

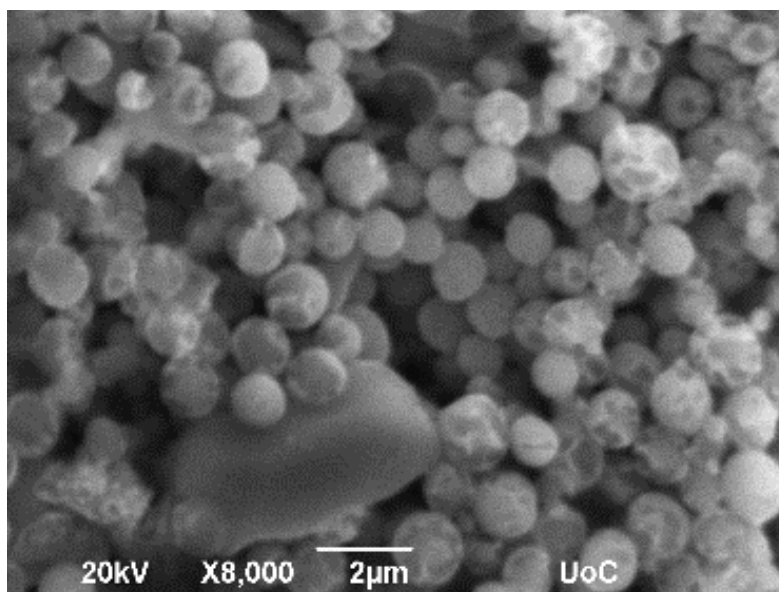


**Πανεπιστήμιο Κρήτης**

**Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών  
Επιστημών**

**Τμήμα Χημείας**

*Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου και πρωτεϊνών του  
αναερόβιου φωτοσυνθετικού βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum**



*Εργαστήριο Βιοχημείας  
Φραγκέδη Ερμίνα-Αικατερίνη (Α.Μ. 1665)  
Επιβλέπων καθηγητής Τσιώτης Γ.*

*Ηράκλειο 2016*

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη του πράσινου θειούχου βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum* σε θειούχα και θειοθειικά άλατα. Η παρουσία των αλάτων αυτών παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς τις χρησιμοποιεί ως δότες ηλεκτρονίων στην διαδικασία της αναερόβιας φωτοσύνθεσης. Κατά την οξείδωση των θειούχων και των θειοθειικών αλάτων, παράγεται ως ενδιάμεσος μεταβολίτης το στοιχειακό θείο σε μορφή σφαιριδίων, το οποίο και εκκρίνεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Το βακτήριο χρησιμοποιεί το στοιχειακό θείο ως δότη ηλεκτρονίων, όταν έχουν εξαντληθεί οι άλλες πηγές θείου. Οι μηχανισμοί με του οποίους δημιουργούνται και διασπώνται τα σφαιρίδια αυτά δεν είναι γνωστοί.

Μελετήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου κάτω από δύο διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά στην πηγή του θείου, και συγκεκριμένα στην πρώτη χρησιμοποιήθηκαν θειούχα και θειοθειικά άλατα, ενώ στην δεύτερη μόνο θειούχα άλατα. Όλες οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αναερόβια, στους 49°C, υπό πλήρη φωτισμό. Με σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της βακτηριοχλωροφύλλης και των μεταβολιτών  $S^0$  και  $SO_4^{2-}$ , χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοφωτομετρικές και αναλυτικές μέθοδοι. Αυτό που παρατηρήθηκε, μελετώντας την εκάστοτε συγκέντρωση της βακτηριοχλωροφύλλης σε συνάρτηση με το χρόνο, ήταν ότι το βακτήριο αναπτυσσόταν ταχύτερα παρουσία θειούχων και θειοθειικών αλάτων.

Για εκτενέστερη μελέτη του στοιχειακού θείου, αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσής του. Το απομονωμένο ίζημα μελετήθηκε με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και φασματομετρία μάζας, συμπεράνοντας ότι το στοιχειακό θείο εκκρίνεται με τη μορφή σφαιριδίων διαφόρων μεγεθών, σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτερο και από το μέγεθος του βακτηρίου, και ότι πιθανόν τα σφαιρίδια αυτά να αποτελούνται από πολλαπλά άτομα στοιχειακού θείου, τα οποία σχηματίζουν αλυσίδες. Τέλος το απομονωμένο στοιχειακό θείο μελετήθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης, ώστε να παρατηρηθεί τυχόν ύπαρξη πρωτεϊνών που να σχετίζονται με το σχηματισμό των σφαιριδίων και τη μεταφορά τους έξω από το κύτταρο.

<b>Περίληψη.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>4</b>
1.1 Η φωτοσύνθεση .....	4
1.2 Τα βακτήρια .....	6
1.3 Τα πράσινα θειούχα βακτήρια.....	7
1.4 Το βακτήριο <i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	7
1.4.1 Η χρώση κατά Gram.....	8
1.4.2 Το χλωρόσωμα.....	10
1.4.3 Η φωτοσύνθεση στο βακτήριο <i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	10
1.5 Ο μεταβολισμός του θείου.....	12
<b>Σκοπός της εργασίας .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>14</b>
2.1 Υλικά .....	14
2.2 Μέθοδοι .....	17
2.2.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	17
2.2.2 Επεξεργασία καλλιεργιών για την μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	19
2.2.3 Απομόνωση εκκρινόμενου στοιχειακού θείου.....	19
2.2.4 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας LDI-TOF και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.....	20
2.2.5 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης.....	20
2.2.6 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών .....	20
2.2.7 Αναλυτικές μέθοδοι.....	21
2.2.7.1 Φασματομετρία Μοριακής Απορρόφησης Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) .....	21
2.2.7.1.1 Το φασματοφωτόμετρο .....	22
2.2.7.1.2 Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i> με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) .....	23
2.2.7.2 Φασματομετρία μάζας (MS) .....	23
2.2.7.2.1 Φασματομετρία μάζας LDI-TOF (MALDI-TOF MS) .....	23
2.2.7.3 Μέθοδοι χρωματογραφίας .....	25
2.2.7.3.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	25
2.2.7.4 Μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών – Ηλεκτροφόρηση.....	27
2.2.7.4.1 SDS - Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου .....	28
2.2.7.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.....	30
<b>3. Αποτελέσματα και συζήτηση .....</b>	<b>31</b>
3.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	31
3.2 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Chlorobaculum tepidum</i> .....	33
3.3 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου .....	37
3.3.1 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) .....	37

3.3.2 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF.....	41
3.3.2 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης.....	45
<b>4. Συμπεράσματα.....</b>	<b>49</b>
4.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου .....	49
4.2 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου.....	50
4.3 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης.....	50
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>51</b>

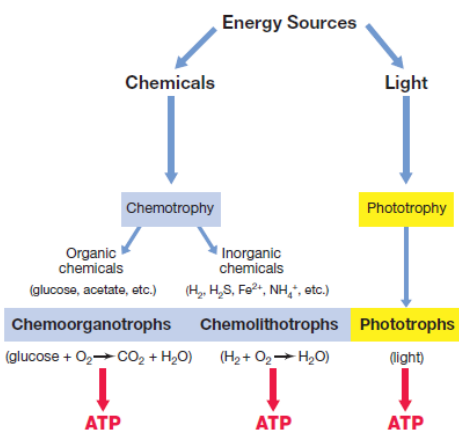
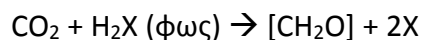
# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Η φωτοσύνθεση

Κάθε οργανισμός απαιτεί μια συνεχή παροχή ενέργειας με σκοπό την επίτευξη διαφόρων μεταβολικών διαδικασιών που συμβάλλουν στη διατήρηση της ζωής. Για την εξασφάλιση της ενέργειας αυτής λαμβάνει χώρα ένα πλήθος αντιδράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν την αποικοδόμηση χημικών μορίων καθώς και την μετατροπή αυτών σε άλλα μόρια.

Οι οργανισμοί με βάση την πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν, χωρίζονται σε χημειοργανότροφοι, χημειολιθότροφοι και φωτότροφοι. Οι πρώτοι χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις τις οποίες οξειδώνουν και η ενέργεια που προκύπτει δεσμεύεται σε πολύ ισχυρούς δεσμούς, και συγκεκριμένα αυτούς της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Αντίστοιχα οι δεύτεροι χρησιμοποιούν ανόργανες ενώσεις ώστε να επιτελέσουν την ίδια διαδικασία με τους προηγούμενους.

Οι οργανισμοί που περιέχουν χρωστικές, οι οποίες τους επιτρέπουν να μετατρέπουν την φωτεινή ενέργεια σε χημική, μέσω μιας διαδικασίας που καλείται φωτοσύνθεση, ονομάζονται φωτότροφοι. Κατά τη διαδικασία αυτή η χημική ενέργεια αποθηκεύεται σε μόρια υδατανθράκων που παράγονται μέσω αυτής. Παρακάτω φαίνεται μια γενική εξίσωση της φωτοσύνθεσης :



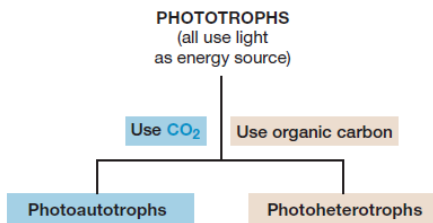
Εικόνα 1. Ομαδοποίηση οργανισμών με βάση το είδος της ενεργειακής πηγής που χρησιμοποιούν

Μια περαιτέρω ομαδοποίηση των φωτότροφων οργανισμών με βάση την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιούν, είναι αυτή σε φωτοαυτότροφους και φωτοετερότροφους. Οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το CO<sub>2</sub> ως μοναδική πηγή άνθρακα, και το μετατρέπουν σε οργανικές

ενώσεις, με τη βοήθεια φωτεινής ενέργειας. Ενώ οι φωτοετερότροφοι, για την ίδια διαδικασία, χρησιμοποιούν άνθρακα οργανικών ενώσεων.

Συγκεκριμένα οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί πραγματοποιούν δύο διαδικασίες παράλληλα: παράγουν ATP και αφομειώνουν το CO<sub>2</sub>. Για την ανάπτυξη των οργανισμών αυτών, η παροχή ενέργειας γίνεται από το ATP, και τα ηλεκτρόνια για την αφομείωση του CO<sub>2</sub> προέρχονται από το μόριο NADPH. Το μόριο NADPH προέρχεται από την αναγωγή του NADP<sup>+</sup>, και τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για αυτή την διαδικασία προσφέρονται από διάφορους ηλεκτρονιοδότες.

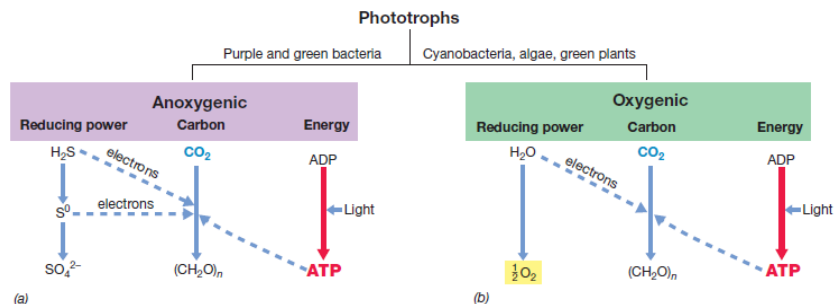
Κάποια φωτότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν ηλεκτρονιοδότες που βρίσκονται στο περιβάλλον τους όπως H<sub>2</sub>S και H<sub>2</sub>. Αντίθετα τα φυτά, τα άλγη και τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν το μόριο του νερού ως ηλεκτρονιοδότη.



Εικόνα 2. Ομαδοποίηση φωτότροφων οργανισμών με βάση την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιούν

Στους πρωκαριωτικούς φωτότροφους οργανισμούς είναι γνωστές δύο διαδικασίες: η οξυγονική φωτοσύνθεση και η ανοξυγονική φωτοσύνθεση.

Οι οργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν H<sub>2</sub>O πραγματοποιώντας οξυγονική φωτοσύνθεση, γιατί παράγεται O<sub>2</sub> ως παραπροϊόν από την οξείδωση αυτή. Αντιθέτως κάποια βακτήρια δεν έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν H<sub>2</sub>O και έτσι δεν παράγεται O<sub>2</sub>, μια διαδικασία γνωστή και ως ανοξυγονική φωτοσύνθεση. Τα φυτά, τα κυανοβακτήρια και τα άλγη κάνουν οξυγονική φωτοσύνθεση, ενώ τα μωβ, τα πράσινα βακτήρια και τα ελικοβακτήρια κάνουν ανοξυγονική φωτοσύνθεση. (Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P., 2010)



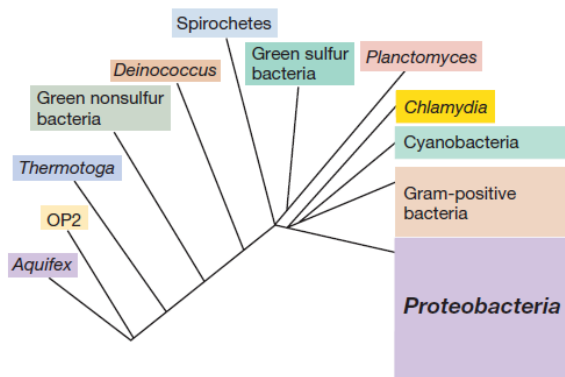
Εικόνα 3. Ανοξυγονική και οξυγονική φωτοσύνθεση

## 1.2 Τα βακτήρια

Μια σημαντική ομαδοποίηση των κυττάρων είναι αυτή σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά, εκ των οποίων τα πρώτα είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και δομικά πιο περίπλοκα. Αξιοσημείωτη διαφορά αυτών των δύο ειδών κυττάρων, είναι ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν πυρήνα, μέσα στον οποίο περιέχεται το DNA τους, σε αντίθεση με τα προκαρυωτικά κύτταρα τα οποία δεν διαθέτουν πυρήνα, και γενικότερα οργανίδια (δομές που περικλύονται από μεμβράνες πχ πυρήνας, μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες). Μια άλλη σημαντική διαφορά τους είναι ότι στα ευκαρυωτικά κύτταρα η σύνθεση του RNA (αντιγραφή, μεταγραφή του DNA) γίνεται στον πυρήνα, και η πρωτεϊνοσύνθεση (μετάφραση του RNA) γίνεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι αντίστοιχες διαδικασίες στα προκαρυωτικά κύτταρα γίνονται στο κυτταρόπλασμα.

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικά κύτταρα, παρόλαυτα διαθέτουν πρωτεϊνικού τύπου μικροκατασκευές οι οποίες πιστεύεται πως είναι πρωτόγονα οργανίδια περιβαλλόμενα από πρωτεϊνικά περιβλήματα. (Kerfeld, C. A.; Sawaya, M. R; Tanaka, S; Nguyen, C. V.; et al., 2005)

Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες rRNA προέκυψαν τρεις διαφορετικές φυλογενετικές σειρές κυττάρων. Οι σειρές αυτές επονομαζόμενες και ως 'κλάδοι', χωρίζονται σε Βακτήρια και Αρχαία (προκαρυωτικά κύτταρα) και σε Ευκάρυα (ευκαρυωτικά κύτταρα). Ο κλάδος των Βακτηρίων αποτελείται από πολλές διαφορετικές φυλές. Κάποιες από αυτές είναι τα πράσινα θειούχα βακτήρια, τα πράσινα μη θειούχα βακτήρια, τα κυανοβακτήρια κ.α., με την μεγαλύτερη από αυτές είναι τα πρωτεοβακτήρια. (Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P., 2010)



Εικόνα 4. Φυλογενετικό δέντρο μερικών χαρακτηριστικών βακτηρίων

### 1.3 Τα πράσινα θειούχα βακτήρια

Τα πράσινα θειούχα βακτήρια πιστεύεται πως ήταν από τους πρώτους φωτότροφους οργανισμούς στη Γη οι οποίοι εξελίχθηκαν και σχηματίζουν δικό τους φυλογενετικό κλάδο. (Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P., 2010)

Αποτελούν μια οικογένεια υποχρεωτικά αναερόβιων φωτότροφων βακτηρίων και ανήκουν στη φυλή Chlorobi. Τα βακτήρια αυτά είναι μη κινητικά και το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό, ραβδοειδές ή σε μορφή ινιδίων. Για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, χρησιμοποιούν κέντρο αντίδρασης τύπου I, καθώς και μόρια βακτηριοχλωροφύλλης a,c,d,e, και μόρια χλωροφύλλης a. Η βακτηριοχλωροφύλλη a περιέχεται κυρίως σε κάποια εξειδικευμένα οργανίδια, τα οποία καλούνται χλωροσώματα και γίνεται αναφορά σε αυτά παρακάτω.

Τα πράσινα θειούχα βακτήρια οξειδώνουν κυρίως ενώσεις του θείου και σπανιότερα υδρογόνο και σίδηρο (οξειδωτική κατάσταση +2). Επίσης πραγματοποιούν την καθήλωση του άνθρακα μέσω του αντίθετου κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, όπου δηλαδή χρησιμοποιούνται διοξείδιο του άνθρακα και νερό ώστε να παραχθούν διάφορες ενώσεις του άνθρακα. (Bryant DA, Friigard DU, 2006)

### 1.4 Το βακτήριο *Chlorobaculum tepidum*

Το *Chlorobaculum tepidum* πρόκειται για ένα αναερόβιο, θερμόφιλο, πράσινο θειούχο βακτήριο το οποίο απομονώθηκε από θερμές πηγές στη Νέα Ζηλανδία, όξινου χαρακτήρα και υψηλής περιεκτικότητας σε θειούχες ενώσεις.

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *Chlorobaculum tepidum* βρέθηκε να είναι 47-48°C, με μέγιστο όριο θερμοκρασίας τους 52°C. Ο χρόνος πολλαπλασιασμού είναι περίπου δύο ώρες.

Τα βακτηριακά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως μη κινητικά, ραβδοειδή και αρνητικά κατά Gram (Gram-negative). (Wahlund, T.M ; Woese, C.R ; Castenholz, R.W ; Madigan, M.T ;, 1991)



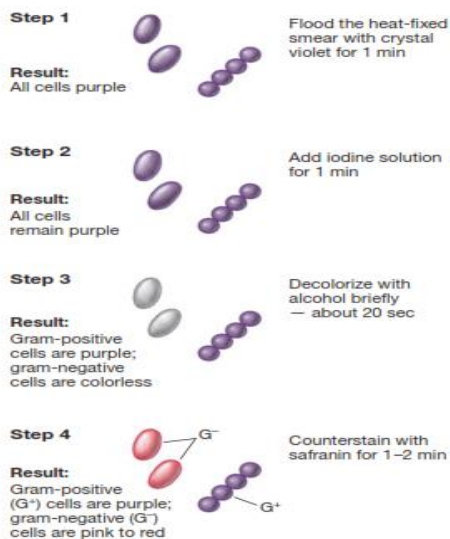
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η φυλογενετική ταξινόμηση του *Chlorobaculum tepidum*.

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

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum* (πηγή: [<http://www.uniprot.org/taxonomy/1097>])

#### 1.4.1 Η χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία. Με βάση την αντίδρασή τους στη χρώση αυτή τα βακτήρια μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες : τα Gram-positive και τα Gram-negative. Συγκεκριμένα, τα Gram-positive βακτήρια εμφανίζονται μωβ-βιολετί και Gram-negative βακτήρια εμφανίζονται ροζ. Η διαφορά χρώματος οφείλεται στη διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-positive και Gram-negative κυττάρων.

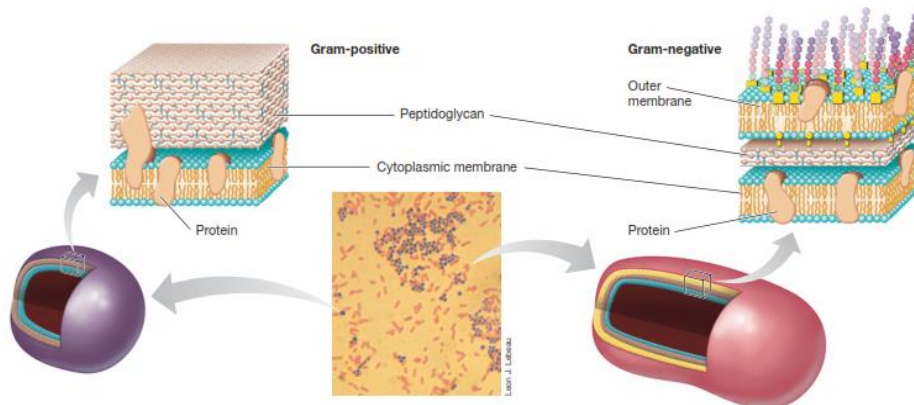


Εικόνα 5. Κύρια θήματα εφαρμογής της χρώσης Gram

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-positive βακτηρίων είναι πολύ παχύ και αποτελείται κυρίως από έναν τύπο μορίου, ενώ των Gram-negative βακτηρίων είναι πιο περίπλοκο. Τα βακτηριακά τοιχώματα περιέχουν μια άκαμπτη στοιβάδα που είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητά τους. Η στοιβάδα αυτή καλείται πεπτιδογλυκάνη και πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη, ο οποίος αποτελείται από δύο είδη σάκχαρων, και μερικά αμινοξέα.

Η διαφορά των Gram-positive και Gram-negative βακτηρίων, όσον αφορά στο μόριο της πεπτιδογλυκάνης είναι ότι στα πρώτα εμφανίζεται σε ποσοστό 90%, στο τοίχωμά τους, ενώ στα

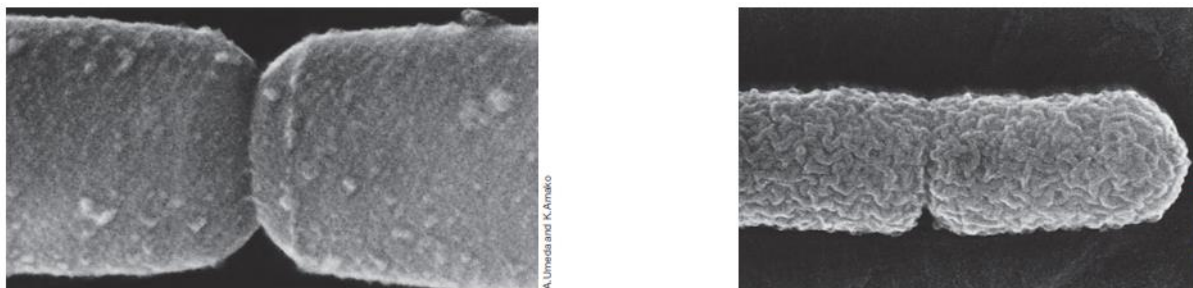
δεύτερα σε ποσοστό 10%. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι το τοίχωμα των Gram-negative βακτηρίων αποτελείται κατά κύριο λόγο από την εξωτερική μεμβράνη, όπου πρόκειται για μια δεύτερη λιπιδική διπλοστοιβάδα η οποία δεν αποτελείται αποκλειστικά από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες, όπως η κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά και από διάφορους πολυσακχαρίτες. (Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P., 2010)



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram positive και Gram negative βακτηρίων



Εικόνα 7. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM) του κυτταρικού τοιχώματος Gram positive (αριστερά) και Gram negative βακτηρίων (δεξιά)



Εικόνα 8. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) του κυτταρικού τοιχώματος Gram positive (αριστερά) και Gram negative βακτηρίων (δεξιά). Παρατηρείται η διαφορά στην υφή της επιφάνειας

#### 1.4.2 Το χλωρόσωμα

Το *Chlorobaculum tepidum* όπως και τα περισσότερα πράσινα φωτοσυνθετικά βακτήρια διαθέτει χλωροσώματα. Το χλωρόσωμα μορφολογικά πρόκειται για ένα ελλειψοειδές οργανίδιο, μήκους 100-200 nm, το οποίο περιβάλλεται από μια λιπιδική μονοστοιβάδα που περιέχει μόρια χρωστικών (Bchl-βακτηριοχλωροφύλλες) και τοπολογικά συναντάται προσδεδεμένο στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των πράσινων φωτοσυνθετικών βακτηρίων.

Τα χλωροσώματα είναι συμπλέγματα τα οποία ευθύνονται για την συλλογή του φωτός, και αποτελούν τα μόνα γνωστά φωτοσυνθετικά συστήματα, μέχρι τώρα, στα οποία η πλειονότητα των χρωστικών (Bchl-βακτηριοχλωροφύλλες) που περιέχουν, δεν δημιουργούν συμπλέγματα χρωστικής-πρωτεΐνης, αλλά συσσωματώματα. Επίσης φαίνεται να είναι οι πιο αποδοτικές φωτοσυνθετικές κεραιές, καθώς οι οργανισμοί που διαθέτουν τα συμπλέγματα αυτά, είναι ικανοί να φωτοσυνθέτουν υπό συνθήκες εξαιρετικά χαμηλού φωτισμού. Η αποδοτικότητα αυτή οφείλεται τόσο στο μέγεθος των χλωροσωμάτων, όσο και στον αριθμό των μορίων των χρωστικών που αυτά περιέχουν, δεδομένου ότι ένα χλωρόσωμα περιέχει σχεδόν  $10^5$  μόρια βακτηριοχλωροφύλλης (c,d,e αναλόγως το είδος), σε μορφή συσσωματωμάτων. Συγκεκριμένα κάθε κύτταρο *Chlorobaculum tepidum* διαθέτει 200-250 χλωροσώματα, όπου το καθένα περιέχει περίπου 200000 μόρια BChl c. Επίσης το 3% των συνολικών BChl στα χλωροσώματα του *Chlorobaculum tepidum* είναι BChl a, δηλαδή περίπου 6000 μόρια BChl a περιέχονται σε ένα χλωρόσωμα του βακτηρίου αυτού.

Τα συσσωματώματα που δημιουργούν οι χρωστικές, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν με τέτοιο τρόπο τις οπτικές ιδιότητες των βακτηριοχλωροφυλλών, ώστε να επιτυγχάνεται ταχεία μεταφορά ενέργειας. Τα χλωροσώματα περιέχουν επίσης καρτενοειδή και κινόνες όπου συνεισφέρουν στην απορρόφηση του φωτός, αλλά και στην προστασία από μόρια τα οποία αντιδρούν με το οξυγόνο. Επίσης διαθέτουν και πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται προσδεδεμένες και διασκορπισμένες στην λιπιδική μονοστοιβάδα. (J. Psencik, T.P.Ikonen, P. Laurinmaki, M. C. Merckel, S. J. Butcher, R. E. Serimaa, R. Tuma) (G. S. Orf, R. E. Blankenship, 2013)

#### 1.4.3 Η φωτοσύνθεση στο βακτήριο *Chlorobaculum tepidum*

Η φωτοσύνθεση στο *Chlorobaculum tepidum* ξεκινά με την απορρόφηση φωτονίων, της φωτεινής ενέργειας, από τα χλωροσώματα.

Στη συνέχεια η ενέργεια μεταφέρεται στην πρωτεΐνη Fenna-Mathews-Olson (FMO), η οποία περιέχει BChl a και έχει μέγιστο απορρόφησης στα 808 nm. Πιο συγκεκριμένα η FMO πρόκειται για ένα τριμερές, του οποίου κάθε μονομερές περιλαμβάνει επτά μόρια BChl a.

Έτσι η ενέργεια μεταφέρεται από την FMO στο κέντρο αντίδρασης, το οποίο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μηχανισμοί οι οποίοι προστατεύουν το φωτοσυνθετικό σύστημα από το οξυγόνο. Η πρωτεΐνη *Chlorobium quinone*, η οποία συναντάται σε αφθονία στα χλωροσώματα προβλέπεται να ευθύνεται για την ρύθμιση της οξειδοαναγωγής. Επίσης, υπό

οξειδωτικές συνθήκες, μειώνεται η μεταφορά της ενέργειας προς την FMO πρωτεΐνη. (Hauska , G ; Schoedt , T ; Remigy , H ; Tsiotis , G ;, 2001)

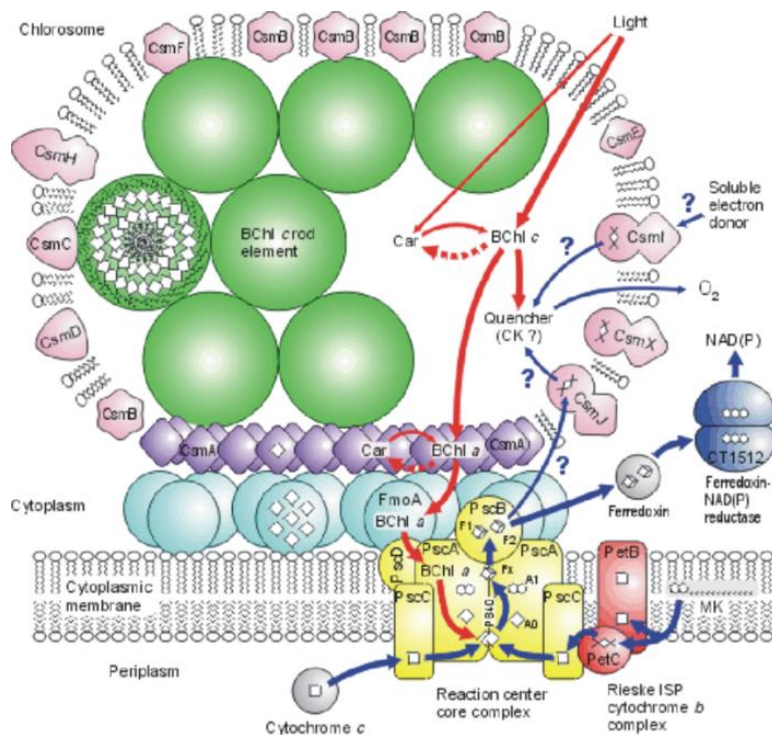
Το κέντρο αντίδρασης του βακτηρίου είναι ένα σύμπλεγμα πέντε υπομονάδων: των PscA, PscB, PscC, PscD και της πρωτεΐνης FMO.

Ο πυρήνας του κέντρου αντίδρασης είναι ένα ομοδιμερές τύπου I, δηλαδή αποτελείται από δύο αντίγραφα της PscA υπομονάδας και προσδένει τον πρώτο ηκεκτρονιοδότη P<sub>840</sub> ο οποίος είναι ένα ζεύγος μορίων BChl a, τον πρώτο ηλεκτρονιοδέκτη A<sub>0</sub> ο οποίος είναι ένα μονομερές Chl a, καθώς και το σύμπλεγμα 4Fe-4S, το οποίο επονομάζεται ως F<sub>x</sub>.

Η υπομονάδα PscB προσδένει τα δύο συμπλέγματα 4Fe-4S, επονομαζόμενα ως F<sub>A</sub> και F<sub>B</sub>, τα οποία αποτελούν τους τελικούς ηλεκτρονιοδέκτες, και συνδέεται με τη βακτηριακή φερροδοξίνη.

Κάθε κέντρο αντίδρασης του βακτηρίου προσδένει δύο υπομονάδες κυτοχρώματος C<sub>551</sub>, επονομαζόμενες PscC, οι οποίες λειτουργούν ως άμεσοι ηλεκτρονιοδότες για το μόριο P<sub>840</sub>.

Τέλος το κέντρο αντίδρασης συμπληρώνεται με την υπομονάδα PscD, της οποίας ο ρόλος είναι ακόμα αβέβαιος. Παρολαυτά πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με την φερροδοξίνη, και ότι είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική μεταφορά ενέργειας από τα χλωροσώματα, στο κέντρο αντίδρασης του βακτηρίου, μέσω της πρωτεΐνης FMO. (Goldbeck, J.H; Jagannathan, B., 2008)



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης των χλωροσωμάτων με το κέντρο αντίδρασης και την πρωτεΐνη FMO. Τα κόκκινα βέλη παριστάνουν τη μεταφορά ενέργειας και τα μπλε την μεταφορά των ηλεκτρονίων

### 1.5 Ο μεταβολισμός του θείου

Η πλειονότητα των πράσινων θειούχων βακτηρίων χρησιμοποιούν ανηγμένες ενώσεις θείου ως ηλεκτρονιοδότες στη φωτοσυνθετική τους διαδικασία. Συγκεκριμένα, το παρόν στέλεχος *Chlorobaculum tepidum* χρησιμοποιεί θειούχα ( $S^{2-}$ ), θειοθειικά ( $S_2O_3^{2-}$ ) άλατα και στοιχειακό θείο ( $S^0$ ) ως ηλεκτρονιοδότες. Λόγω της πληθώρας των ενζύμων που συμμετέχουν στην διαδικασία του μεταβολισμού των ενώσεων του θείου, αυτή καθίσταται ασαφής. Ένα προτεινόμενο μοντέλο της διαδικασίας αυτής παρουσιάζεται στην εικόνα 10. (Frigaard, N-U ; Dahl, C, 2009)

Τα πράσινα θειούχα βακτήρια δημιουργούν μικροσκοπικά, αλλά διακριτά, σφαιρίδια θείου ως ενδιάμεσα της οξειδωσης των θειούχων αλάτων. Τα σφαιρίδια αυτά εντοπίζονται στον εξωκυττάριο χώρο και παραμένουν εκεί όσο εξακολουθεί να είναι διαθέσιμη η ανηγμένη πηγή θείου από την οποία έχουν προκύψει. Όταν αυτή μειώνεται, τότε τα σφαιρίδια οξειδώνονται πλήρως σε θειικά ιόντα. Ωστόσο δεν είναι ακόμα γνωστοί οι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργούνται και διασπώνται τα σφαιρίδια αυτά.

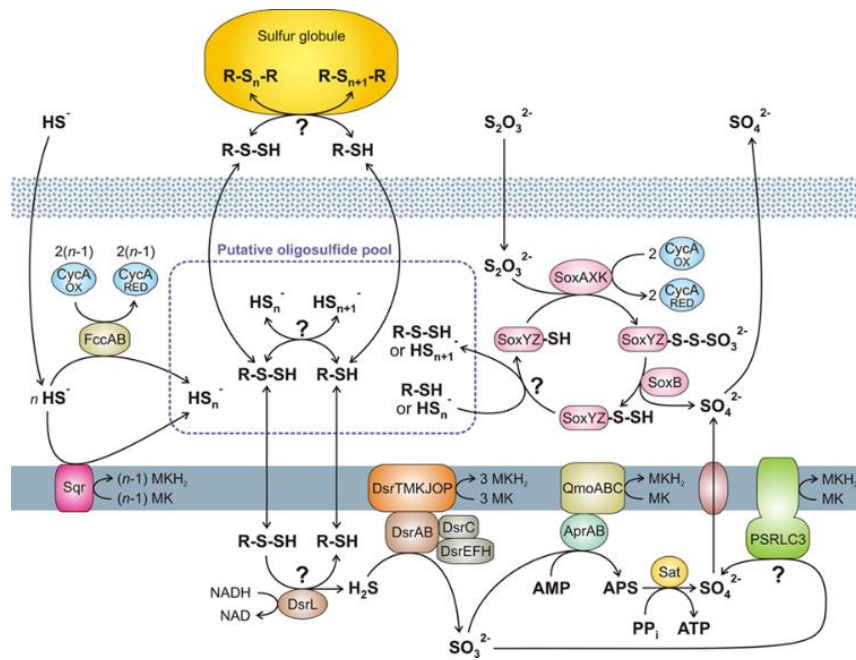
Η ακριβής μοριακή δομή αυτού του θείου πιστεύεται πως είναι μεγάλες αλυσίδες πολυσουλφανίων, με μηδενικό φορτίο και τερματίζονται με οργανικά κατάλοιπα. (Frigaard, 2009)

Σχεδόν όλα τα πράσινα θειούχα βακτήρια που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με ενώσεις θείου, περιέχουν γονίδια *dsr*. Επί της ουσίας, τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένα ανόμοιο σύστημα αναγωγής θειώδων αλάτων (*dissimilatory sulfite reductase system*), που είναι ομόλογο με αυτό που διαθέτουν τα βακτήρια που ανάγουν θειικά άλατα, με την σημαντική διαφορά ότι το σύστημα αυτό λειτουργεί προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Στο *Chlorobaculum tepidum*, τα *dsr* γονίδια χωρίζονται σε δύο ομάδες, και συγκεκριμένα στις *dsrNCABL6TMKJOP89* (CT2251–2238) και *dsrCABLEFH* (CT0851–0857), έτσι ώστε το γονίδιο *dsrCABL* να διπλασιάζεται. Έχει αποδειχθεί ότι στο συγκεκριμένο βακτήριο, το σύστημα *dsr* είναι απαραίτητο για την οξείδωση των σφαιριδίων του θείου. (Eisen, J. A., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Wu, M., Dodson, R. J., Deboy, R., Gwinn, M. L., Nelson, W. C. & other authors, 2002)

Κάποια ένζυμα τα οποία πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην οξείδωση των θειούχων αλάτων στο *Chlorobaculum tepidum* είναι η οξειδοαναγωγή της κινόνης (*quinone oxidoreductase-SQR*) και το φλαβοκυτόχρωμα *c*. Το φλαβοκυτόχρωμα *c-553* καταλύει τη μεταφορά  $2 e^-$  από το  $H_2S$  στο *cyt c*, σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις, με το στοιχειακό θείο ως προϊόν οξείδωσης. Τα μεμβρανικά-συνδεδεμένα ομόλογα της *SQR*, CT0117 και CT1087 καταλύουν την οξείδωση των θειούχων αλάτων μέσα στο κύτταρο. (Chan, L.-K., Morgan-Kiss, R. M. & Hanson, T. E., 2009)

Η οξείδωση των θειοθειικών πραγματοποιείται απ' το σύστημα οξείδωσης θείου (sulfur-oxidation system) Sox. Στο προτεινόμενο μονοπάτι, η χαρακτηριστική ομάδα σουλφονίων του  $S_2O_3^{2-}$  οξειδώνεται σε θειικό άλας και απελευθερώνεται, ενώ η χαρακτηριστική ομάδα σουλφανίων απελευθερώνεται στην υποθετική περιοχή των πρόδρομων ενώσεων του  $S^0$  (putative oligosulfide pool), και έπειτα είτε τοποθετείται στα σφαιρίδια του  $S^0$ , είτε οξειδώνεται σε θειώδες άλας  $SO_3^{2-}$  απ' το σύστημα *dsr*.



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της μεταβολικής πορείας του θείου

## Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανάπτυξης του *Chlorobaculum tepidum* σε θειούχα και θειοθειικά άλατα. Πιο συγκεκριμένα να μελετηθεί η συμπεριφορά της ανάπτυξής του υπό δύο διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά στην πηγή θείου. Στη συνέχεια να αναπτυχθεί ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση του στοιχειακού θείου που παράγει ο οργανισμός, να γίνει παρατήρηση της μορφής αυτού, καθώς και μελέτη για την παρουσία πρωτεϊνών σε αυτό. Τελικός στόχος ήταν η προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης, με φασματομετρία μάζας, των πρωτεϊνών που βρέθηκαν στα δείγματα του απομονωμένου στοιχειακού θείου.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Fluka και Merck. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο (dH<sub>2</sub>O). Επίσης για την παρασκευή ορισμένων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό (nanopure H<sub>2</sub>O).

### **Ρυθμιστικό διάλυμα TT (ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης)**

- 20 mM Tricine
- 1 mM Benzamidine
- 1 mM 6-amino-caproic acid
- Διάλυμα Trizma Base 1M έως pH=7,5

### **Πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE**

Protein	Molecular weight (Da)	Wide Range
Myosin from porcine heart	200.000	x
B-Galactosidase from E.coli	116.000	x
Phosphorylase b from rabbit muscle	97.000	x
Albumin bovine serum	66.000	x

Glutamic Dehydrogenase from bovine liver	65.000	x
Ovalbumin from chicken egg	45.000	x
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from rabbit muscle	36.000	x
Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes	29.000	x
Trypsinogen from bovine pancreas	24.000	x
Trypsin inhibitor from soybean	20.000	x
$\alpha$ -Lactalbumin from bovine milk	14.200	x
Aprotin from bovine lung	6.500	x

Πίνακας 2. Πρότυπες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στην SDS-PAGE

### Διαλύματα παρασκευής πηκτών 1D SDS-PAGE

#### ➤ AB-mix buffer

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

#### ➤ Gel buffer (3x)

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

- Πηκτή επιστοίβαξης (100ml) (4%)

AB-mix 8 ml

Gel-buffer 25 ml

Nanopure έως τα 100ml

APS 750μl

TEMED 75μl



- **Πηκτή διαχωρισμού (300ml)** (10%)

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

➤ **Anode buffer**

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

➤ **Cathode buffer**

- Trizma Base 1M
- Tricine Base 1M
- SDS 1,0% (w/v)
- pH=8,25 (χωρίς προσθήκη HCl)

➤ **Sample buffer**

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

➤ **Sample buffer-mercaptoethanol free**

- SDS 12% (w/v)
- Glycerol 10% (w/v)
- Coomassie Blue G250 0,05% (w/v)

- Tris-HCl, pH=7.0      150mM

➤ **Διάλυμα χρώσης πηκτών (Blue Silver)**

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

➤ **Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτών**

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

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*

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

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50gr
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	0.50gr
NH <sub>4</sub> Cl	0.40gr
NaCl	0.40gr
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.20gr
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.050gr
EDTA	0.0125gr
NaHCO <sub>3</sub>	2.0gr
Μείγμα Ιχνοστοιχείων	1ml
Βιταμίνη B <sub>12</sub> (20mg/lt)	2ml

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που απαιτούνται για καλλιέργεια 1 Lt του *Chlorobaculum tepidum*

Αναλυτικότερα, για την δημιουργία του μείγματος ιχνοστοιχείων, οι ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 4 διαλύονται σε 1lt απιονισμένου νερού.

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

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια που απαιτούνται για 1lt μείγματος ιχνοστοιχείων

Βάση της επιθυμητής συνθήκης καλλιέργειας χρησιμοποιούνται οι πηγές θείου που αναφέρονται στον πίνακα 5.

Συνθήκη	Πηγή θείου	Συγκέντρωση (mM)
1	Na <sub>2</sub> S + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O	7,7 (Na <sub>2</sub> S) 8 (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O)
2	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5H <sub>2</sub> O	7,7
3	Na <sub>2</sub> S	8

Πίνακας 5. Συνθήκες ανάπτυξης του *Chlorobaculum terpidum* βάση της πηγής θείου που χρησιμοποιείται

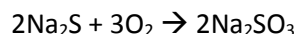
Για την δημιουργία 1lt καλλιέργειας οι παραπάνω ενώσεις του πίνακα 1 διαλύονται σε 1lt απιονισμένου νερού και το διάλυμα αναδεύεται συνεχώς, έως ότου να μην υπάρχουν αδιάλυτα στερεά υπολείμματα. Στο σημείο αυτό να τονιστεί πως αν το αντιδραστήριο Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O περιλαμβάνεται στις επιθυμητές συνθήκες ανάπτυξης, τότε αυτό προστίθεται στο σημείο αυτό, σε συγκέντρωση 8mM.

Στη συνέχεια 800ml του διαλύματος αυτού, μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας του 1lt, και ακολουθεί αποστείρωση για 20 min στους 120°C. Έπειτα, αφού το διάλυμα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται στο στόμιο της φιάλης parafilm και πραγματοποιείται απαέρωση μέσω διαβίβασης αερίου CO<sub>2</sub> για 40 min. Η χρήση του parafilm γίνεται με σκοπό την αποφυγή εισχώρησης ατμοσφαιρικού οξυγόνου μετά την απαέρωση, καθώς όταν αυτή πραγματοποιηθεί η φιάλη σφραγίζεται με ειδικό

καπάκι. Οι διαδικασίες που ακολουθούν μετά τη σφράγιση της φιάλης, πραγματοποιούνται με τη χρήση αποστειρωμένων συριγγών.

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

Τέλος γίνεται προσθήκη 20ml βακτηρίων (προκαλλιέργεια) και η καλλιέργεια τοποθετείται στο σκοτάδι overnight, έτσι ώστε το περισσευούμενο οξυγόνο να καταναλωθεί απ' το H<sub>2</sub>S, όπως προκύπτει από την παρακάτω αντίδραση.



Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 47-49°C, υπό πλήρη φωτισμό για μία περίπου μέρα. (Wahlund, T.M ; Woese, C.R ; Castenholz, R.W ; Madigan, M.T ;, 1991) Η πλήρης ανάπτυξη των βακτηρίων διαπιστώνεται από την αλλαγή του χρώματος του περιεχομένου της φιάλης από ανοικτό πράσινο σε σκούρο πράσινο. Η φιάλη απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και φυλάσσεται στους 4°C, για περεταίρω επεξεργασία.

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

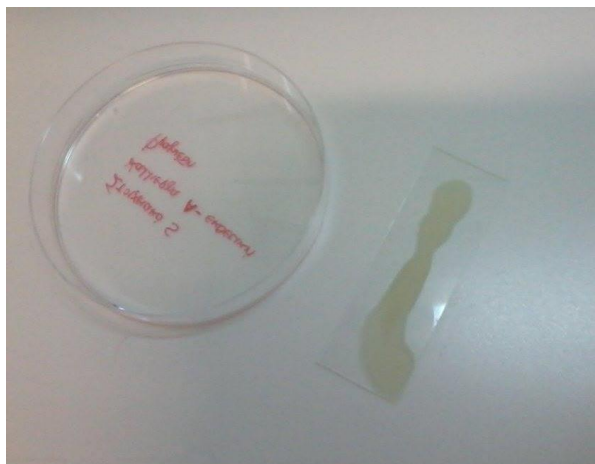
Αρχικά 1 ml καλλιέργειας φυγοκεντρείται στα 13000 g για 15 min. Το υπερκείμενο που προκύπτει συλλέγεται με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση του με ιοντική χρωματογραφία. Το ίζημα που περιέχει βακτηριακά κύτταρα και στοιχειακό θείο, εκχυλίζεται με 1 ml μεθανόλης (Stanier, R. Y., Smith, J. H. C., 1960) και πραγματοποιείται μια δεύτερη φυγοκέντρωση στα 13000 g για 15 min. Τέλος συλλέγεται το υπερκείμενο με σκοπό την περεταίρω ανάλυσή του με φασματοφωτομετρία απορρόφησης ορατού – υπεριώδους (UV-Vis).

### 2.2.3 Απομόνωση εκκρινόμενου στοιχειακού θείου

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

Έτσι, συλλέγεται προσεκτικά το ίζημα του στοιχειακού θείου και στη συνέχεια ακολουθεί επαναδιάλυση αυτού σε ρυθμιστικό διάλυμα TT, και φυγοκέντρωση σε 5000rpm για 20min. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στον διαχωρισμό του κίτρινου τμήματος του ιζήματος, όπου αποτελεί το στοιχειακό θείο, από το πράσινο τμήμα, όπου αποτελεί τα βακτηριακά κύτταρα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές, μέχρι το ίζημα που θα προκύψει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις με κύτταρα.

Τέλος το απομονωμένο στερεό αφήνεται να στεγνώσει και φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να γίνει περεταίρω επεξεργασία του.



Εικόνα 11. Δείγμα απομονομένων σφαιριδίων στοιχειακού θείου

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

Για τη μελέτη του απομονωμένου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας LDI-TOF, κόκκοι δείγματος διαλυτοποιούνται σε μεθανόλη. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται πάνω στην ειδική θέση του στόχου.

Για τη μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης κόκκοι δείγματος τοποθετούνται σε μια ταινία άνθρακα, η οποία εισάγεται στο μικροσκόπιο.

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

Το απομονωμένο ίζημα του στοιχειακού θείου διαλύεται σε Sample buffer, και αντίστοιχα σε Sample buffer-mercaptoethanol free, ώστε να προκύψει μείγμα 5% (w/v). Ακολουθεί επεξεργασία για 10 min σε υπέρηχους, επώαση για 30 min στους 37°C, καθώς και φυγοκέντρηση σε 13000 g για 10 sec, ώστε να καταβυθιστεί η μη διαλυτοποιημένη ποσότητα του στοιχειακού θείου. Τα τελευταία τρία βήματα πραγματοποιούνται συνολικά δύο φορές.

Ακολουθεί ανάλυση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα παραπάνω μείγματα, με SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

#### 2.2.6 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

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

- Τα στίγματα των πρωτεϊνών αποκόπτονται από τις πηκτές σε μικρά κομμάτια (1x1cm)

- Ακολουθεί αποχρωματισμός με ACN (50% v/v) και ABS (Ammonium bisulfate) (50mM), με τρεις πλύσεις εναλλάξ διάρκειας 15min η καθεμία.
- Η αναγωγή των ξηραμένων πηκτών πραγματοποιείται με 10 mM DTT (1,4-dithiothreitol) σε διάλυμα 50 mM ABS και ακολουθεί επώαση για 45min στους 56°C.
- Η αλκυλίωση γίνεται με 55 mM ιωδοακεταμίδιο σε διάλυμα 50mM ABS για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
- Στη συνέχεια τα κομμάτια της πηκτής πλένονται με 50 mM ABS και με 50% ACN, επαναλαμβάνοντας ουσιαστικά τη διαδικασία που ακολουθείται και στο αποχρωματισμό.
- Πριν την προσθήκη της θρυψίνης πραγματοποιείται αφυδάτωση των κομματιών της πηκτής με 100% ACN για 15min.
- Στα αφυδατωμένα κομμάτια της πηκτής προστίθενται 25-30 μl του ρυθμιστικού διαλύματος της πρωτεόλυσης το οποίο περιέχει 20 μg θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου και αφήνονται για 30-90min σε πάγο.
- Κατόπιν επωάζονται για 14-16 ώρες στους 37°C.
- Την επόμενη μέρα τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής ανακτώνται με διαδοχικά βήματα ένωσης των υπερκειμένων που προκύπτουν από δύο διαδοχικές επώσεις διάρκειας 30min, αρχικά σε διάλυμα 50% ACN/0,1% TFA και έπειτα σε διάλυμα 100% ACN.
- Το συνολικό διάλυμα που προκύπτει ξηραίνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια που σχηματίζονται τοποθετούνται στους -4°C μέχρι την τοποθέτησή τους στον στόχο (Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen J. V., Mann, M., 2006)

## 2.2.7 Αναλυτικές μέθοδοι

### 2.2.7.1 Φασματομετρία Μοριακής Απορρόφησης Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)

Η φασματομετρία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας  $T$ , ή της απορρόφησης  $A$  διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής  $b$  cm. Συνήθως, η συγκέντρωση  $c$  ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση

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

Όπου:

$P_0$ , η ακτινοβολούμενη ισχύς

$P$ , η διερχόμενη ακτινοβολία

$A$ , η απορρόφηση  $\log(P_0/P)$

$T$ , η διαπερατότητα ( $P/P_0$ )

$b$ , το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας

ς, η συγκέντρωση της ουσίας που απορροφεί

ε, η γραμμομοριακή απορροφητικότητα

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

Η διαπερατότητα και η απορρόφηση δεν μπορούν να μετρηθούν στο εργαστήριο με τον τρόπο που ορίστηκαν παραπάνω. Ο λόγος είναι ότι το δείγμα του διαλύματος πρέπει να τοποθετηθεί σε ένα δοχείο με τοιχώματα διαπερατά στο φως, την κυψελίδα. Στη συνέχεια, μια δέσμη παράλληλης μονοχρωματικής ακτινοβολίας ισχύος  $P_0$  προσπίπτει κάθετα στην επιφάνεια της κυψελίδας και διανύοντας μια διαδρομή, μήκους  $b$ , μέσα στο δείγμα που περιέχει τα απορροφούντα μόρια, η ισχύς μειώνεται. Τελικά η τιμή της  $P$  εκφράζει το αποτέλεσμα απορρόφησης. Λαμβάνοντας υπόψη το σφάλμα της απορρόφησης που προκύπτει από την απορρόφηση της επιφάνειας της κυψελίδας, ύστερα από μαθηματικούς υπολογισμούς, προκύπτει η τελική σχέση

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

που αποτελεί την μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer σύμφωνα με την οποία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογης της συγκέντρωσης. (Skoog, 2007)

#### 2.2.7.1.1 Το φασματοφωτόμετρο

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων ήταν διπλής δέσμης. Η διαφορά των φασματοφωτόμετρων διπλής δέσμης και των φασματοφωτόμετρων μονής δέσμης είναι ότι στα πρώτα, η ακτινοβολία διέρχεται μέσω του δείγματος και του αναφορικού (λευκού), κατευθυνόμενο από ένα περιστρεφόμενο κάτοπτρο. Όταν η ακτινοβολία διέρχεται μέσω του δείγματος, ο ανιχνευτής μετρά την ένταση της διερχόμενης ακτινοβολίας  $P$ . Όταν το περιστροφικό κάτοπτρο κατευθύνει την ακτινοβολία προς την κυψελίδα αναφοράς, ο ανιχνευτής μετράει την διερχόμενη ακτινοβολία  $P_0$ . Έτσι συγκρίνεται συνεχώς η  $P$  και η  $P_0$  ακτινοβολία με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται συνεχής και αυτόματη διόρθωση για μεταβολές στην ένταση της πηγής ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται, και την απόκριση του ανιχνευτή ως προς το χρόνο και το μήκος κύματος. (Harris D. C., 2010)

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

Για εργασία στην περιοχή του υπεριώδους, απαιτούνται κυψελίδες από χαλαζία ή τηγμένη πυριτία, ενώ για την περιοχή του ορατού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πλαστικές κυψελίδες ή απλή πυριτική ύαλος. (Skoog, 2007) Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία.

2.2.7.1.2 Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου *Chlorobaculum terpidum* με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)

Τα δείγματα, των οποίων η πορεία επεξεργασίας περιγράφηκε σε παραπάνω ενότητα, τοποθετούνται σε κυψελίδα χαλαζία και μετράται η απορρόφηση αυτών στα εξής μήκη κύματος: 669nm, 295nm. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Stal, 1984) για το ρυθμό της ανάπτυξης του βακτηρίου, μετράται η απορρόφηση της βακτηριοχλωροφύλλης *c* στα 669nm, ενώ η απορρόφηση του θείου που παράγεται σαν μεταβολικό ενδιάμεσο από τον οργανισμό μετράται στα 265nm.

#### 2.2.7.2 Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία χημικές ενώσεις διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος αλλά και την μάζα τους. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην δημιουργία ιόντων στην αέρια φάση, στον διαχωρισμό αυτών σε έναν αναλυτή μαζών και τέλος στην ανίχνευση των ιόντων αυτών βάση του λόγου μάζας/φορτίο ( $m/z$ ).

Όλα τα φασματόμετρα μάζας αποτελούνται από τα ίδια τμήματα, όπου είναι τα εξής:

- Ένα σύστημα υψηλού κενού: Αυτό το σύστημα περιλαμβάνει στροβιλομοριακές αντλίες, αντλίες διάχυσης και περιστροφικές αντλίες
- Ένα σημείο εισόδου του δείγματος: Αυτό περιλαμβάνει μια πλάκα τοποθέτησης των δειγμάτων ή ένα σύστημα χρωματογραφίας
- Μια πηγή ιοντισμού (ώστε τα μόρια του αναλύτη να μετατραπούν σε ιόντα στην αέρια φάση): Ο ιοντισμός μπορεί να πραγματοποιείται μέσω εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα, με ηλεκτροψεκασμό, με χημικό ιοντισμό αμοτμοσφαιρικής πίεσης κλπ
- Έναν αναλυτή μαζών: Αυτός μπορεί να είναι αναλυτής μαζών χρόνου πτήσεως, τετράπολα, παγίδα ιόντων κλπ
- Έναν ανιχνευτή: Αυτός μπορεί να είναι ένας πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων κλπ

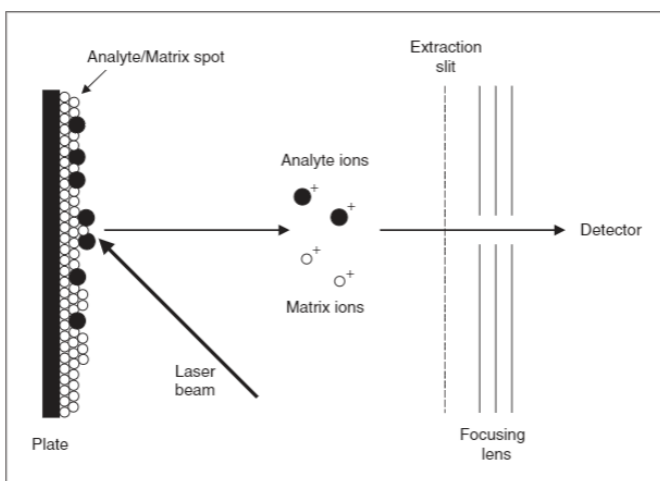
Ανάλογα με το προς ανάλυση δείγμα χρησιμοποιούνται διαφορετικά φασματόμετρα μάζας. (Wilson)

#### 2.2.7.2.1 Φασματομετρία μάζας LDI-TOF (MALDI-TOF MS)

Οι κυριότερες μέθοδοι εισαγωγής των πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στο φασματόμετρο μάζας, είναι ο ηλεκτροψεκασμός και ο ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (MALDI). Συνήθως η τεχνική MALDI χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσεως (TOF). (Harris D. C., 2010) Το ιδιαίτερο πλεονέκτημα του MALDI είναι η ικανότητα να παράγει ιόντα με μεγάλη μάζα, με υψηλή ευαισθησία. Το MALDI είναι μέθοδος ήπιου ιοντισμού που δεν παράγει υπερβολικές ποσότητες θραυσμάτων σε σύγκριση με κάποιες άλλες μεθόδους ιοντισμού. Καθώς λοιπόν τα ιόντα που παράγονται προκύπτουν από ήπιο



ιοντισμό, η μέθοδος αυτή αποτελεί μια πολύτιμη τεχνική για την ανάλυση μειγμάτων. (Wilson) Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, για την εισαγωγή των ιόντων στην αέρια φάση του φασματόμετρου, κατευθύνεται στο δείγμα ένας σύντομος παλμός υπέρυθρης ή υπεριώδους ακτινοβολίας λέιζερ. Η μήτρα εξατμίζεται και εξαπλώνεται στην αέρια φάση. Ο μεγάλος λόγος μήτρας/δείγματος αποτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του αναλύτη και παρέχει πρωτονιωμένα ή ιοντισμένα μόρια τα οποία μεταφέρουν φορτία στον αναλύτη και τα περισσότερα από αυτά είναι μονοσθενή. Λίγο μετά την εξαπλωση των ιόντων μέσα στην πηγή, εφαρμόζεται ένας παλμός δυναμικού στην πίσω πλάκα, ο οποίος ωθεί τα φορτισμένα ιόντα προς το φασματόμετρο. (Harris D. C., 2010)



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας ιόντων σε φασματόμετρο MALDI

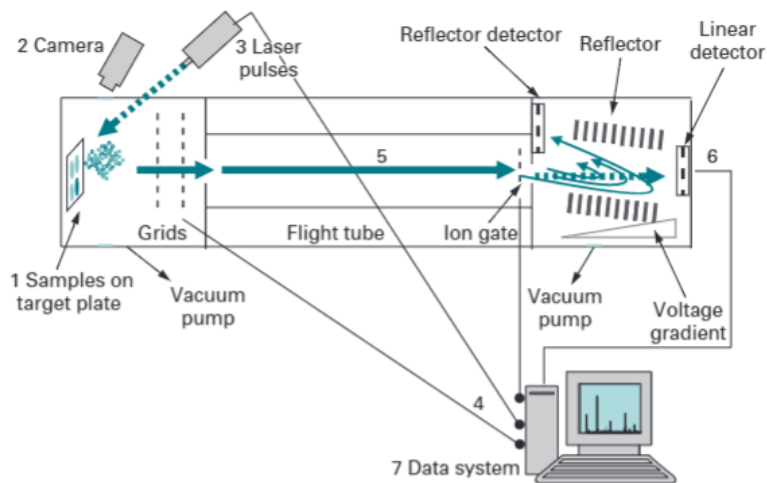
Το φασματόμετρο στην περίπτωση αυτή είναι χρόνου πτήσεως, και αποτελεί τον καλύτερο αναλυτή μαζών ο οποίος μπορεί να συζευχθεί με το MALDI.

Στο σημείο αυτό, τα ιόντα που έχουν προκύψει από την πηγή ιοντισμού, σε ιδεώδεις συνθήκες, έχουν όλα την ίδια κινητική ενέργεια, η οποία είναι  $\frac{1}{2}mv^2$  όπου  $m$  είναι η μάζα του ιόντος και  $v$  ταχύτητα.

Εάν τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, αλλά διαφορετικές μάζες, τα ελαφρύτερα μετακινούνται γρηγορότερα από τα βαρύτερα. Στην απλούστερη μορφή του ένα φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσεως είναι απλώς ένας μακρύς ευθύγραμμος σωλήνας υπό κενό με την πηγή στο ένα άκρο και τον ανιχνευτή στο άλλο άκρο. Τα ιόντα που φεύγουν από την πηγή φθάνουν στον ανιχνευτή ανάλογα με την μάζα τους, καθώς τα ελαφρύτερα ιόντα κινούνται πιο γρήγορα.

Για να αυξηθεί η διαχωριστική ισχύς, τα ιόντα αναγκάζονται από έναν 'ανακλαστή να γυρίσουν πίσω. Ο 'ανακλαστής' είναι μια σειρά από κοίλους δακτυλίους στους οποίους εφαρμόζεται αυξανόμενο θετικό δυναμικό και καταλήγει σε ένα πλέγμα που το δυναμικό του είναι περισσότερο θετικό από το δυναμικό της επιτάχυνσης στο πίσω ηλεκτρόδιο της πηγής. Τα ιόντα

που εισέρχονται στον ανακλαστή επιβραδύνονται, σταματούν και ανακλώνται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Όσο μεγαλύτερη κινητική ενέργεια είχαν στην αρχή τα ιόντα τόσο περισσότερο θα προχωρήσουν πριν γυρίσουν πίσω. Τα ανακλώμενα ιόντα φθάνουν σε ένα νέο χωρικό εστιακό επίπεδο στο πλέγμα μπροστά από τον ανιχνευτή. Όλα τα ιόντα με την ίδια μάζα φθάνουν σε αυτό το πλέγμα την ίδια χρονική στιγμή, ανεξάρτητα από την αρχική κινητική τους ενέργεια. (Harris D. C., 2010)



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου LDI-TOF

### 2.2.7.3 Μέθοδοι χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία κατά IUPAC ορίζεται ως η φυσική μέθοδος διαχωρισμού, στην οποία προκειμένου να διαχωριστούν τα συστατικά ενός μείγματος, αυτά κατανομούνται μεταξύ δύο διακριτών φάσεων. Η πρώτη από αυτές τις φάσεις ονομάζεται στατική φάση και η άλλη ονομάζεται κινητή φάση. Γενικά στη χρωματογραφία, ένα δείγμα που περιέχει ένα μείγμα μορίων τοποθετείται πάνω σε μια στατική φάση (η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή ή υγρή). Μία κινητή φάση (που μπορεί να είναι είτε υγρή ή αέρια) διέρχεται μέσα ή πάνω από τη στατική φάση, η οποία προκαλεί το δείγμα να κινηθεί κατά μήκος της στατικής φάσης. Οι διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των μεμονωμένων μορίων που περιέχονται στο δείγμα επιτρέπουν στα συστατικά να διαχωριστούν επειδή μεταναστεύουν κατά μήκος της στατικής φάσης με διαφορετικούς ρυθμούς. (Gault, V. A., McClenaghan, N. H. , 2009)

#### 2.2.7.3.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

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

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

Αυτό που συμβαίνει σε μια ανιοντοανταλλακτική στήλη είναι ότι αφού το δείγμα διαβιβαστεί μέσω της στήλης, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα του δείγματος αλληλεπιδρούν με τις θετικώς φορτισμένες λειτουργικές ομάδες της ρητίνης, με αποτέλεσμα έτσι να κατακρατούνται από την στήλη. Τα ουδέτερα ή θετικά φορτισμένα μόρια διαπερνούν τη στήλη με γρηγορότερο ρυθμό, καθώς αυτά δεν αλληλεπιδρούν με τις θετικώς φορτισμένες ομάδες της ρητίνης, και έτσι δεν κατακρατούνται από την στήλη. Σε αυτό το σημείο ο διαχωρισμός έχει επιτευχθεί, και το μόνο που απαιτείται είναι να εκλουσθούν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια που βρίσκονται στην ρητίνη. Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης ή με αυξημένη ιοντική ισχύ ή pH. (Gault, V. A., McClenaghan, N. H. , 2009)

Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται ανίχνευση και μέτρηση της συγκέντρωσης τωνθειικών ιόντων ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) της υγρής καλλιέργεια του θειοβακτηρίου *Chlorobaculum tepidum* και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ανιοντική χρωματογραφία.

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

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

- Κινητή φάση: χρησιμοποιούνται άλατα Na ασθενών οξέων αφού ο καταστολέας τα μετατρέπει σε ουδέτερα ελεύθερα οξέα. Η πιο συνηθισμένη κινητή φάση για το διαχωρισμό ανιόντων είναι το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων.
- Στατική φάση: η στατική φάση που βρίσκεται μέσα στη στήλη διαχωρισμού, αποτελείται απ' το υλικό πλήρωσής της, και συνήθως είναι ρητίνες ιονανταλλαγής. Οι ρητίνες ιονανταλλαγής αποτελούνται από ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα, τις δραστικές ιονανταλλακτικές ομάδες (functional groups) και τα αντισταθμιστικά ιόντα αντίθετου φορτίου προς τις ιονανταλλακτικές ομάδες (counter ions) που κινούνται ελεύθερα μέσα στον ιονανταλλάκτη. Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιούνται πολυμερή τα οποία σχηματίζονται με τον συμπολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου το συμπολυμερές αυτό είναι σταθερό σε pH= 0-14, επιτρέποντας τη μετατροπή μη ιοντικών ενώσεων σε ιοντικές έτσι ώστε να μπορούν να αναλυθούν με ιοντική χρωματογραφία. Σαν δραστική ομάδα στην ανιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιείται το τεταρτοταγές αμμώνιο  $-\text{N}^+(\text{R})_3$ .

- Αντλία: οι αντλίες μπορεί να είναι μονού ή διπλού εμβόλου, ισοκρατικές ή βαθμιδωτές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η αντλία Dionex GP50 gradient pump.
- Ανιχνευτής: χρησιμοποιείται αγωγιμομετρικός ανιχνευτής της εταιρείας Dionex CD20, ο οποίος αποκρίνεται στη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου ιόντος, ενώ η περιοχή γραμμικότητάς του καλύπτει 5 τάξεις μεγέθους συγκεντρώσεων γι' αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτική ανάλυση.
- Στήλη: η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex AS4A-SC 4mm.
- Προστήλη: η προστήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex AG4A-SC 4mm.
- Καταστολέας: ο καταστολέας που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex ASRS ULTRA II 4mm
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Marathon Autosampler
- Διάλυμα έκλουσης: χρησιμοποιήθηκε μίγμα όξινου ανθρακικού νατρίου/ανθρακικού νατρίου ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20M, μαζί με νερό σε αναλογία 50% απ' το καθένα.
- Ροή: 1,5 ml/min

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

#### 2.2.7.4 Μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών – Ηλεκτροφόρηση

Ένα μόριο με καθαρό φορτίο μετακινείται παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Το φαινόμενο αυτό λέγεται ηλεκτροφόρηση και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο διαχωρισμού πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων. Η ταχύτητα με την οποία το κάθε μακρομόριο κινείται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο του μακρομορίου (z), καθώς και από τον συντελεστή τριβής (f). Αυτό προκύπτει από την μαθηματική σχέση

$$u = \frac{Ez}{f}$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη  $Ez$  που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο, είναι αντίθετη της τριβής  $fu$  που αναπτύσσεται μεταξύ του φορτισμένου μορίου και του μέσου διαχωρισμού. Ο συντελεστής τριβής  $f$  εξαρτάται από τη

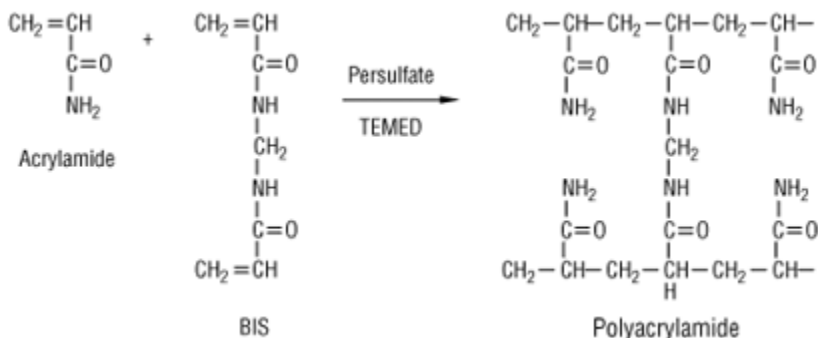
μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από το ιξώδες η του μέσου διαχωρισμού. Για μια σφαίρα με ακτίνα  $r$  ισχύει η σχέση

$$f = 6\pi\eta r$$

Στην ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται σχεδόν πάντοτε ως μέσο διαχωρισμού η πηκτή, διότι λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει τον διαχωρισμό. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με του πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου αυτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μετακινούνται πολύ δυσκολότερα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. (Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer L., 2014)

#### 2.2.7.4.1 SDS - Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να μετατοπίζονται από το αρνητικό στο θετικό ηλεκτρόδιο, και στην πράξη συνήθως από πάνω προς τα κάτω. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι το πολυακρυλαμίδιο είναι χημικά ουδέτερο και το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με μικρή ποσότητα μιας ουσίας που προκαλεί τη δημιουργία ελευθέρων ριζών όπως το υπερθειικό αμμώνιο (APS) και προστίθεται με τον καταλύτη, N,N, τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού.



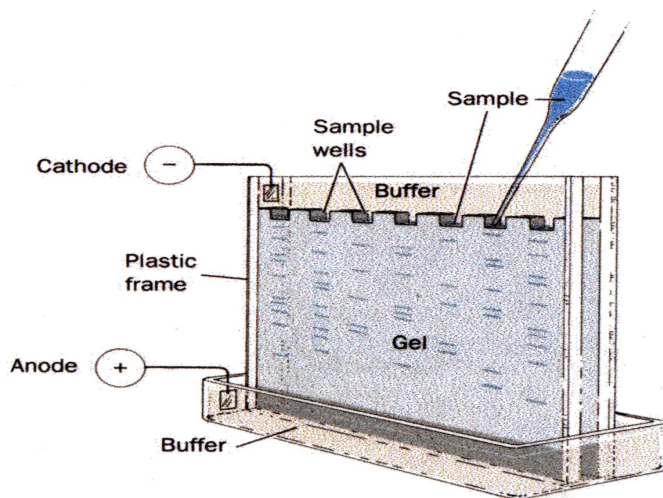
Εικόνα 14. Αντίδραση σχηματισμού πολυακρυλαμιδίου

Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνήθεις αποδιάταξης, οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν κυρίως βάση της μάζας τους. Το μείγμα των πρωτεϊνών διαλύεται πρώτα σε διάλυμα δωδεκακυλο-θειικού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των φυσικών πρωτεϊνών. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες, σε αναλογία ένα μόριο SDS ανά δύο αμινοξέα. Το αρνητικό φορτίο που προκύπτει από την πρόσδεση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το ίδιο το φυσικό φορτίο της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα, το σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη έχει ένα μεγάλο καθαρό αρνητικό

φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Στην πραγματικότητα, η σχετική κινητικότητα κάθε ανιονικής αποδιαταγμένης αλυσίδας πολυπεπτιδίου, είναι μια λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού του βάρους.

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος εφαρμογής της μεθόδου περιλαμβάνει το σχηματισμό της πηκτής στον κενό χώρο που διαμορφώνεται μεταξύ δύο ορθογώνιων τζαμιών τα οποία κρατούνται σε απόσταση με τη βοήθεια συνθετικών διαχωριστικών (spacers) ανάλογου πάχους. Η πηκτή αποτελείται από την πηκτή επιστοιβάξης και την πηκτή διαχωρισμού. Τα διαχωριστικά εξασφαλίζουν ομοιόμορφο πάχος σε όλη την έκταση της πηκτής το οποίο ποικίλει από 0,5 έως 2,0 mm. Ένα πλαστικό 'κτένι' εισέρχεται στο πάνω μέρος του διαλύματος της πηκτής (πριν αυτό πολυμεριστεί) το οποίο αφαιρείται όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός διαμορφώνοντας τις θέσεις που θα τοποθετηθούν τα προς διαχωρισμό διαλύματα που περιέχουν τα σύμπλοκα SDS – αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών.

Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Η όλη διάταξη που περιγράφηκε παραπάνω τοποθετείται μέσα στη δεξαμενή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, τα σύμπλοκα SDS – αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης τοποθετούνται στα 'πηγάδια' / θέσεις στην κορυφή της πηκτής και εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα. Αρχικά οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται στην πηκτή επιστοιβάξης, η οποία έχει συγκέντρωση 4% ακρυλαμιδίου/δισ ακρυλαμιδίου και στη συνέχεια διαχωρίζονται στην πηκτή διαχωρισμού η οποία έχει συγκέντρωση 10% ακρυλαμιδίου/δισ ακρυλαμιδίου με βάση το μοριακό τους βάρος. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, η πηκτή απομακρύνεται από τα τζάμια και τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης και έπειτα σε διάλυμα αποχρωματισμού, ώστε να γίνουν εμφανείς τις ζώνες οι οποίες έχουν δημιουργηθεί πάνω στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.



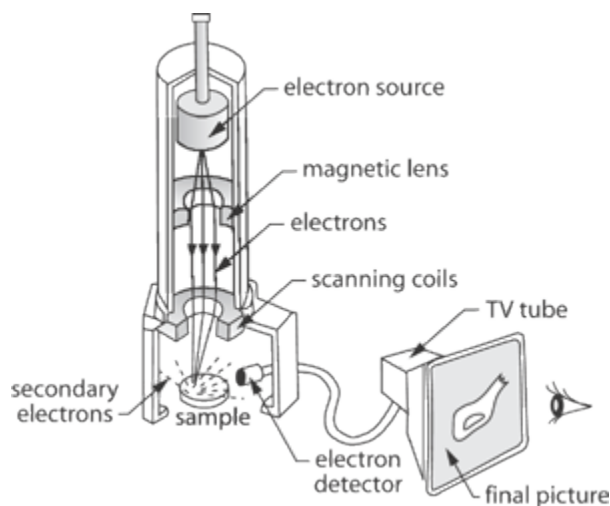
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

#### 2.2.7.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) είναι ένα είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το οποίο χρησιμοποιεί μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, ώστε να σαρώσει την επιφάνεια του δείγματος, και τελικά να δημιουργηθεί μια εικόνα. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι απεικόνισης με αυτού του είδους μικροσκόπια όπως η ανίχνευση δευτερογενών ηλεκτρονίων, η ανίχνευση οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, καθοδοφωταύγειας και χαρακτηριστικών ακτίνων Χ. Ο συνηθέστερος τρόπος απεικόνισης των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων σάρωσης είναι εκείνος της ανίχνευσης των δευτερογενών ηλεκτρονίων χαμηλής ενέργειας. Επι της ουσίας, τα ηλεκτρόνια της δέσμης προσπίπτουν στο δείγμα και αλληλεπιδρώντας, με ανελαστική σκέδαση, με τα άτομα σε αυτό, τα διεγείρουν με αποτέλεσμα να εκπέμπονται τα δευτερογενή ηλεκτρόνια από την στοιβάδα Κ των ατόμων. Η ανίχνευση των ηλεκτρονίων αυτών εξαρτάται, μεταξύ των άλλων, από την μορφολογία και τη σύνθεση της επιφάνειας του δείγματος. Με τη χρήση ειδικού ανιχνευτή για τον προσδιορισμό των δευτερογενών ηλεκτρονίων, προκύπτει τελικά μια εικόνα η οποία απεικονίζει την μορφολογία της επιφάνειας του δείγματος.

Μια πολύ χρήσιμη ανάλυση που μπορεί να επιτευχθεί με ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, είναι η στοιχειακή ανάλυση μέσω χαρακτηριστικών ακτίνων Χ. Οι ακτίνες αυτές παράγονται κατά την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με το δείγμα και η περαιτέρω ανάλυσή τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση της κατανομής και την εκτίμηση της αφθονίας των στοιχείων του δείγματος.

Ένα χαρακτηριστικό τέτοιου τύπου μικροσκοπίων, είναι ότι χρησιμοποιούνται συνθήκες υψηλού κενού, αλλά και στην περίπτωση χαμηλού κενού ή υγρής φύσης του δείγματος χρησιμοποιείται μεταβαλλόμενη πίεση ή ένα ευρύ φάσμα κρυογονικών παραγόντων. Το



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης

### 3. Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 3.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*

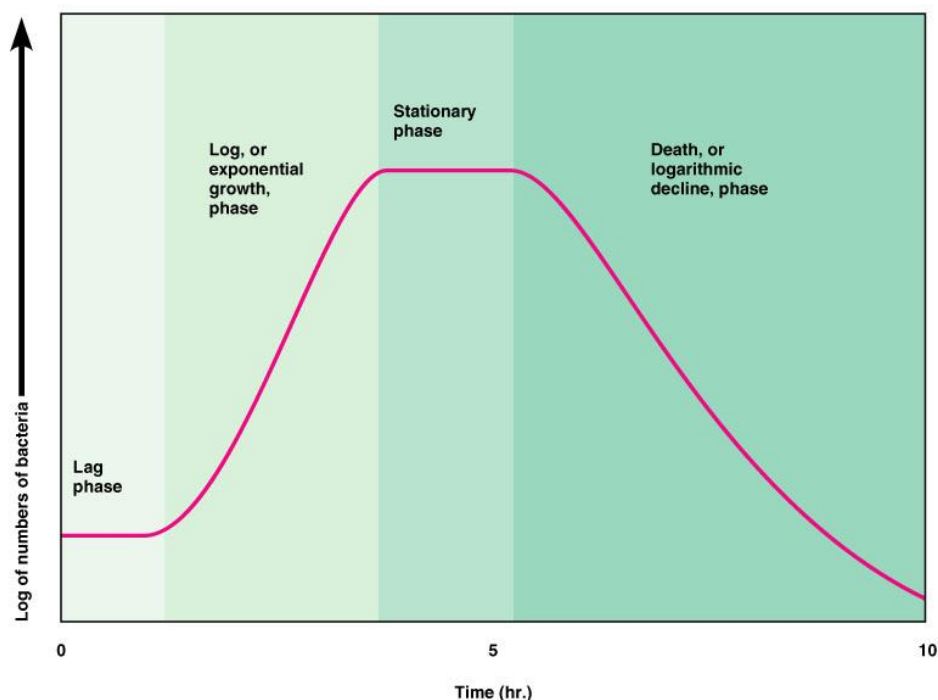
Γενικά η βακτηριακή ανάπτυξη ακολουθεί μια χαρακτηριστική γραφική παράσταση σε συνάρτηση με τον χρόνο, η οποία αποτελείται από τις παρακάτω τέσσερις φάσεις.

Η πρώτη φάση ονομάζεται λανθάνουσα ή φάση υστέρησης. Τα βακτήρια προσαρμόζονται στο μέσο καλλιέργειας και παρατηρείται μικρή ή καμμία ανάπτυξη των κυττάρων.

Η δεύτερη φάση ονομάζεται λογαριθμική ή φάση εκθετικής αύξησης. Τα βακτήρια αναπτύσσονται ταχέως και ο ρυθμός της εκθετικής αύξησης εξαρτάται από τις συνθήκες περιβάλλοντος και από από τα γεννητικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.

Η τρίτη φάση ανάπτυξης ονομάζεται στασιμότητας ή στάσιμη φάση. Δεν παρατηρείται καθαρή αύξηση ή μείωση του αριθμού των κυττάρων.

Τέλος η τέταρτη φάση ονομάζεται θανάτου. Όταν τα θρεπτικά υλικά εξαντληθούν, τα βακτήρια αρχίζουν να πεθαίνουν και ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων μειώνεται.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 17. Γενική γραφική παράσταση βακτηριακής ανάπτυξης



Η ανάπτυξη του *Chlorobaculum tepidum* έγινε σε τρεις διαφορετικές συνθήκες, που αφορούσαν στην πηγή του θείου που ήταν διαθέσιμη.

Οι συνθήκες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου κατά την λογαριθμική φάση είναι η ένταση του φωτισμού, η εκάστοτε πηγή θείου που χρησιμοποιείται, καθώς και η παλαιότητα της προκαλλιέργειας.

Οι φάσεις ανάπτυξης του *Chlorobaculum tepidum* διακρίνονται από την αλλαγή του χρώματος της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, από αριστερά προς τα δεξιά, διακρίνεται καλλιέργεια του βακτηρίου στην λανθάνουσα φάση, στην λογαριθμική φάση και στην φάση στασιμότητας.



Εικόνα 18. Καλλιέργεια του βακτηρίου στην λανθάνουσα φάση, στην λογαριθμική φάση και στην φάση στασιμότητας (από τα αριστερά προς τα δεξιά)

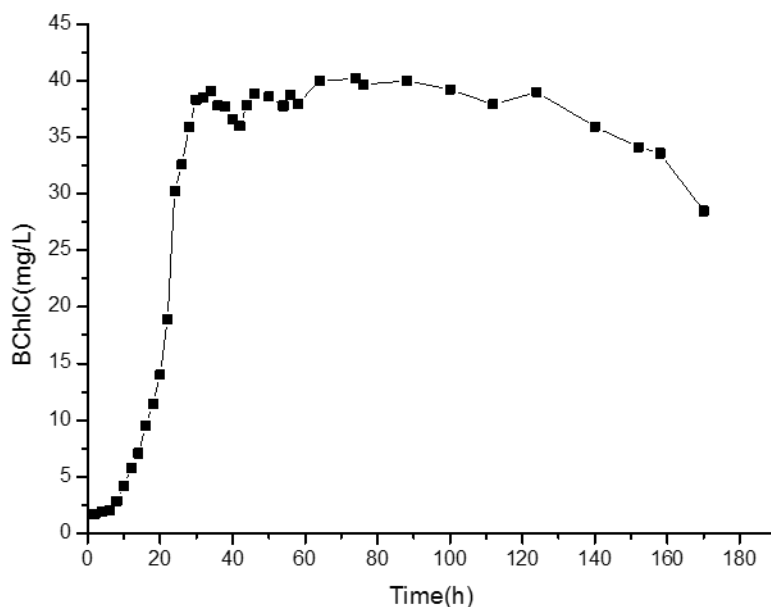
Η αλλαγή του χρώματος, ανάλογα με την φάση στην οποία βρίσκεται κάθε καλλιέργεια, οφείλεται στη βακτηριοχλωροφύλλη που περιέχουν τα κύτταρα της κάθε καλλιέργειας. Αρχικά η συγκέντρωση των κυττάρων, άρα και της βακτηριοχλωροφύλλης, είναι χαμηλή και για αυτό το λόγο το χρώμα είναι ανοιχτό. Με το πέρας του χρόνου η καλλιέργεια παίρνει ένα κίτρινο χρώμα και αυξάνεται η θολερότητά της. Αυτό οφείλεται στην παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης στοιχειακού θείου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο οργανισμός παράγει εξωκυττάρια σφαιρίδια στοιχειακού θείου τα οποία έχουν κίτρινο χρώμα. Παρότι παράλληλα αυξάνεται και η ποσότητα των κυττάρων, άρα και της βακτηριοχλωροφύλλης, το κίτρινο χρώμα είναι πιο έντονο. Στην φάση στασιμότητας παρατηρείται ένα σκούρο πράσινο χρώμα το οποίο μαρτυρά τον μέγιστο αριθμό κυττάρων στην καλλιέργεια. Με προσεκτική παρατήρηση της καλλιέργειας σε αυτή τη φάση, διακρίνεται ακόμα μια μικρή ποσότητα στερεού θείου η οποία έχει κίτρινο χρώμα. Ωστόσο η ποσότητα του θείου είναι μειωμένη σε σχέση με την προηγούμενη φάση ανάπτυξης και αυτό συμβαίνει διότι το βακτήριο εισάγει στο εσωτερικό του το θείο το οποίο έχει παράξει, για να το χρησιμοποιήσει ως δότη ηλεκτρονίων.

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

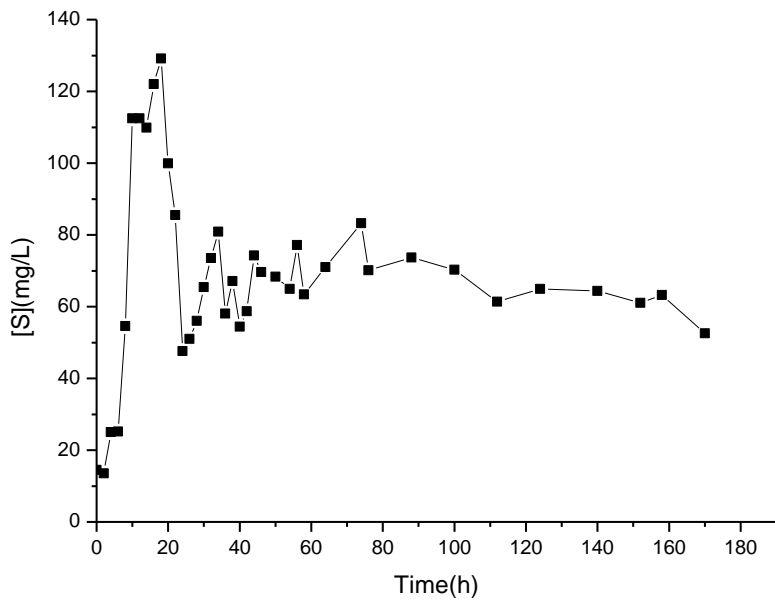
### 3.2 Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*

Με στόχο την παρατήρηση της ανάπτυξης και του μεταβολισμού του *Chlorobaculum tepidum* κατασκευάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης οι οποίες παρουσιάζουν τη μεταβολή της συγκέντρωσης της βακτηριοχλωροφύλλης c και των μεταβολιτών  $S^0$  και  $SO_4^{2-}$  σε συνάρτηση με το χρόνο. Η συγκέντρωση της βακτηριοχλωροφύλλης ήταν αδύνατο να μεταφραστεί σε ακριβή ποσότητα κυττάρων, παρόλαυτα παρατηρήθηκε μια αναλογική μεταβολή της απορρόφησης στην περιοχή του ορατού.

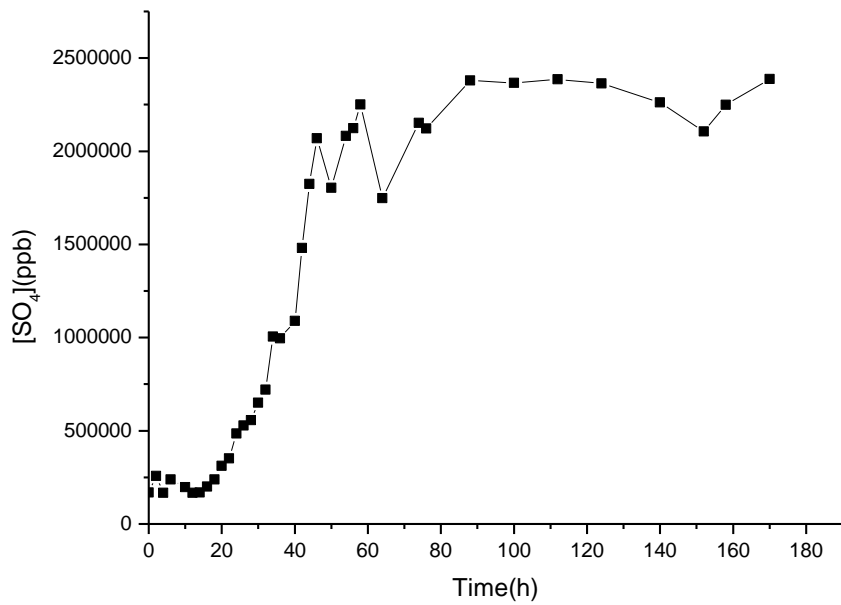
Οι μεταβολίτες  $S^0$  και  $SO_4^{2-}$  μετρήθηκαν με υπεριώδη φασματοφωτομετρία και ιοντική χρωματογραφία αντίστοιχα. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες αναλύθηκαν εκτενέστερα στο πειραματικό μέρος. Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ανάπτυξης που αντιστοιχούν στις συνθήκες 1 και 3. Στην περίπτωση της συνθήκης 2 δεν ήταν δυνατή η δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης, καθώς το βακτήριο δεν παρουσίασε επαναλήψιμη συμπεριφορά ανάπτυξης.



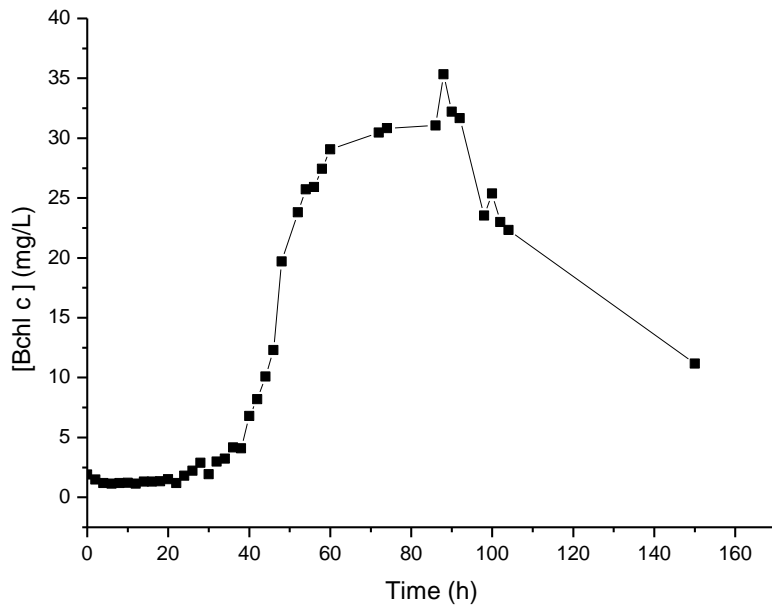
Εικόνα 19. Συγκέντρωση βακτηριοχλωροφύλλης c σε συνάρτηση με το χρόνο κατά την ανάπτυξη του *Chlorobaculum tepidum* στη συνθήκη 1



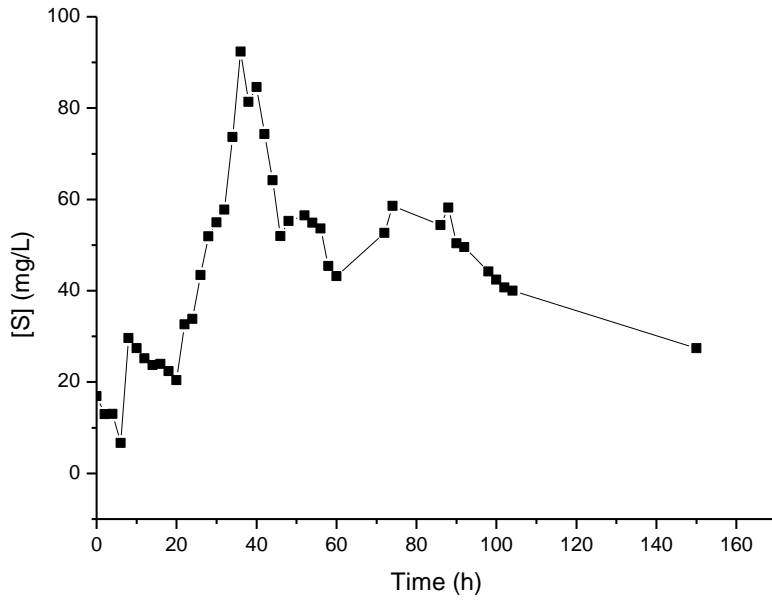
Εικόνα 20. Συγκέντρωση στοιχειακού θείου κατά την ανάπτυξη του *Chlorobaculum teridum* στη συνθήκη 1



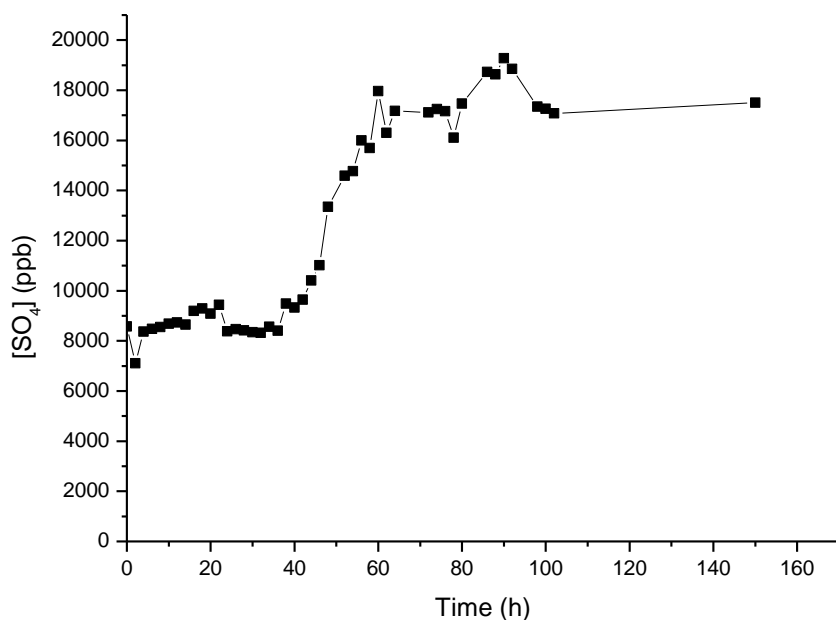
Εικόνα 21. Συγκέντρωση θειικών ιόντων κατά την ανάπτυξη του *Cba. teridum* στη συνθήκη 1



Εικόνα 22. Συγκέντρωση βακτηριοχλωροφύλλης c σε συνάρτηση με το χρόνο κατά την ανάπτυξη του *Chlorobaculum tepidum* στη συνθήκη 3



Εικόνα 23. Συγκέντρωση στοιχειακού θείου κατά την ανάπτυξη του *Chlorobaculum tepidum* στη συνθήκη 3



Εικόνα 24. Συγκέντρωση θειικών ιόντων κατά την ανάπτυξη του *Chlorobaculum tepidum* στη συνθήκη 3

Στα παραπάνω γραφήματα παρατηρείται ότι ο οργανισμός κατά την ανάπτυξή του στη συνθήκη 1 έφτασε στο μέγιστο της ανάπτυξης του σε 20-24 ώρες. Από την άλλη στη συνθήκη 3 ο οργανισμός έφτασε στην ίδια φάση περίπου στις 60 ώρες.

Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι η προκαλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις ήταν ανεπτυγμένη κάτω από την συνθήκη 1, δηλαδή είχαν χρησιμοποιηθεί και οι δύο πηγές θείου ( $\text{Na}_2\text{S} + \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Έτσι ο οργανισμός χρειάστηκε περισσότερο χρόνο ώστε να προσαρμοστεί στη συνθήκη 3, όπου απουσίαζε το  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

Επιπλέον, συγκρίνοντας τα γραφήματα στις εικόνες 19 και 22, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της βακτηριοχλωροφύλλης κατά την ανάπτυξη του οργανισμού στη συνθήκη 1 είναι αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στη συνθήκη 3. Επομένως και η ποσότητα των κυττάρων είναι μεγαλύτερη στη συνθήκη 1. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δεύτερη πηγή θείου ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) απουσιάζει από τη συνθήκη 3.

Ακόμη παρατηρώντας τις εικόνες 20 και 23, φαίνεται ότι η μέγιστη συγκέντρωση στοιχειακού θείου παράχθηκε από τον οργανισμό, λίγο πριν παρατηρηθεί η μέγιστη τιμή συγκέντρωσης της βακτηριοχλωροφύλλης. Στη συνέχεια παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του στοιχειακού θείου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην αρχή το βακτήριο παράγει το στοιχειακό θείο ως παραπροϊόν οξειδωσης των θειούχων και θεοθειικών αλάτων, ενώ στη συνέχεια το χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων για τη φωτοσυνθετική του διαδικασία.

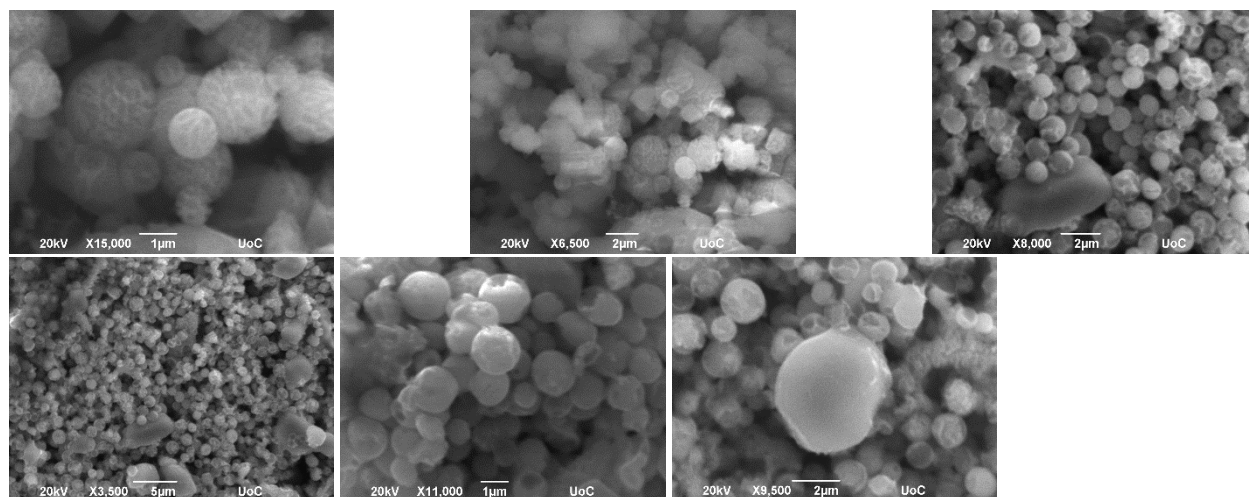
Τέλος παρατηρώντας τις καμπύλες στις εικόνες 24 και 21 που αφορούν στη συγκέντρωση των  $\text{SO}_4^{2-}$ , φαίνεται ότι η τιμή της έφτασε σε ένα μέγιστο αρκετά αργότερα από τη χρονική στιγμή που παρατηρήθηκε η μέγιστη ποσότητα κυττάρων στην καλλιέργεια. Τα θειικά αποτελούν ένα προϊόν οξείδωσης κυρίως των θειοθειικών αλλά και του στοιχειακού θείου.

### 3.3 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου

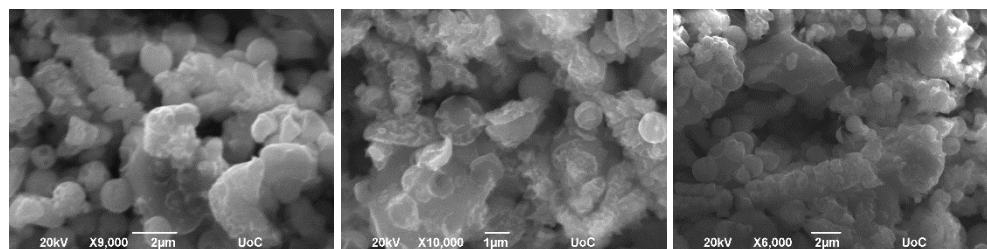
Το στοιχειακό θείο που απομονώθηκε μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, φασματομετρία μάζας MALDI-TOF και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE μιας διάστασης.

#### 3.3.1 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

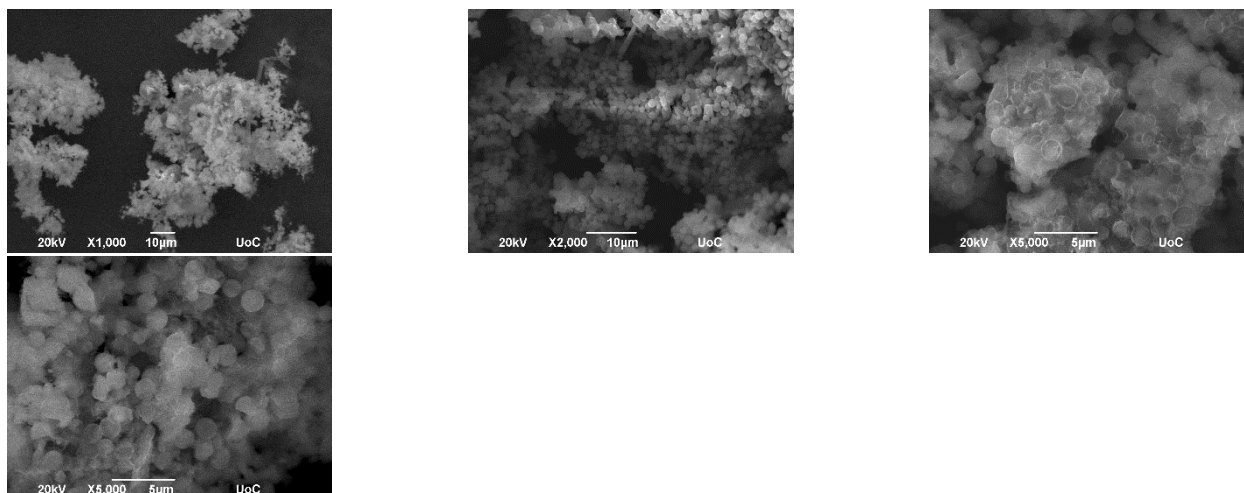
Στις εικόνες 25-28 διακρίνονται τα απομονωμένα σφαιρίδια στοιχειακού θείου που ελήφθησαν από διαφορετικές συνθήκες σε εκθετική και στατική φάση με διαφορετικές μεγεθύνσεις.



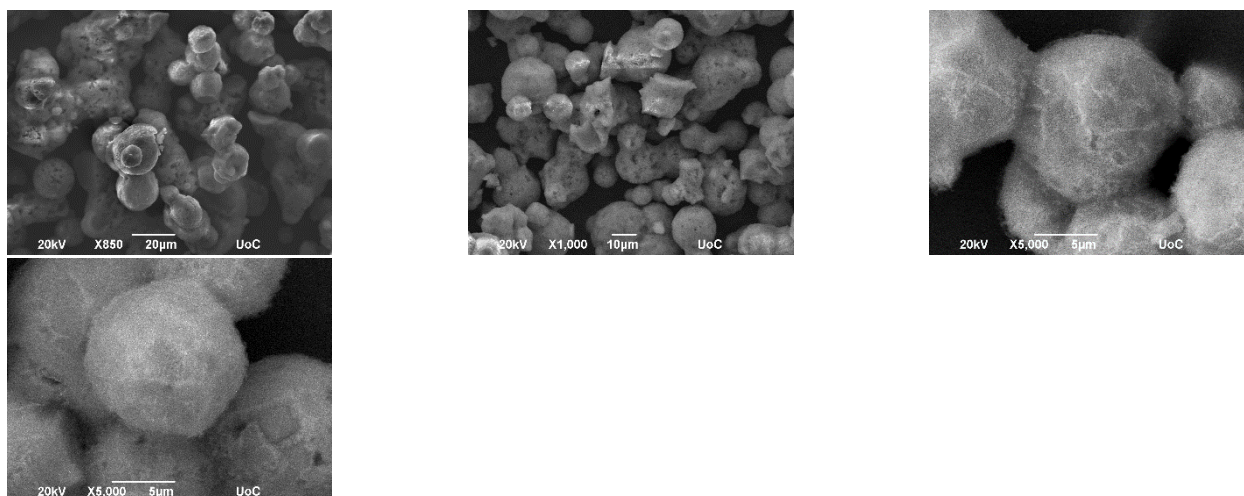
Εικόνα 25. Εικόνες SEM στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 1 στην λογαριθμική φάση



Εικόνα 25. Εικόνες SEM στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 3 στην λογαριθμική φάση



Εικόνα 21. Εικόνες SEM στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 1 στην φάση στασιμότητας

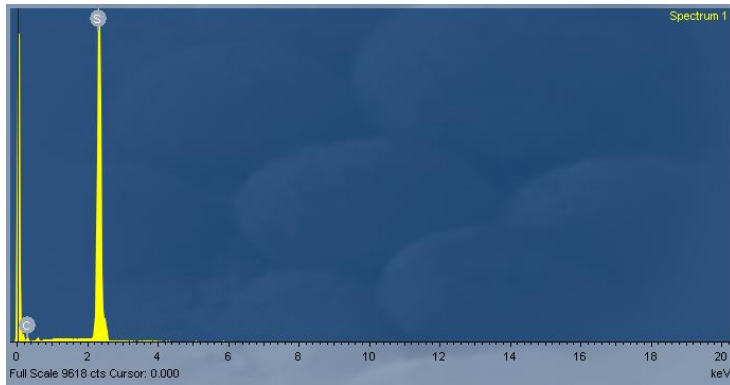


Εικόνα 26.. Εικόνες SEM στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 3 στην φάση στασιμότητας

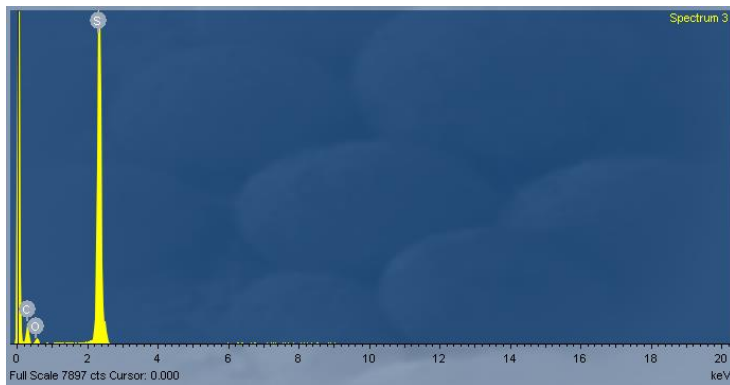
Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται σχηματισμένες σφαίρες διαφόρων μεγεθών ανεξάρτητα από τη συνθήκη ή τη χρονική στιγμή. Αυτό αποδεικνύει ότι το βακτήριο εκκρίνει σφαιρίδια θείου κάτω από όλες τις συνθήκες , συνεπώς κάτω από όλες τις πηγές θείου υπό τις οποίες αναπτύχθηκε.

Για την περαιτέρω μελέτη των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε και στοιχειακή ανάλυση στο καθένα από αυτά.

A.



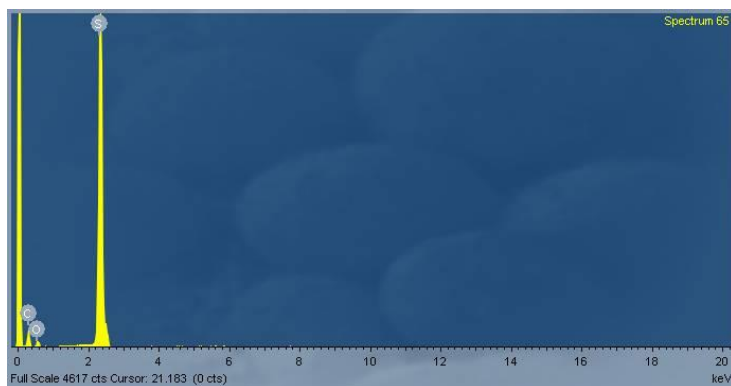
B.



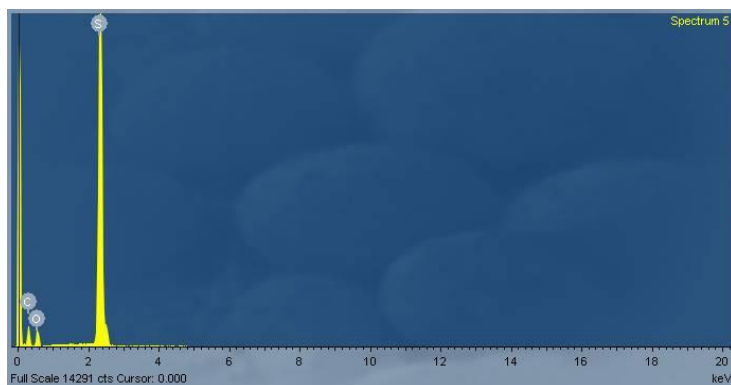
Εικόνα 27. Φάσματα στοιχειακής ανάλυσης σφαιριδίων στοιχειακού θείου όπου : (A) το βακτήριο έχει αναπτυχθεί στη συνθήκη 1 και η απομόνωση έχει γίνει στην λογαριθμική φάση (B) το βακτήριο έχει αναπτυχθεί στη συνθήκη 3 και η απομόνωση έχει γίνει στην λογαριθμική φάση



A.



B.



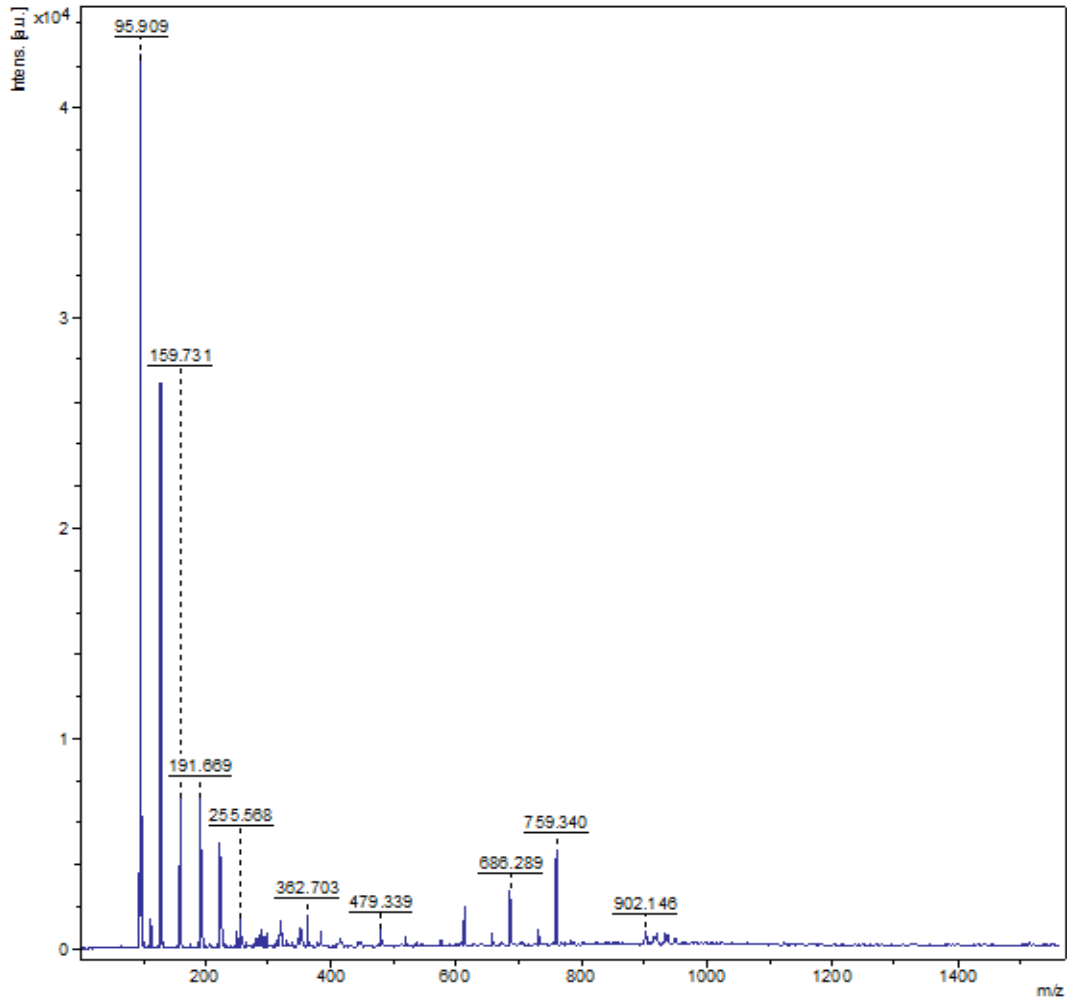
Εικόνα 28. Φάσματα στοιχειακής ανάλυσης σφαιριδίων στοιχειακού θείου όπου : (A) το βακτήριο έχει αναπτυχθεί στη συνθήκη 1 και η απομόνωση έχει γίνει στη φάση στασιμότητας (B) το βακτήριο έχει αναπτυχθεί στη συνθήκη 3 και η απομόνωση έχει γίνει φάση στασιμότητας

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

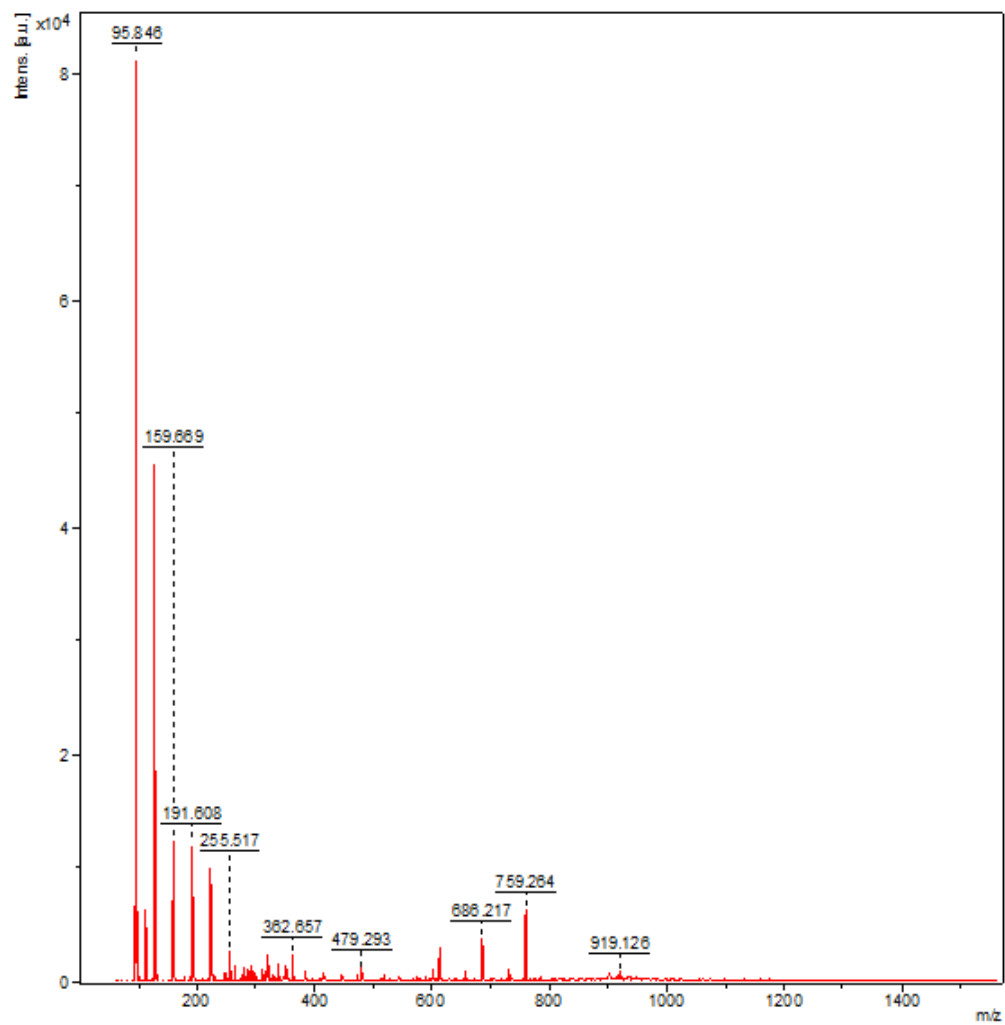
Τέλος σε κάποια δείγματα ανιχνεύονται και μικρές ποσότητες οξυγόνου το οποίο είναι πιθανό να έχει προσβάλει το δείγμα λόγω της παρουσίας του στην ατμόσφαιρα, είτε να οφείλεται σε κάποιους από τους πιθανούς λόγους που υπάρχει και η παρουσία άνθρακα (μη σωστός καθαρισμός, πρωτεΐνη).

### 3.3.2 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

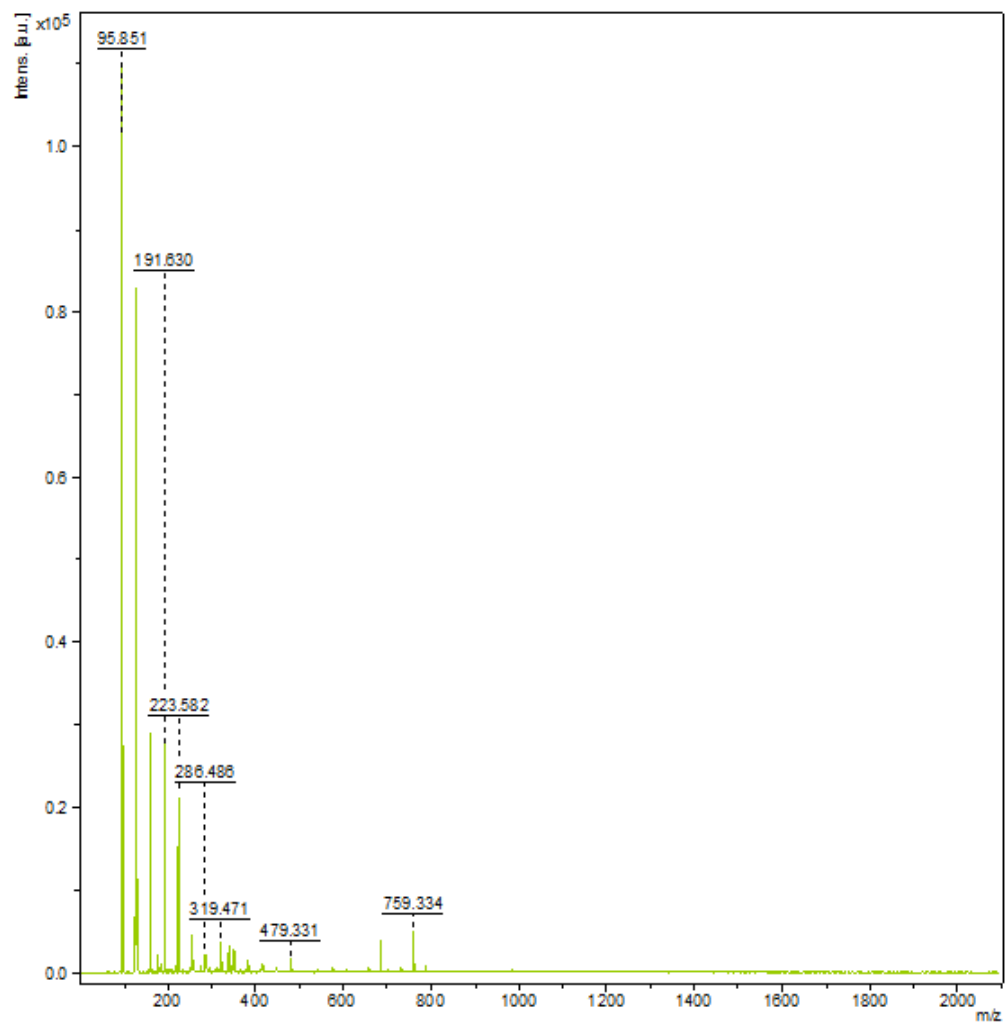
Στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε μελέτη με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF.



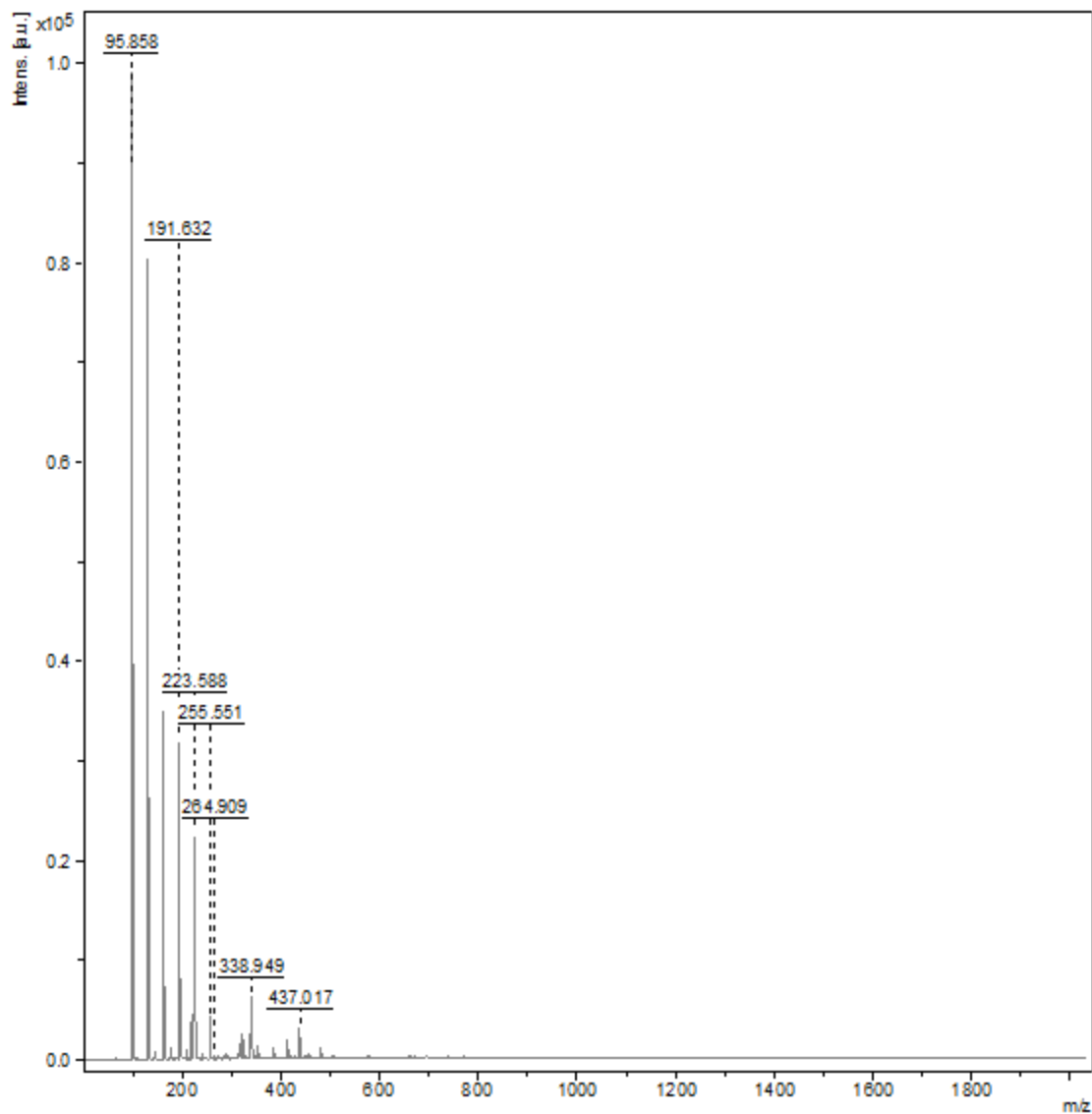
Εικόνα 29.. Φάσμα μάζας απομονωμένου σφαιριδίου στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 1 και απομόνωση στην εκθετική φάση



Εικόνα 30. Φάσμα μάζας απομονωμένου σφαιριδίου στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 3 και απομόνωση στην εκθετική φάση



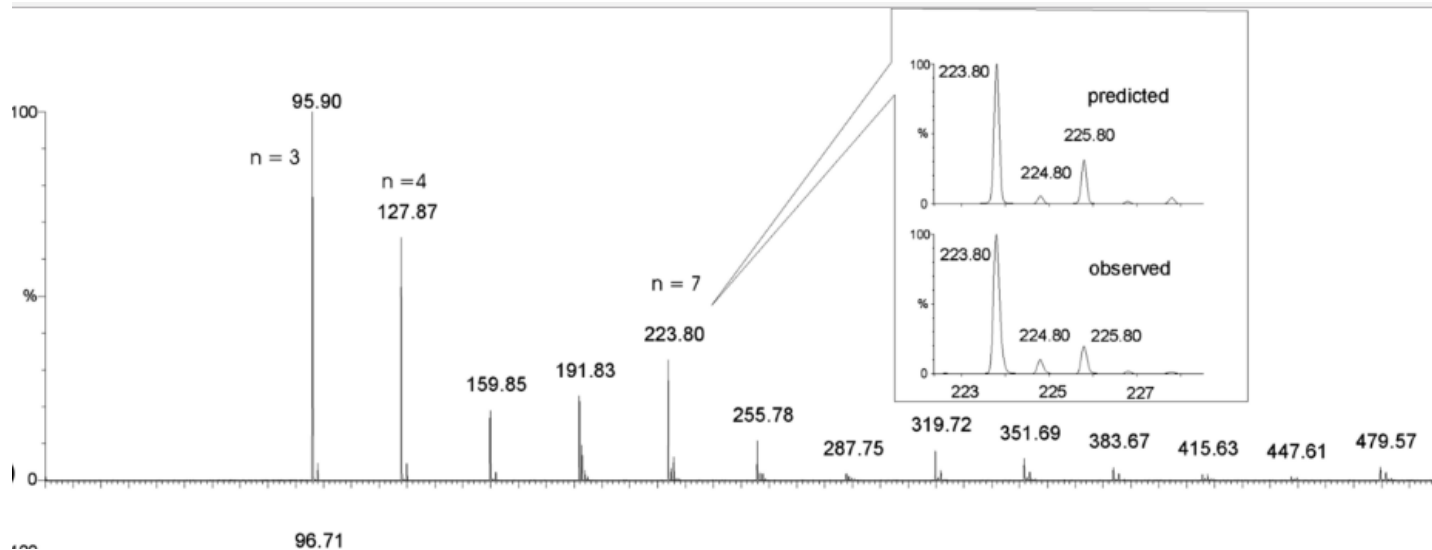
Εικόνα 31. Φάσμα μάζας απομονωμένου σφαιριδίου στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 1 και απομόνωση στη στατική φάση



Εικόνα 32. Φάσμα μάζας απομονωμένου σφαιριδίου στοιχειακού θείου από καλλιέργεια στη συνθήκη 3 και απομόνωση στη στατική φάση

Σε όλα τα παραπάνω φάσματα παρατηρήθηκαν κορυφές που αποτελούν πολλαπλάσια του στοιχειακού θείου. Οι κορυφές αυτές εμφάνισαν λόγο μάζα/φορτίο 96 (3 άτομα), 128 (4 άτομα), 160 (5 άτομα), 192 (6 άτομα), 224 (7 άτομα), 256 (8 άτομα), μέχρι και 480 (15 άτομα).

Ακόμη τα φάσματα παρουσίασαν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο ισοτοπικής αφθονίας, όμοιο με εκείνο που εμφάνισαν δείγματα καθαρού στοιχειακού θείου στη βιβλιογραφία. (Kruegel , A ; Attygale , A, 2010)



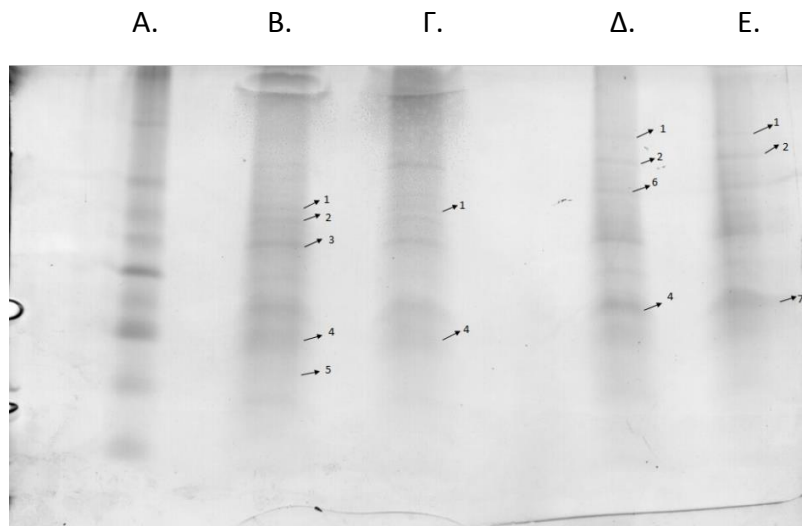
Εικόνα 33. Φάσμα μάζας δειγμάτων καθαρού στοιχειακού θείου. Στη μεγέθυνση διακρίνεται το χαρακτηριστικό μοτίβο ισοτοπικής αφθονίας που εμφανίζει το στοιχειακό θείο

Με αυτό τον τρόπο γίνεται αντιληπτή η επιτυχή απομόνωση του θείου, καθώς και η παρουσία αυτού σε μεγάλη ποσότητα στο δείγμα.

Παρατηρώντας τα φάσματα στις εικόνες 29, 30 και 31, μπορούμε να διακρίνουμε και κάποιες κορυφές με μεγαλύτερο λόγο  $m/z$  οι οποίες όμως δεν εμφάνισαν το χαρακτηριστικό μοτίβο ισοτοπικής αφθονίας του θείου. Η ύπαρξη αυτών των κορυφών πιθανόν να οφείλεται σε μη επαρκή καθαρισμό του δείγματος, επίσης δεν θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως πεπτίδια, διότι ο λόγος  $m/z$  είναι μικρός.

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

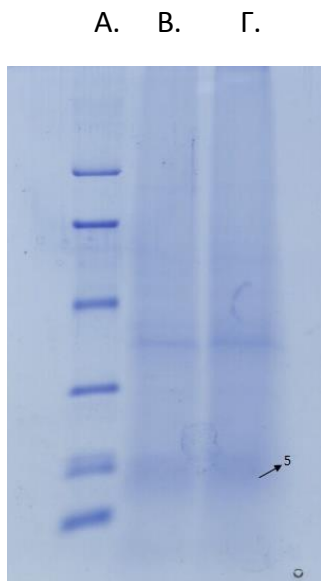
Αρχικά για να φανεί αν η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι επιτυχής και υπάρχει απομόνωση πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε δείγμα στοιχειακού θείου από καλλιέργεια που είχε αναπτυχθεί στη συνθήκη 1 και 3.



Εικόνα 34. SDS-PAGE εκκρινόμενου στοιχειακού θείου όπου : (Α) πρότυπες πρωτεΐνες ,(Β), δείγμα από την λογαριθμική φάση καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε συνθήκες 1 και το εκκρινόμενο θείο επεξεργάστηκε με *sample buffer*, (Γ) δείγμα από την λογαριθμική φάση καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε συνθήκες 3 και το εκκρινόμενο θείο επεξεργάστηκε με *sample buffer*, (Δ) δείγμα από την λογαριθμική φάση καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε συνθήκες 1 και το εκκρινόμενο θείο επεξεργάστηκε με *sample buffer-mercaptoethanol free*, (Ε) δείγμα από την λογαριθμική φάση καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε συνθήκες 3 και το εκκρινόμενο θείο επεξεργάστηκε με *sample buffer-mercaptoethanol free*

Όπως φαίνεται από την εικόνα 34, η σύσταση των δειγμάτων (Β,Γ) πιθανώς να επηρεάστηκε από την mercaptoethanol 6% (w/v), που περιείχε το *sample buffer* με το οποίο αυτά είχαν επεξεργαστεί. Παρατηρώντας πιο προσεκτικά το επάνω τμήμα της πηκτής και συγκρίνοντας τα δείγματα Β και Γ, με τα αντίστοιχα Δ και Ε, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες με μικρό μοριακό βάρος των δειγμάτων Β και Γ δεν είναι ευδιάκριτες σε σχέση με τις αντίστοιχες των δειγμάτων Δ και Ε.

Επίσης συγκρίνοντας τις μπάντες των δειγμάτων Δ και Ε, παρατηρείται ότι τα μοτίβα τους εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες, παρόλο που τα δύο δείγματα προέρχονται από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, όσον αφορά στην πηγή θείου.



Εικόνα 35. SDS-PAGE εκκρινόμενου στοιχειακού θείου όπου: (Α) πρότυπες πρωτεΐνες, (Β), δείγμα από την φάση στασιμότητας καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε συνθήκες 3 και το εκκρινόμενο θείο επεξεργάστηκε με *sample buffer-mercaptoethanol free*, (Γ) δείγμα από την φάση στασιμότητας καλλιέργειας που αναπτύχθηκε σε συνθήκες 1 και το εκκρινόμενο θείο επεξεργάστηκε με *sample buffer-mercaptoethanol free*

Η ίδια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για τις μπάντες των δειγμάτων Β και Γ (εικ. 35), καθώς εμφανίζεται ξανά παρόμοιο μοτίβο παρά τις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.

Συγκρίνοντας τις μπάντες των δειγμάτων Ε (εικ.34) και Β (εικ.35), όπου τα δείγματα προέρχεται από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας όμως διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης, είναι ευδιάκριτο πως στο δείγμα (Ε) που συλλέχθηκε στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης εμφανίζει περισσότερες πρωτεΐνες σε σχέση με το αντίστοιχο που συλλέχθηκε στην φάση στασιμότητας. Ακριβώς η ίδια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για τα δείγματα Δ (εικ.34) και Γ (εικ.35). Άρα πιθανόν ο αριθμός των πρωτεϊνών που θα βρίσκονται προσδεδεμένες πάνω στα σφαιρίδια του στοιχειακού θείου να σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια. Δεν μπορούμε να διεξάγουμε αντίστοιχο συμπέρασμα για τις συνθήκες καλλιέργειας οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς τα δείγματα παρουσιάζουν σχεδόν ίδιο μοτίβο.

Για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών αποκόπηκαν 24 μπάντες από την πηκτή στην εικόνα 34 και 14 μπάντες από την πηκτή στην εικόνα 35. Συνολικά και από τις δύο πηκτές αποκόπηκαν 58 μπάντες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν 7 διαφορετικές πρωτεΐνες. Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες φαίνονται στον πίνακα 5.

No	Title	Protein MW	Status	Method	pI Value	Accession	Localization	Biological process



1	60 kDa chaperonin OS=Chlorobium tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)	58044	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	5,1	Q8KF02	Cytoplasmic	
2	Serine protease OS=Chlorobium tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)	53495	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	9,7	Q8KH4	Periplasmic	Serine-type endopeptidase activity
3	Bacteriochlorophyll a protein OS=Chlorobium tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)	40383	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	7,8	Q46393	Cytoplasmic	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage
4	Hemagglutinin-related protein OS=Chlorobium tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)	22132	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	4,6	Q8KGA0	Unknown	
5	Uncharacterized protein OS=Chlorobium tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)	20962	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	9,9	Q8KAE7	Cytoplasmic membrane	
6	Uncharacterized protein OS=Chlorobium	42898	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	5,5	Q8KBI3	Outer Membrane	

	m tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)							
7	OmpA family protein OS=Chlorobium tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS)	24377	Identified	Chloro_Uni_5 Oppm	9,9	Q8KCR0	Outer Membrane	

Πίνακας 6. Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με φασματοσκοπία μάζας

## 4. Συμπεράσματα

### 4.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum* καθώς και κάποιων μεταβολιτών του με φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους και ιοντική χρωματογραφία. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανάπτυξη του *Chlorobaculum tepidum* και μεταβολιτών του στις εξής δύο συνθήκες: παρουσία θειούχων και θειοθειικών αλάτων και τη παρουσία μόνο θειούχων αλάτων. Συγκρίνοντας τις εικόνες 19 και 22 φαίνεται ότι στη συνθήκη 1 ο οργανισμός αναπτύσσεται πιο γρήγορα σε σχέση με τη συνθήκη 3. Ακόμη, η απόλυτη τιμή της συγκέντρωσης της βακτηριοχλωροφύλλης είναι υψηλότερη στη συνθήκη 1. Σαν συμπέρασμα αυτών προκύπτει ότι παρουσία δύο δοτών ηλεκτρονίων / πηγής θείου (συνθήκη 1) το βακτήριο αναπτύσσεται πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων.

Ακόμη, συγκρίνοντας τις εικόνες 20 και 23 φαίνεται πως η απόλυτη τιμή συγκέντρωσης στοιχειακού θείου είναι μεγαλύτερη στη συνθήκη 1. Αυτό σημαίνει πως η παραγωγή θείου σχετίζεται και με τις δύο πηγές ( θειούχα και θειοθειικά άλατα).

Επίσης παρατηρώντας τις εικόνες 21 και 24 φαίνεται πως και για τις δύο συνθήκες η μέγιστη παραγωγή θειϊκών ιόντων αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή που παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση βακτηριοχλωροφύλλης. Επίσης η απόλυτη τιμή συγκέντρωσης των θειϊκών είναι μικρότερη στη συνθήκη 2 έναντι της συνθήκης 1.

Τέλος, στη συνθήκη 2 το βακτήριο δεν εμφάνισε σταθερή και επαναλήψιμη ανάπτυξη, και για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατή η δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης.

#### 4.2 Μελέτη του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου από το *Chlorobaculum tepidum*. Το απομονωμένο αυτό θείο μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία και φασματομετρία μάζας. Όπως φάνηκε από τις δύο αυτές μεθοδολογίες, τα δείγματα ήταν πλούσια σε ατομικό θείο και αυτό φάνηκε από τη στοιχειακή ανάλυση, αλλά και από τη φασματομετρία μάζας και προσεκτική παρατήρηση των ισοτοπικών λόγων στα φάσματα.

Οπτικά τα δείγματα φάνηκε να περιέχουν κατά κύριο λόγο σφαιρίδια σε όλες τις συνθήκες που απομονώθηκαν, και στις δύο φάσεις ( λογαριθμική και στασιμότητας) ανάπτυξης. Τα σφαιρίδια αυτά ήταν λεία και δεν παρατηρήθηκαν οπές. Τα μεγέθη τους ήταν ποικίλα και σε κάποιες περιπτώσεις φάνηκε να ξεπερνάνε τα 10 μm ,δηλαδή να είναι μεγαλύτερα και από τα κύτταρα του βακτηρίου.

Επίσης οι κορυφές που παρατηρήθηκαν κατά την λήψη φασμάτων μάζας, και στις δύο συνθήκες, ανεξάρτητα από τη φάση της ανάπτυξης κατά την οποία απομονώθηκαν, δείχνουν να αποτελούν πολλαπλάσια του ατομικού βάρους του στοιχειακού θείου. Παρατηρήθηκαν κορυφές που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε 4 με 8 άτομα θείου, μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις μέχρι και σε 15 άτομα.

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

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πρωτεϊνών του εκκρινόμενου στοιχειακού θείου και από τις δύο συνθήκες, όταν οι καλλιέργειες βρίσκονταν στη λογαριθμική φάση καθώς και στη φάση στασιμότητας. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Συγκρίνοντας τις εικόνες 34 και 35 παρατηρούνται διαφοροποιημένες πρωτεΐνες μεταξύ των δύο φάσεων ανάπτυξης. Ακόμα παρατηρείται ένα όμοιο μοτίβο στις μπάντες των πρωτεϊνών που αντιστοιχούν στις δύο διαφορετικές συνθήκες.

Για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών αποκόπηκαν 24 μπάντες από την πηκτή στην εικόνα 34 και 14 μπάντες από την πηκτή στην εικόνα 35. Συνολικά και από τις δύο πηκτές αποκόπηκαν 58 μπάντες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν 7 διαφορετικές πρωτεΐνες. Όλες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν καθώς και η κυτταρική θέση και λειτουργία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

## Βιβλιογραφία

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer L. (2014). *Βιοχημεία* (1 ed.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Bryant DA, Friigard DU. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*, 14(11), 488-96.
- Chan, L.-K., Morgan-Kiss, R. M. & Hanson, T. E. (2009). Functional analysis of three sulfide : quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*. 191, 1026-34.
- Eisen, J. A., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Wu, M., Dodson, R. J., Deboy, R., Gwinn, M. L., Nelson, W. C. & other authors. (2002). The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. 99(14), 9509-14.
- Frigaard, N-U ; Dahl, C. (2009). Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. 54, 103-200.
- Frigaard, N.-U. &. (2009). Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. 54, 103-200.
- G. S. Orf, R. E. Blankenship. (2013). Chlorosome antenna complexes from green photosynthetic bacteria. 116(2), 315-331.
- Gault, V. A., McClenaghan, N. H. . (2009). *Understanding Bioanalytical Chemistry: Principles and Applications*. Wiley-Black Well .
- Goldbeck, J.H; Jagannathan, B. (2008). Unifying principles on homodimeric type I photosynthetic reaction centers : Properties of Pscβ and the FA, FB and Fx iron clusters in green sulfur bacteria. 1777(12), 1534-44.
- Harris D. C. (2010). *Ποσοτική Χημική Ανάλυση* (Vol. B). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Hauska, G ; Schoedt, T ; Remigy, H ; Tsiotis, G ;. (2001). The reaction center of green sulfur bacteria. 1507(1-3), 260-277.
- J. Psencik, T.P.Ikonen, P. Laurinmaki, M. C. Merckel, S. J. Butcher, R. E. Serimaa, R. Tuma. (n.d.). Lamellar Organization of Pigments in Chlorosomes, the Light Harvesting Complexes of Green Photosynthetic Bacteria. *Biophysical Journal*, 87(2), 1165-1172.
- Kerfeld, C. A.; Sawaya, M. R; Tanaka, S; Nguyen, C. V.; et al. (2005). Protein structure forming the shell of primitive bacterial organelles. *Science*, 309(5736), 936-8.
- Kruegel, A ; Attygale, A. (2010). Elemental sulfur as a versatile low mass range calibration standard for laser desorption ionization mass spectrometry. 21(1), 112-16.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P. (2010). *Biology of microorganisms* (13 ed.). Brock.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P. (2010). *biology of microorganisms* (13 ed.). Brock.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P. (2010). *Biology of microorganisms* (13 ed.). Brock.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D., Clark D. P. (2010). *Biology of microorganisms* (13 ed.). Brock.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen J. V., Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. 1, 2856-60.

- Skoog, D. A. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* ('6 ed.). Εκδόσεις Κωσταράκη.
- Stal, L. J. (1984). The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *2*, 295-306.
- Stanier, R. Y., Smith, J. H. C. (1960). The chlorophylls of green bacteria. *41*, 478-84.
- Stokes, D. J. (2008). *Principles and Practice of Variable Pressure: Environmental Scanning Electron Microscopy*. Wiley.
- Wahlund, T.M ; Woese, C.R ; Castenholz, R.W ; Madigan, M.T ;. (1991). A thermophilic green sulfur bacterium from new Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum*. *156*(2), 81-90.
- Wilson, K. W. (n.d.). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (7 ed.). Cambridge University Press.