Cu και Pb στα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii*, διαπίστωσαν ότι όσον αφορά τη βιορρόφηση, η ισορροπία επιτεύχθηκε στα 100 min της τοξικής φάσης. Πέρα από το διάστημα αυτό, η ποσότητα του προσροφημένου Cu και Pb δεν άλλαξε σημαντικά με το χρόνο.

Σε αντίθεση με το παραπάνω, στο παρόν πείραμα, έως το τέλος της τοξικής φάσης (72 ώρες) ο προσροφημένος Cu δεν έφτασε μια σταθερή τιμή. Αντίθετα, αυξανόταν καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης των καλλιεργειών στις διάφορες συγκεντρώσεις του Cu. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με την αύξηση των θέσεων δέσμευσης του Cu στην επιφάνεια των κυττάρων. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε για το προσροφημένο Cd στο *Chlamydomonas reinhardtii*, ο οποίος αυξανόταν με το πέρασμα του χρόνου έκθεσης των κυττάρων στο μέταλλο, για όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις του (Kola et al., 2004).

Το κυτταρικό τοίχωμα του *Chlamydomonas reinhardtii* αποτελεί ένα υψηλά δομημένο πλέγμα 7 στρωμάτων, εκ των οποίων τα περισσότερα στρώματα είναι πλούσια σε γλυκοπρωτεΐνες (Button and Hostetter, 1977, Kola et al., 2004). Τα κύτταρα του μικροφύκου μπορούν να συνθέσουν μια εξωτερική στιβάδα κυτταρικών τοιχωμάτων μέσα σε μια περίοδο κάποιων ωρών μετά την προσθήκη εξωγενούς αυτολυσίνης, ενός παράγοντα λύσης του κυτταρικού τοιχώματος (Goodenough and Heuser, 1985). Επίσης έχει παρατηρηθεί για τα φύκη, η ενισχυμένη σύνθεση νέων συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, έναντι στην αύξηση της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων, ως ένας μηχανισμός άμυνας με απώτερο στόχο τη μείωση της πρόσληψης αυτών στα κύτταρα (Barceló and Poschenrieder, 2004). Συνδυάζοντας τα παραπάνω, η πιθανή ταχεία ανανέωση του κυτταρικού τοιχώματος του *Chlamydomonas reinhardtii* θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αύξηση του προσροφημένου Cu πέρα από τα χρονικά δεδομένα που έχουν αναφερθεί από άλλους μελετητές.

Όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική ποσότητα του προστιθέμενου Cu στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερη ήταν η δέσμευση του από τα κύτταρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης. Στο

τέλος της τοξικής φάσης (72h), η ποσότητα προσροφούμενου Cu από τις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu ήταν σχεδόν 5,1 φορές μεγαλύτερη από αυτή των καλλιεργειών με 0,5 mM Cu και 1,8 φορές μεγαλύτερη από αυτή των καλλιεργειών με 1,5 mM Cu. Είναι γνωστό ότι η προσρόφηση ενός μετάλλου αυξάνεται με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης αυτού στο διάλυμα (Abbas et al., 2014). Αυτό έχει αποδειχθεί πειραματικά από πολλούς μελετητές (Arica et al., 2005, Tüzün et al., 2005).

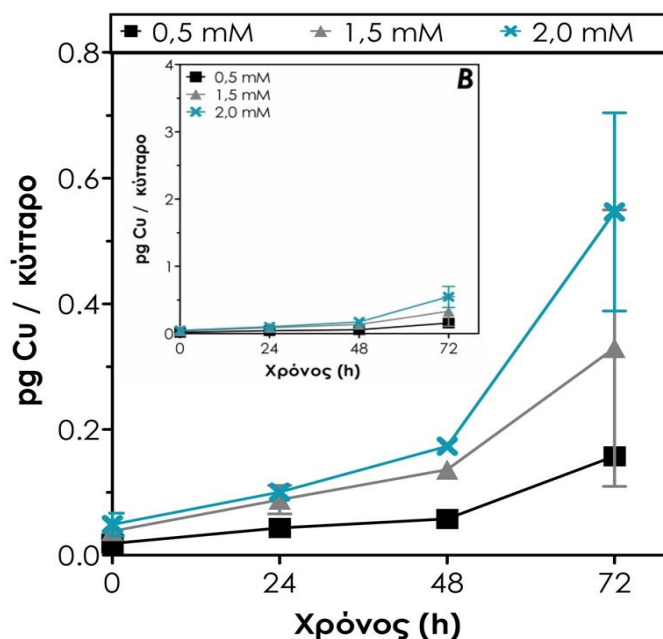
Η αυξημένη βιορρόφηση των κυττάρων των καλλιεργειών με 1,5 και 2,0 mM Cu επιβεβαιώνει τη μικροσκοπική παρατήρηση που έγινε προηγουμένως για το τέλος της τοξικής φάσης, όπου τα κύτταρα που είχαν μεταχειριστεί με Cu είχαν μικρότερο μέγεθος σε σχέση με το μάρτυρα. Αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές στις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu, γεγονός που μπορεί να δικαιολογεί την μεγαλύτερη προσροφημένη ποσότητα του Cu των κυττάρων αυτών των καλλιεργειών. Τα βαρέα μέταλλα επηρεάζουν την εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων των φυκών, γεγονός το οποίο δείχνει ότι αυτά προσδένονται στις λειτουργικές ομάδες του κυτταρικού τοιχώματος (Wan Maznah et al., 2012).

Από την **Εικόνα 51B** φαίνεται καθαρά ότι τα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii* συσσωρεύσαν πολύ μικρότερες ποσότητες Cu από αυτές που δεσμεύτηκαν στην επιφάνεια του κυττάρου με τη διαδικασία της βιορρόφησης. Η συσσωρευμένη ποσότητα του μετάλλου ήταν σχεδόν μηδενική για όλες τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu και καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης των κυττάρων του μικροφύκου στο μέταλλο. Έχει δείχτει ότι όταν τα κύτταρα του *Chlamydomonas reinhardtii* εκτεθούν σε εξωγενές Cu, αυτά προσλαμβάνουν το μέταλλο, του οποίου το μεγαλύτερο μέρος παραμένει δεσμευμένο στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων του μικροφύκου (Boswell et al., 2002, Button and Hostetter, 1977).

Για μεγαλύτερη ακρίβεια, η **Εικόνα 51B** που παρουσιάστηκε παραπάνω, εμφανίζεται και στην **Εικόνα 52**, με μόνη διαφορά την αλλαγή της κλίμακας της βιοσυσσωρευμένης ποσότητας του Cu (pg Cu / κύτταρο – άξονας y). Από την **Εικόνα 52** παρατηρείται μια αύξηση της συσσωρευμένης ποσότητας Cu εντός των κυττάρων, καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης των καλλιεργειών σε Cu. Τα κύτταρα των καλλιεργειών με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Cu συσσωρεύσαν 0,02, 0,04 και 0,05 pg Cu / κύτταρο αντίστοιχα, από τη πρώτη στιγμή της έκθεσης τους στο μέταλλο (0h).

Επίσης ο συσσωρευμένος Cu εντός των κυττάρων αυξήθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του Cu στο μέσο καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες με 2,0 mM Cu δέσμευσαν στην αρχή της τοξικής φάσης (0h), 2,5 φορές περίπου μεγαλύτερη ποσότητα από τις καλλιέργειες με 0,5 mM Cu και 1,3 φορές περίπου μεγαλύτερη ποσότητα από τις καλλιέργειες με 1,5 mM Cu. Αυτό δείχνει ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του Cu στο διάλυμα δεν ήταν ανάλογη της συσσωρευμένης ποσότητας του Cu στα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η πρόσληψη ενός στοιχείου από το περιβάλλον μέσο είναι σπανίως ακριβώς ανάλογη με τη ποσότητα αυτού που υπάρχει στο υγρό μέσον (Afkar et al., 2010).

Μια άλλη εκδοχή που θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αύξηση της συσσωρευμένης ποσότητας Cu σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση του στο διάλυμα είναι η λειτουργία του μηχανισμού εκροής ο οποίος αποτελεί ένα μηχανισμό εξαγωγής των τοξικών μετάλλων από το κυτταρόπλασμα προς το εξωτερικό χώρο ή σε υποκυτταρικά διαμερίσματα του κυττάρου. Ο μηχανισμός ενεργούς εκροής (καθώς απαιτεί δαπάνη ενέργειας) έχει προταθεί για την αντοχή του φύκους *Cyanidium caldarium* στο Al. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πως λειτουργεί στα φύκη και τα κυανοβακτήρια (Gaur and Rai, 2001, Worms et al., 2006).



Εικόνα 52. Εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu (pg Cu / κύτταρο) με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης από το υδατικό διάλυμα για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. Η εικόνα εντός του γραφήματος αποτελεί μικρογραφία της **Εικόνας 51B**. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (**Πίνακας 7**). Έτσι τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αφού έχουν αφαιρεθεί πρωτίστως οι αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Μετατροπές μονάδων για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu: 0,5 mM = 31,77 ppm, 1,5 mM = 95,32 ppm, 2,0 mM = 127,09 ppm.

Οι Jamers et al., 2013 ανέφεραν ότι η αυξημένη συσσώρευση του Cu στο *Chlamydomonas reinhardtii* σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έκθεσης του στο μέταλλο οφείλεται στη μείωση της αντλίας εκροής (efflux pumping) του Cu. Και σε αυτή τη περίπτωση όμως, οι συγκεντρώσεις του Cu που εξετάστηκαν (0 – 125 μ M), ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε (10.000 κύτταρα / ml καλλιέργειας) καθώς και οι συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού διέφεραν αρκετά από αυτές του παρόντος πειράματος. Έτσι λοιπόν, όπως εξηγήθηκε και στην **Υποενότητα 3.5**, δεν μπορεί να γίνει ποσοτική σύγκριση των δεδομένων.

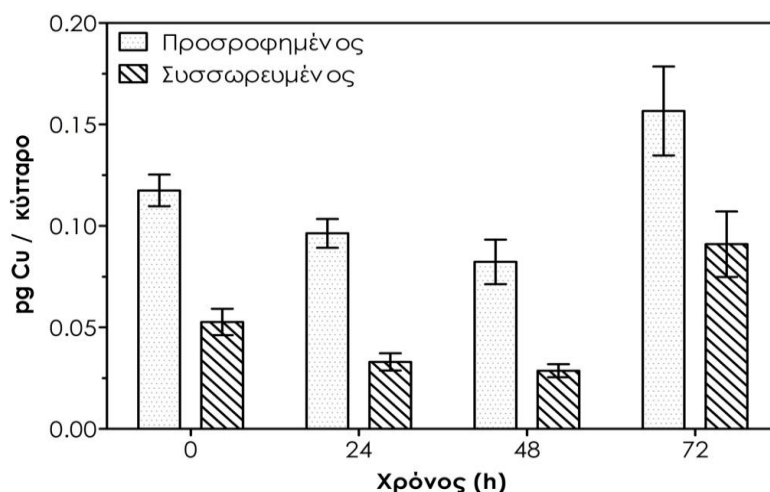
Η ποσότητα του Cu εντός των κυττάρων αυξήθηκε έως το τέλος της τοξικής φάσης (72h) κατά 8 περίπου φορές για τις καλλιέργειες με 0,5 και 1,0 mM Cu (0,16 και 0,33 pg Cu / κύτταρο

αντίστοιχα) ενώ κατά 11 περίπου φορές για τις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu (0,55 µg Cu / κύτταρο). Στο τέλος της τοξικής φάσης, ο προσροφημένος Cu για τις καλλιέργειες με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Cu ήταν 4,5, 5 και 6 περίπου φορές μεγαλύτερος από το βιοσυσσωρευμένο Cu των αντίστοιχων καλλιεργειών. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Flouty and Estephan, 2012 οι οποίοι μελέτησαν τη δέσμευση του Pb και του Cu από το *Chlamydomonas reinhardtii* με τη διαδικασία της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης. Η προσροφημένη ποσότητα Pb και Cu ήταν 5 και 2 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συσσωρευμένη ποσότητα του αντίστοιχου μετάλλου. Τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται με το μεταβολικό μηχανισμό της βιοσυσσώρευσης, η οποία περιορίζει την 'εσωτερίκευση' του μετάλλου μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Παρόλα αυτά, στο τέλος της τοξικής φάσης (72h), η ποσότητα του συσσωρευμένου Cu που βρέθηκε πειραματικά στη παρούσα μελέτη (τουλάχιστον για τις καλλιέργειες με 1,5 και 2,0 mM Cu), δεν αντιπροσωπεύει τη πραγματική ποσότητα του μετάλλου που δεσμεύτηκε εντός των κυττάρων με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης όπως θα εξηγηθεί στην επόμενη παράγραφο.

Η μεγαλύτερη αύξηση του βιοσυσσωρευμένου Cu παρατηρήθηκε μεταξύ 48 και 72 ωρών για όλες τις μεταχειρισμένες με Cu καλλιέργειες, το οποίο είναι εμφανές από τη κλίση των αντίστοιχων καμπύλων (**Εικόνα 52**). Στο διάστημα αυτό, οι καλλιέργειες μείωσαν τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων τους με αποτέλεσμα οι καλλιέργειες με 1,5 mM Cu να ελαττώσουν τον αριθμό ζωντανών κυττάρων από το 10% στο 0% επί του μάρτυρα, ενώ οι καλλιέργειες με 2,0 mM Cu να παρουσιάζουν σταθερό το αντίστοιχο ποσοστό στο 0% (**Εικόνες 51Γ και 52**). Η αύξηση του Cu εντός των κυττάρων που παρατηρήθηκε για τις μεταχειρισμένες με 1,5 και 2,0 mM Cu καλλιέργειες δεν μπορεί να αποδοθεί στη διαδικασία βιοσυσσώρευσης του Cu από τα κύτταρα καθώς αυτά ήταν μεταβολικά ανενεργά. Στη περίπτωση αυτή, πιθανόν να υπήρξε σφάλμα στη μέτρηση της βιωσιμότητας των καλλιεργειών (αριθμός ζωντανών / νεκρών κυττάρων). Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των νεκρών κυττάρων πιθανόν να εισήχθη και σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα τα οποία είχαν τραυματισμένες μεμβράνες. Έτσι ίσως να υπήρχαν ζωντανά κύτταρα που να συσσωρεύσαν μικρή αλλά σημαντική ποσότητα Cu.

Στην **Εικόνα 53** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δέσμευσης του Cu από τα κύτταρα του μάρτυρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης. Το υγρό θρεπτικό μέσον που καλλιεργήθηκε ο οργανισμός (Tap Medium) περιείχε ποσότητα Cu 0,40 mg · L⁻¹ (**Πίνακας 7**). Από τις **Εικόνες 51Α, Β και 53** γίνεται αντιληπτό ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις Cu είχαν προσροφήσει ποσότητα πολύ μεγαλύτερη από ότι τα κύτταρα του μάρτυρα. Επίσης η συσσωρευμένη ποσότητα του Cu στα κύτταρα του μάρτυρα ήταν πολύ μικρότερη από αυτή των κυττάρων με τις διάφορες προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu. Το ίδιο παρατήρησαν οι Boswell et al., 2002, όταν εξέθεσαν το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* σε διάφορες συγκεντρώσεις (0 – 150 µM) CuSO₄ για 18 μέρες. Στο

τέλος του πειράματος τους, η συσσωρευμένη ποσότητα Cu στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 100 και 150 μM CuSO_4 ήταν 6 φορές μεγαλύτερη από αυτή του μάρτυρα, ο οποίος καλλιεργήθηκε στο ίδιο υγρό μέσον με αυτό του παρόντος πειράματος (Tap medium). Το γεγονός αυτό δείχνει την υψηλή ανοχή του μικροφύκου σε εξωγενές Cu. Είναι γεγονός ότι το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* θεωρείται ένα ανθεκτικό μικροφύκος στο Cu (Button and Hostetter, 1977).

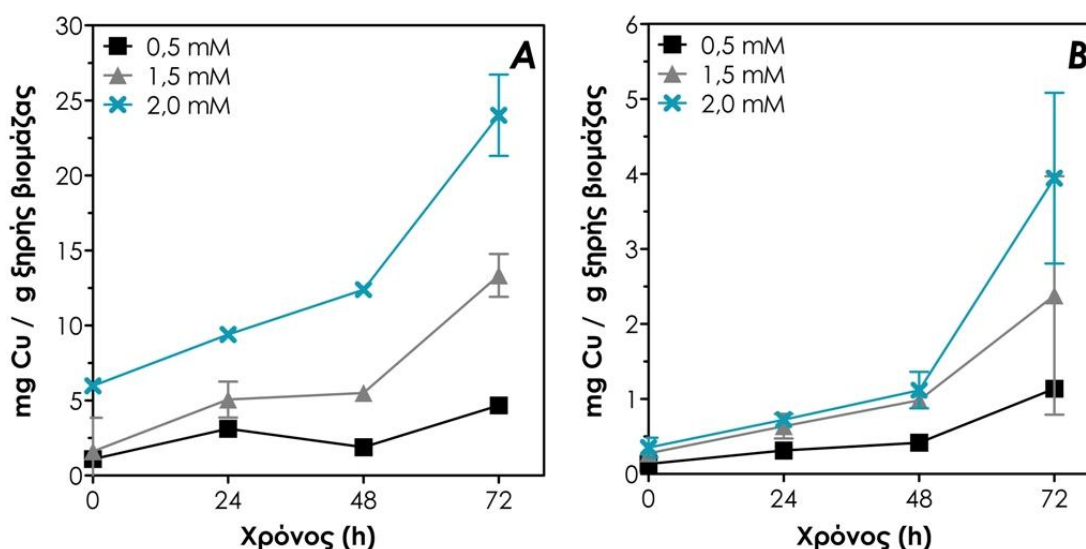


Εικόνα 53. Εκτίμηση της δέσμευσης του Cu από το υδατικό διάλυμα που περιείχε 0,40 ppm. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. Ο προσοροφημένος και συσσωρευμένος Cu (pg Cu / κύτταρο) αντιπροσωπεύουν τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε από τα κύτταρα του μάρτυρα μέσω της διαδικασίας της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης αντίστοιχα. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (0,40 ppm).

Στην **Εικόνα 54** τα αποτελέσματα που αφορούν τη ποσότητα του δεσμευμένου Cu στα κύτταρα, με τη διαδικασία της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης αντίστοιχα, εκφράστηκαν ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας προκειμένου να γίνει μια προσπάθεια σύγκρισης αυτών με αντίστοιχα αποτελέσματα που μέχρι τώρα έχουν δημοσιευτεί. Όμως παρά τα αυξανόμενο πλήθος των πειραματικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα, όσον αφορά την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από διάφορα είδη βιομάζας, είναι αρκετά δύσκολο να γίνει ποσοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων καθώς διαφορετική μεθοδολογία και διαφορετικά κριτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί ανά περίπτωση. Ένας μεγάλος αριθμός μεταβλητών εμπλέκονται στην επιλογή βιομάζας και στις μεθόδους επεξεργασίας (Arica et al., 2005, Volesky and Holan, 1995, Wilde and Benemann, 1993).

Από την **Εικόνα 54A**, γίνεται αντιληπτό ότι η μέγιστη προσοροφούμενη ποσότητα (mg Cu / g ξηρής μάζας) παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu, με τη ποσότητα του προσοροφημένου Cu να φτάνει τα 24 mg/g ξηρής μάζας στο τέλος της τοξικής φάσης. Οι (Flouty and Estephane, 2012 κατέληξαν σε πολύ χαμηλότερη ποσότητα όταν εξέθεσαν τον ίδιο οργανισμό στο ίδιο μέταλλο (0,109 mg Cu / g ξηρής μάζας). Παρόλα αυτά, η μεθοδολογία

που ακολούθησαν διέφερε αρκετά με αυτή που ακολουθήθηκε στο παρόν πείραμα. Στο πείραμα τους χρησιμοποίησαν πολύ μικρότερη ποσότητα βιομάζας (0,2 g ξηρής μάζας /L) από αυτή που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη (0,9 g ξηρής μάζας/L) και πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση μετάλλου στο αρχικό τους διάλυμα (10^{-7} M Cu) αντίστοιχα. Επίσης τα κύτταρα του οργανισμού προτού χρησιμοποιηθούν είχαν υποστεί λυοφιλοποίηση. Η έκθεση των κυττάρων στο Cu διήρκησε πολύ λιγότερο διάστημα από αυτόν που επιλέχθηκε για το παρόν πείραμα. Η ποσότητα προσροφούμενου Cu που ανέφεραν αφορά τη ποσότητα αυτού που παρατηρήθηκε στα 65 λεπτά έκθεσης του χλωροφύκου στο μέταλλο. Τέλος για την καλλιέργεια του οργανισμού χρησιμοποίησαν διαφορετικές συνθήκες (όπως T, φωτισμός κ.ά.). Αυτό μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην βιορροφητική ικανότητα του οργανισμού.



Εικόνα 54. Εκτίμηση της απομάκρυνσης του Cu από το υδατικό διάλυμα για διάστημα 72 ωρών (τοξική φάση). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή των μετρήσεων (\pm SD) από 3 επαναλήψεις που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες καλλιέργειες. A: Ο προσροφημένος Cu (mg Cu / g ξηρής βιομάζας) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε επιφανειακά στα κύτταρα με τη διαδικασία της βιορρόφησης. B: Ο συσσωρευμένος Cu (mg Cu / g ξηρής βιομάζας) αντιπροσωπεύει τη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε εντός των κυττάρων με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης. Τα κύτταρα του οργανισμού καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο που περιείχε Cu σε ίχνη (Πίνακας 7). Έτσι τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αφού έχουν αφαιρεθεί πρωτίστως οι αντίστοιχες τιμές του μάρτυρα. Μετατροπές μονάδων για τις προστιθέμενες συγκεντρώσεις Cu: 0,5 mM = 31,77 ppm, 1,5 mM = 95,32 ppm, 2,0 mM = 127,09 ppm.

Όσον αφορά τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης, στη παρούσα εργασία η μέγιστη τιμή βιοσυσσωρευμένης ποσότητας Cu παρατηρήθηκε για τις καλλιέργειες με 2,0 mM Cu η οποία και ήταν 3,94 mg Cu / g ξηρής μάζας. Παρόλα αυτά, για τους λόγους που εξηγήθηκαν παραπάνω, η τιμή αυτή δεν είναι αξιόπιστη. Για τα 65 λεπτά έκθεσης του *Chlamydomonas reinhardtii* σε πολύ μικρότερες ποσότητες Cu (10^{-7} M Cu) από τις παρούσες, οι Flouty & Estephane κατέληξαν στη τιμή 0,056 mg/g της αντίστοιχης ποσότητας. Η τιμή αυτή είναι κατά πολύ μικρότερη από τις αντίστοιχες που βρέθηκαν στο παρόν πείραμα, κατά την έναρξης της

τοξικής φάσης (0,13, 0,28 και 0,35 mg Cu / g ξηρής μάζας για τις καλλιέργειες με 0,5, 1,5 και 2,0 mM Cu αντίστοιχα).

Από τα παραπάνω γίνεται σαφής η αδυναμία ποσοτικής σύγκρισης των αποτελεσμάτων βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης καθώς και ποιοτικής σύγκρισης μεταξύ των εξεταζόμενων τύπων βιομάζας αφού κάθε εξεταζόμενος οργανισμός έχει διαφορετικές απαιτήσεις και μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα πλήθος διαφορετικών συνθηκών. Στο **Πίνακα 1** έχουν συγκεντρωθεί τα πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα δέσμευσης βαρέων μετάλλων από το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (1999 – σήμερα). Είναι φανερό ότι η πειραματική ικανότητα δέσμευσης των μετάλλων (mg μετάλλου/g ξηρής μάζας) που αναφέρεται σε κάθε επιμέρους πείραμα δεν μπορεί να αποτελεί τον απόλυτο δείκτη σύγκρισης και αξιολόγησης της ικανότητας ενός οργανισμού να απομακρύνει βαρέα μέταλλα από ένα υδατικό διάλυμα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω για το παρόν πείραμα, με καμία από τις 2 διαδικασίες δέσμευσης ο Cu δεν έφτασε μια σταθερή τιμή. Σε αντίθεση αυτός αυξήθηκε καθώς αυξανόταν ο χρόνος της πειραματικής διαδικασίας. Και οι 2 διαδικασίες δέσμευσης των βαρέων μετάλλων (βιορρόφηση και βιοσυσσώρευση), τείνουν να είναι πιο σημαντικές, καθώς ο χρόνος επαφής μεταξύ των βαρέων μετάλλων και των αναπτυσσόμενων κύτταρων αυξάνει (Flouty and Estephane, 2012). Είναι πιθανό ότι με τη παράταση της έκθεσης του οργανισμού σε Cu για μεγαλύτερο διάστημα (πέρα των 72 ωρών) τα αποτελέσματα που θα λαμβάνονταν να ήταν περισσότερο ικανοποιητικά όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης του Cu από το *Chlamydomonas reinhardtii*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη παρείχε στοιχεία σχετικά με τη τοξική επίδραση διαφόρων βαρέων μετάλλων (Cu, Zn, Ni και As) στη μορφολογία και τη φυσιολογία του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Chlamydomonas reinhardtii* καθώς και με τη δυνατότητα του οργανισμού να απομακρύνει Cu από τα υδατικά διαλύματα.

Τα βαρέα μέταλλα που εξετάστηκαν παρουσίασαν διαφορετικού βαθμού τοξικότητα, η οποία ήταν συνδεδεμένη με την εξεταζόμενη παράμετρο, τη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων στο διάλυμα καθώς και με το χρόνο έκθεσης του μικροφύκου σε αυτά. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσε να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι το Ni και ο Cu αποδείχτηκαν τα πιο τοξικά βαρέα μέταλλα για τον οργανισμό σε αντίθεση με τα Zn και As τα οποία είχαν τη μικρότερη δυσμενή επίδραση. Αν συνυπολογιστούν οι επιδράσεις των βαρέων μετάλλων για κάθε επιμέρους παράμετρο που εξετάστηκε, θα μπορούσε να διεξαχθεί η γενική σειρά τοξικότητας για τον οργανισμό $Ni > Cu > Zn > As$ (κατά φθίνουσα σειρά τοξικότητας). Παρόλα αυτά, διαφορετικά φύκη έχουν διαφορετική ανταπόκριση στη παρουσία βαρέων μετάλλων. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν κάποιες πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις επιπτώσεις των βαρέων μετάλλων στα μικροφύκη.

Όσον αφορά τη δυνατότητα του εξεταζόμενου χλωροφύκου να δεσμεύει Cu από το υδατικό διάλυμα, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι η βιομάζα του *Chlamydomonas reinhardtii* είναι κατάλληλη για περαιτέρω διερεύνηση και ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού συστήματος αφαίρεσης μετάλλου από το υδατικό διάλυμα. Οι μέγιστες ποσότητες Cu που δεσμεύτηκαν από τα κύτταρα του μικροφύκου παρατηρήθηκαν κατά το τέλος της τοξικής φάσης (72 ώρες) και βρέθηκαν να είναι 24 και 3,94 mg Cu/g ξηρής μάζας για τη διαδικασία της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, η ποσότητα Cu που δεσμεύτηκε εντός των κυττάρων του οργανισμού δεν αντιπροσωπεύει την πραγματική ποσότητα του μετάλλου που δεσμεύτηκε στα κύτταρα με τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης καθώς αυτή αυξήθηκε έντονα ενώ τα κύτταρα ήταν μεταβολικά ανενεργά. Είναι πιθανό, η αύξηση αυτή που παρατηρήθηκε στη βιοσυσσωρευμένη ποσότητα του Cu να οφειλόταν στη ποσότητα αυτού που δεσμεύτηκε μέσω της βιορρόφησης. Για το λόγο αυτό, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στο παρόν πείραμα θα πρέπει να βελτιωθεί προκειμένου να είναι δυνατή η πιο ακριβής διάκριση μεταξύ προσροφημένης και βιοσυσσωρευμένης ποσότητας μετάλλων.

Επίσης είναι αναγκαία η ανάπτυξη ενός πιο βελτιωμένου τρόπου αξιολόγησης της δεσμευτικής ικανότητας του κάθε τύπου βιομάζας που θα χρησιμοποιείται προκειμένου να είναι

δυνατή η σύγκριση των μικροφυκών που χρησιμοποιούνται για την φυκοαποκατάσταση των υδάτων από τα βαρέα μέταλλα. Επιπλέον, η έρευνα της βιορρόφησης και βιοσυσσώρευσης είναι περιορισμένη σε εργαστηριακές συνθήκες. Έτσι καθίσταται αναγκαία η επέκταση αυτού του ερευνητικού πεδίου και η αξιολόγηση των δεσμευτικών ικανοτήτων των μικροφυκών ή / και των μικροοργανισμών γενικότερα σε πραγματικές συνθήκες ρύπανσης από βαρέα μέταλλα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. (2006) Phosphate-buffered saline (PBS). *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, pdb.rec8247.
2. Abalde, J., Cid, A., Reiriz, S., Torres, E., and Herrero, C. (1995) Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 317-324.
3. Abbas, S.H., Ismail, I.M., Mostafa, T.M., and Sulaymon, A.H. (2014) Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology* 3, 74-102.
4. Abdel-Ghani, N.T. and El-Chaghaby, G.A. (2014) BIOSORPTION FOR METAL IONS REMOVAL FROM AQUEOUS SOLUTIONS: A REVIEW OF RECENT STUDIES. *International Journal of Latest Research in Science and Technology* 3, 24-42.
5. Abu-Zeid, M.A. (1998) Water and sustainable development: the vision for world water, life and the environment. *Water Policy* 1, 9-19.
6. Adams, M. (2011) Teaching with *Chlamydomonas*. *Tested Studies for Laboratory Teaching: Peer-Reviewed Proceedings of the Conference of the Association for Biology Laboratory Education* 32, 237-244.
7. Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R.T., and Traina, S.J. (2002) Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 210, 1-11.
8. Afkar, E., Ababna, H., and Fathi, A. (2010) Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris*, to Some Heavy Metals.
9. Ahalya, N., Ramachandra, T.V., and Kanamadi, R.D. (2003) Biosorption of Heavy Metals *Research Journal Of Chemistry And Environment* 7, 71-79.
10. Ajayan, K.V. and Selvaraju, M. (2012) Heavy Metal Induced Antioxidant Defense System of Green Microalgae and its Effective Role in Phycoremediation of Tannery Effluent. *Pak. J. Biol. Sci.* 15, 1056-1062.
11. Appenroth, K.J. (2010a) Definition of "Heavy Metals" and Their Role in Biological Systems. In *Soil Heavy Metals*, pp. 19-29, Springer Berlin Heidelberg.
12. Appenroth, K.J. (2010b) What are "heavy metals" in Plant Sciences? *Acta Physiol Plant* 32, 615-619.

13. Arica, M.Y., Tüzün, İ., Yalçın, E., İnce, Ö., and Bayramoğlu, G. (2005) Utilisation of native, heat and acid-treated microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* preparations for biosorption of Cr(VI) ions. *Process Biochemistry* 40, 2351-2358.
14. Arief, V.O., Trilestari, K., Sunarso, J., Indraswati, N., and Ismadji, S. (2008) Recent Progress on Biosorption of Heavy Metals from Liquids Using Low Cost Biosorbents: Characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. *CLEAN – Soil, Air, Water* 36, 937-962.
15. Arunakumara, K.K.I.U. and Zhang, X. (2008) Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *J. Ocean Univ. China* 7, 60-64.
16. Atkinson, B., Bux, F., and Kusan, H. (1998) Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water S. A.* 24, 129-135.
17. Barceló, J. and Poschenrieder, C. (2004) Structural and Ultrastructural Changes in Heavy Metal Exposed Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants* (Prasad, M.N.V., ed), pp. 223-248, Springer Berlin Heidelberg.
18. Bates, S.S., Tessier, A., Campbell, P.G.C., and Buffle, J. (1982) ZINC ADSORPTION AND TRANSPORT BY CHLAMYDOMONAS VARUIABILIS AND SCENEDESMUS SUBSPICATUS (CHLOROPHYCEAE) GROWN IN SEMICONTINUOUS CULTURE¹. *Journal of Phycology* 18, 521-529.
19. Batley, G.E. (2012) “Heavy metal”—a useful term. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8, 215-215.
20. Batley, G.E. and Gardner, D. (1977) Sampling and storage of natural waters for trace metal analysis. *Water Research* 11, 745-756.
21. Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., and Arica, M.Y. (2006) Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing* 81, 35-43.
22. Beckett, W.S., Nordberg, G.F., and Clarkson, T.W. (2007) Chapter 3 - Routes of Exposure, Dose, and Metabolism of Metals. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* (Nordberg, G.F., et al., eds), pp. 39-64, Academic Press.
23. Bhatnagar, S.K., Reeta (2013) Bioremediation: A Sustainable Tool for Environmental Management – A Review. *Annual Review & Research in Biology* 3, 974-993.
24. Bjerregaard, P. and Andersen, O. (2007) Chapter 13 - Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* (Nordberg, G.F., et al., eds), pp. 251-280, Academic Press.
25. Blaby-Haas, C.E. and Merchant, S.S. (2012) The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 1531-1552.

26. Boswell, C., Sharma, N.C., and Sahi, S.V. (2002) Copper tolerance and accumulation potential of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 546-553.
27. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
28. Bridges, C.C. and Zalups, R.K. (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274-308.
29. Brinza, L., Dring, M., and Gavrilescu, M. (2007) MARINE MICRO AND MACRO ALGAL SPECIES AS BIOSORBENTS FOR HEAVY METALS. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)* 6, 237-251.
30. Button, K.S. and Hostetter, H.P. (1977) COPPER SORPTION AND RELEASE BY *CYCLOTELLA MENEGHINIANA* (BACILLARIOPHYCEAE) AND *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* (CHLOROPHYCEAE)1. *Journal of Phycology* 13, 198-202.
31. Cai, X.H., Brown, C., Adhiya, J., Traina, S.J., and Sayre, R.T. (1999) Growth and Heavy Metal Binding Properties of Transgenic *Chlamydomonas* Expressing a Foreign Metallothionein Gene. *International Journal of Phytoremediation* 1, 53-65.
32. Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M.P., and Saoncella, A. (2001) An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res* 35, 69-76.
33. Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., and Vona, V. (2013) Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *SpringerPlus* 2, 147.
34. Carpena, E., Andreani, G., and Isani, G. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21 Suppl 1, 35-39.
35. Carr, G.M., Neary, J.P., and Gems, W. (2008) *Water quality for ecosystem and human health*. United Nations Environment Programme, Global Environment Monitoring System/Water Programme.
36. Chader, S., Belhamel, M., & H Hacene (2006) Physiological and Biochemical characterization of *Chlamydomonas* sp the Hydrogen Production's Strain. In *WHEC16: 16 World Hydrogen Energy Conference*.
37. Chapman, P.M. (2012) "Heavy metal"—cacophony, not symphony. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8, 216-216.
38. Chojnacka, K. (2009) Biosorption and bioaccumulation-new tools for separation technologies of 21 century.
39. Chojnacka, K. (2010) Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment international* 36, 299-307.

40. Choudhary, M., Jetley, U.K., Abash Khan, M., Zutshi, S., and Fatma, T. (2007) Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 204-209.
41. Christy, C.B. and Rudolfs, K.Z. (2010) Ionic and Molecular Mimicry and the Transport of Metals. In *Cellular and Molecular Biology of Metals*, pp. 241-294, CRC Press.
42. Cobbett, C. (2001) Heavy Metal Detoxification in Plants: Phytochelatin Biosynthesis and Function. *IUBMB Life* 51, 183-188.
43. Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159-182.
44. Cornelis, R. and Nordberg, M. (2007) Chapter 2 - General Chemistry, Sampling, Analytical Methods, and Speciation. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* (Nordberg, G.F., et al., eds), pp. 11-38, Academic Press.
45. Das, N., Vimala, R., and Karthika, P. (2008) Biosorption of heavy metals—An overview. *Indian Journal of Biotechnology (IJBT)* 7, 159-169.
46. Davidson, T., Ke, Q., and Costa, M. (2007) Chapter 5 - Selected Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* (Nordberg, G.F., et al., eds), pp. 79-100, Academic Press.
47. Duffus, J.H. (2002) "HEAVY METALS"—A MEANINGLESS TERM? <http://pac.iupac.org/publications/pac/74/5/0793/>.
48. Eccles, H. (1999) Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Trends Biotechnol.* 17, 462-465.
49. Flouty, R. and Estephane, G. (2012) Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: a comparative study. *J Environ Manage* 111, 106-114.
50. Franklin, N.M., Stauber, J.L., Apte, S.C., and Lim, R.P. (2002) Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 742-751.
51. Gadd, G. and Griffiths, A. (1977) Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4, 303-317.
52. Gadd, G.M. (2009) Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 13-28.
53. Gaur, J.P. and Rai, L.C. (2001) Heavy Metal Tolerance in Algae. In *Algal Adaptation to Environmental Stresses* (Rai, L. and Gaur, J., eds), pp. 363-388, Springer Berlin Heidelberg.
54. Gavrilescu, M. (2004) Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences* 4, 219-232.

55. González-Dávila, M. (1995) The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. *Mar. Chem.* 48, 215-236.
56. González, F., Romera, E., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.Á., and García-Balboa, C. (2011) Algal Biosorption and Biosorbents. In *Microbial Biosorption of Metals* (Kotrba, P., et al., eds), pp. 159-178, Springer Netherlands.
57. Goodenough, U.W. and Heuser, J.E. (1985) The Chlamydomonas cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *J. Cell Biol.* 101, 1550-1568.
58. Gorman, D.S. and Levine, R.P. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardtii. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 1665-1669.
59. Greger, M. and Johansson, M. (2004) Aggregation effects due to aluminum adsorption to cell walls of the unicellular green alga Scenedesmus obtusiusculus. *Phycological Research* 52, 53-58.
60. Gupta, S. and Sharma, S. (2014) TOLERANCE AGAINST HEAVY METAL TOXICITY IN CYANOBACTERIA: ROLE OF ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
61. Hanikenne, M. (2003) Chlamydomonas reinhardtii as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist* 159, 331-340.
62. Hanikenne, M., Merchant, S.S., and Hamel, P. (2009) Chapter 10 - Transition Metal Nutrition: A Balance Between Deficiency and Toxicity. In *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)* (Harris, E.H., et al., eds), pp. 333-399, Academic Press.
63. Hanumantha, R.P., Ranjith Kumar, R., Raghavan, B.G., Subramanian, V., and Sivasubramanian, V. (2011) Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. *Water SA* 37, 07-14.
64. Harris, E.H. (2009) *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. Elsevier Science.
65. He, J. and Chen, J.P. (2014) A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource technology* 160, 67-78.
66. Hirata, K., Tsuji, N., and Miyamoto, K. (2005) Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 593-599.
67. Hodson, M.E. (2004) Heavy metals—geochemical bogey men? *Environmental Pollution* 129, 341-343.

68. Howe, G. and Merchant, S. (1992) Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annu Rev Plant Physiol* 98, 127-136.
69. Inouhe, M. (2005) Phytochelatins. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 65-78.
70. Jammers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., and Jones, O.A. (2013) Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals* 26, 731-740.
71. Küpper, H., Šetlík, I., Spiller, M., Küpper, F.C., and Prášil, O. (2002) HEAVY METAL-INDUCED INHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS: TARGETS OF IN VIVO HEAVY METAL CHLOROPHYLL FORMATION1. *Journal of Phycology* 38, 429-441.
72. Kadukova, J. and Vircikova, E. (2005) Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environment international* 31, 227-232.
73. Kalinowska, R. and Pawlik-Skowrońska, B. (2008) Metal resistance of soil algae (Chlorophyta) occurring in post-flotation Zn/Pb-and Cu-tailing ponds. *Polish Journal of Ecology* 56, 415-430.
74. Kaplan, D. (2007) Water Pollution and Bioremediation by Microalgae: Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture*, pp. 439-447, Blackwell Publishing Ltd.
75. Koenigsberg, S.S., Hazen, T.C., and Peacock, A.D. (2005) Environmental biotechnology: A bioremediation perspective. *Remediation Journal* 15, 5-25.
76. Kola, H., Laglera, L.M., Parthasarathy, N., and Wilkinson, K.J. (2004) Cadmium adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environmental Chemistry* 1, 172-179.
77. Kondo, K., Hirayama, K., and Matsumoto, M. (2013) Adsorption of metal ions from aqueous solution onto microalga entrapped into Ca-alginate gel bead. *Desalination and Water Treatment* 51, 4675-4683.
78. Kratochvil, D. and Volesky, B. (1998) Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 16, 291-300.
79. Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D., and Dhewa, T. (2011) Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *Annual Review & Research in Biology* 1, 974-993.
80. Lesmana, S.O., Febriana, N., Soetaredjo, F.E., Sunarso, J., and Ismadji, S. (2009) Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochemical Engineering Journal* 44, 19-41.
81. Levy, J.L., Stauber, J.L., Adams, M.S., Maher, W.A., Kirby, J.K., and Jolley, D.F. (2005) Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2630-2639.

82. Lo, Y.C., Cheng, C.L., Han, Y.L., Chen, B.Y., and Chang, J.S. (2014) Recovery of high-value metals from geothermal sites by biosorption and bioaccumulation. *Bioresource technology* 160, 182-190.
83. Ludwig-Müller, J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 1757-1773.
84. Macek, T. and Mackova, M. (2011) Potential of Biosorption Technology. In *Microbial Biosorption of Metals* (Kotrba, P., et al., eds), pp. 7-17, Springer Netherlands.
85. Manimaran, K., Karthikeyan, P., Ashokkumar, S., Ashok Prabu, V., and Sampathkumar, P. (2012) Effect of copper on growth and enzyme activities of marine diatom, *Odontella mobiliensis*. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 30-37.
86. Martin, B.M. (2013) *Tissue culture techniques: an introduction*. Springer Science & Business Media.
87. Mejare, M. and Bulow, L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 19, 67-73.
88. Mendez-Alvarez, S., Leisinger, U., and Eggen, R.I. (1999) Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2, 15-22.
89. Moffett, D.B., El-Masri, H.A., and Fowler, B.A. (2007) Chapter 6 - General Considerations of Dose-Effect and Dose-Response Relationships. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* (Nordberg, G.F., et al., eds), pp. 101-115, Academic Press.
90. Monteiro, C., Castro, P.L., and Malcata, F.X. (2011) Microalga-Mediated Bioremediation of Heavy Metal-Contaminated Surface Waters. In *Bio-management of Metal-Contaminated Soils* (Khan, M.S., et al., eds), pp. 365-385, Springer Netherlands.
91. Monteiro, C.M., Castro, P.M., and Malcata, F.X. (2012) Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.* 28, 299-311.
92. Mosleh, Y.Y. and Mofeed, J. (2014) Bio-chemical biomarkers in algae *Scenedesmus obliquus* exposed to heavy metals Cd, Cu and Zn. *Life Science Journal* 11.
93. Munees Ahemad, M.K. (2013) Recent Trends in Microbial Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Biochemistry & Molecular Biology* 1, 19-26.
94. Muñoz, R., Alvarez, M.T., Muñoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B., and Mattiasson, B. (2006) Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere* 63, 903-911.
95. Naja, G., Murphy, V., Volesky, B., and Flickinger, M.C. (2009) Biosorption, Metals. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc.
96. Naja, G. and Volesky, B. (2011) The Mechanism of Metal Cation and Anion Biosorption. In *Microbial Biosorption of Metals* (Kotrba, P., et al., eds), pp. 19-58, Springer Netherlands.

97. Niestroy, J., Martínez, A.B., and Band-Schmidt, C.J. (2014) Analysis of concentration-dependent effects of copper and PCB on different *Chattonella* spp. microalgae (Raphidophyceae) cultivated in artificial seawater medium. *EXCLI Journal*, 197-211.
98. Obade, V., Lal, R., and Chen, J. (2013) Remote Sensing of Soil and Water Quality in Agroecosystems. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1-27.
99. Oliveira, R.C., Palmieri, M.C., and Garcia, O.J. (2011) *Biosorption of Metals: State of the Art, General Features, and Potential Applications for Environmental and Technological Processes.*
100. Omar, H.H. (2002) Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50, 95-100.
101. Ouyang, H., Kong, X., He, W., Qin, N., He, Q., Wang, Y., . . . Xu, F. (2012) Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Chin. Sci. Bull.* 57, 3363-3370.
102. Park, D., Yun, Y.-S., and Park, J.M. (2010) The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 86-102.
103. Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., and Cañizares-Villanueva, R.O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1-10.
104. Pereira, M.J., Resende, P., Azeiteiro, U.M., Oliveira, J., and Figueiredo, D.R. (2005) Differences in the Effects of Metals on Growth of Two Freshwater Green Algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak and *Gonium pectorale* Müller). *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 515-522.
105. Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003) HEAVY METAL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN ALGAE1. *Journal of Phycology* 39, 1008-1018.
106. Pitre, D., Boulemant, A., and Fortin, C. (2014) Uptake and sorption of aluminium and fluoride by four green algal species. *Chem Cent J* 8.
107. Power and Syred (n.d) *Chlamydomonas* sp. algae, SEM. Science Photo Library <http://www.sciencephoto.com>.
108. Priyadarshani, I., Sahu, D., and Rath, B. (2011) Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives. *Journal of Biochemical Technology* 3, 299-304.
109. Rai, L.C., Singh, A.K., and Mallick, N. (1991) Studies on Photosynthesis, the Associated Electron Transport System and Some Physiological Variables of *Chlorella vulgaris* Under Heavy Metal Stress. *J. Plant Physiol.* 137, 419-424.
110. Raize, O., Argaman, Y., and Yannai, S. (2004) Mechanisms of biosorption of different heavy metals by brown marine macroalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 451-458.

111. Rajamani, S., Siripornadulsil, S., Falcao, V., Torres, M., Colepicolo, P., and Sayre, R. (2007) Phycoremediation of heavy metals using transgenic microalgae. *Adv. Exp. Med. Biol.* 616, 99-109.
112. Rao, L.N. and Prabhakar, G. (2011) REMOVAL OF HEAVY METALS BY BIOSORPTION—AN OVERALL REVIEW. *Journal of Engineering Research and Studies* 2, 17-22.
113. Rehnstam-Holm, A.S. and Godhe, A. (2003) Genetic engineering of algal species. In *Biotechnology (Ed. HW Doelle) In: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) UNESCO*.
114. Richmond, A. (2008) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley.
115. Ritchie, R.J. (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis research* 89, 27-41.
116. Robinson, N. (1989) Algal metallothioneins: secondary metabolites and proteins. *J Appl Phycol* 1, 5-18.
117. Rodriguez, M.C., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Conforti, V., and Gualtieri, P. (2007) Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Res.* 105, 234-239.
118. Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M.L., and Munoz, J.A. (2006) Biosorption with algae: a statistical review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 223-235.
119. Sabatini, S.E., Juárez, Á.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., and Ríos de Molina, M.d.C. (2009) Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1200-1206.
120. Sag, Y. and Kutsal, T. (2001) Recent trends in the biosorption of heavy metals: A review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, 376-385.
121. Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M., and Popovic, R. (2010) Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 96, 109-114.
122. Shanab, S., Essa, A., and Shalaby, E. (2012) Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling & Behavior* 7, 392-399.
123. Shehata, S.A. and Badr, S.A. (1980) Growth response of *Scenedesmus* to different concentrations of copper, cadmium, nickel, zinc, and lead. *Environment international* 4, 431-434.
124. Shukla, M.K., Tripathi, R.D., Sharma, N., Dwivedi, S., Mishra, S., Singh, R., . . . Rai, U.N. (2009) Responses of cyanobacterium *Anabaena doliolum* during nickel stress. *J. Environ. Biol.* 30, 871-876.

125. Solymosi, K. and Bertrand, M. (2012) Soil metals, chloroplasts, and secure crop production: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 245-272.
126. Souza, O., P., Ferreira, R., L., Pires, X., N.R., . . . F., M.r. (2012) Algae of economic importance that accumulate cadmium and lead: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
127. Sriprang, R. and Murooka, Y. (2007) Accumulation and Detoxification of Metals by Plants and Microbes. In *Environmental Bioremediation Technologies* (Singh, S. and Tripathi, R., eds), pp. 77-100, Springer Berlin Heidelberg.
128. Sun, J., Ji, Y., Cai, F., and Li, J. (2012) Heavy Metal Removal Through Biosorptive Pathways. In *Advances in Water Treatment and Pollution Prevention* (Sharma, S.K. and Sanghi, R., eds), pp. 95-145, Springer Netherlands.
129. Sunda, W.G. and Huntsman, S.A. (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* 219, 165-181.
130. Tüzün, İ., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., and Arıca, M.Y. (2005) Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Environmental Management* 77, 85-92.
131. Torres, M.A., Barros, M.P., Campos, S.C., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R.T., and Colepicolo, P. (2008) Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 1-15.
132. Tsezos, M., Remoundaki, E., and Hatzikioseyan, A. (2011) Biosorption - Principles and Applications for Metal Immobilization from Waste-Water Streams In *Proceedings of EU-Asia Workshop on Clean Production and Nanotechnologies*, pp. 23-33.
133. Valls, M., Bofill, R., Gonzalez-Duarte, R., Gonzalez-Duarte, P., Capdevila, M., and Atrian, S. (2001) A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J. Biol. Chem.* 276, 32835-32843.
134. Volesky, B. (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59, 203-216.
135. Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 11, 235-250.
136. Wan Maznah, W.O., Al-Fawwaz, A.T., and Surif, M. (2012) Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences* 24, 1386-1393.

137. Weiss-Magasic, C., Lustigman, B., and Lee, L.H. (1997) Effect of Mercury on the Growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 828-833.
138. Wilde, E.W. and Benemann, J.R. (1993) Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology advances* 11, 781-812.
139. Wong, P.K. and Chang, L. (1991) Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. *Environ. Pollut.* 72, 127-139.
140. World Health Organization, W. (2013) Water Quality and Health Strategy 2013-2020. 1-15.
141. Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S., and Wilkinson, K.J. (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88, 1721-1731.
142. Zabochnicka-Świątek, M. and Krzywonos, M. (2014) Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal *Polish Journal of Environmental Studies* 23, 551-561.
143. Zhao, Y., Wang, B., Liu, C., and Wu, Y. (2013) Biosorption of trace metals from aqueous multimetal solutions by green microalgae. *Chin. J. Geochem.* 32, 385-391.