#### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

#### ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



#### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii παρουσία CO<sub>2</sub>- Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου DCMU και αντιβιοτικών σε φωτοσυνθετικά μικροφύκη

Μαλαματένια Παπαβασιλείου

Επιβλέπων καθηγητής Δημήτριος Γανωτάκης

Ηράκλειο 2018

#### **UNIVERSITY OF CRETE**

#### SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY** 



#### **BACHELOR THESIS**

Biodegradation of phenol by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of CO<sub>2</sub>- Comparative study of the impact of the herbicide DCMU and antibiotics on photosynthetic microalgae

Malamatenia Papavasileiou

<u>Thesis supervisor</u> Demetrios Ghanotakis

Heraklion 2018

## Περιληψη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου DCMU και μιας σειράς αντιβιοτικών στο Chlamydomonas και σε ένα φωτοσυνθετικό μικροοργανισμό που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο στο Ηράκλειο της Κρήτης.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η ανάπτυξη του Chlamydomonas reinhardtii σε ένα εύρος συγκεντρώσεων φαινόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, σε διάφορες περιεκτικότητες, σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (50-60 μΕ·m<sup>-</sup><sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>). Μελετήθηκε, επίσης, η επίδραση των παραπάνω συνθηκών στην δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και ποσοτικοποίησης των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Τέλος, ελέγχθηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αποικοδομήσει την φαινόλη σε αυτές τις συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το CO<sub>2</sub> δεν αποτελεί το κατάλληλο βοηθητικό υπόστρωμα υπό αυτές τις συνθήκες

Στο δεύτερο μέρος μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός μικροφύκους που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο παρουσία αντιβιοτικών τα οποία δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης (καναμυκίνη, σπεκτινομυκίνη και χλωραμφενικόλη) και στο ζιζανιοκτόνο DCMU το οποίο αποτελεί αναστολέα του φωτοσυστήματος ΙΙ. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε συγκριτικά με το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως το μικροφύκος από τον ποταμό Γιόφυρο έδειξε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με το *Chlamydomonas* εξαιτίας κάποιων χαρακτηριστικών που έχει εμφανίσει κατά την ανάπτυξή του στο επιβαρυμένο περιβάλλον του ποταμού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σημαντικά διότι δείχνουν πως η μελέτη φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών μπορεί να μας παρέχει στελέχη τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε ακραίες συνθήκες με εφαρμογή στο πεδίο της βιοαποκατάστασης του περιβάλλοντος.

**Λέξεις κλειδιά:** μικροφύκη, φαινόλη, βιοαποικοδόμηση, φωτοσύνθεση, καταπόνηση, , αναστολείς, DCMU, αντιβιοτικά, *Chlamydomonas reinhardtii* 

### Abstract

The present thesis focuses on the biodegradation of phenol by the microalga *Chlamydo-monas reinhardtii*. In addition a comparative study on the impact of the herbicide DCMU and a series of antibiotics on two photosynthetic microorganisms was also carried out. The two microorganisms used in this study were *Chlamydomonas reinhardtii* and a photosynthetic microalga isolated from Giofyro River in Heraklion, Crete.

In the first part of this study the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in various concentrations of carbon dioxide as an alternative carbon source, in the presence of phenol, was examined. The experiments were carried out using 4 different concentrations of phenol, in low light conditions (50-60  $\mu$ E·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). The impact of these conditions on the structure and functionality of the photosynthetic mechanism was also examined. Thus, the chlorophyll fluorescence and the quantity of photosynthetic pigments were measured. Furthermore, the capability of this microorganism to biodegrade phenol under these conditions was investigated. The results showed that CO<sub>2</sub> is not the most suitable auxiliary substrate under these conditions regarding phenol removal from the culture medium.

In the second part, the growth as well as the photosynthetic efficiency of a microalga isolated from Giofyro River in the presence of two kinds of inhibitors were studied. The aim of this part of the study was to determine the behaviour of the microorganism in the presence of either a series of antibiotics that inhibit the protein synthesis (kanamycin, spectinomycin and chloramphenicol) or a herbicide that inhibits photosystem II activity (DCMU or Diuron). The results were compared to those obtained for*Chlamydomonas reinhardtii* and it was obvious that the microalga from Giofyro River is more resistant than the model microorganism under these conditions.

The results of this work have demonstrated that the study of photosynthetic microorganisms can help us identify strains that can grow under unfavorable conditions; such strains are appropriate candidates for bioremediation purposes.

Key words: microalgae, phenol, biodegradation, photosynthesis, stress, inhibitors, DCMU, antibiotics, *Chlamydomonas reinhardtii* 

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέποντα καθηγητή τον Δρ. Δημήτριο Γανωτάκη. Στην συγκεκριμένη ενότητα της πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να αποδώσω ευχαριστίες σε όλα τα άτομα που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Δημήτριο Γανωτάκη που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριο του και να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στην Βιοχημεία. Ο συμβουλευτικός ρόλος του ήταν καταλυτικής σημασίας για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Τσιώτη, καθηγητή του Τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας για την πολύτιμη βοήθειά του, επιτρέποντάς μου την χρήση εργαστηριακού εξοπλισμού, απαραίτητου για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Νικόλαο Χανιωτάκη, καθηγητή του Τομέα Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας και την κα. Μαρία Φουσκάκη για την συνεισφορά τους στην παρούσα εργασία. Τους ευχαριστώ θερμά για τις χρήσιμες συμβουλές και την πολύτιμη βοήθειά τους στην χρήση του εργαστηριακού εξοπλισμού και στην επίλυση προβλημάτων κατά την διάρκεια των πειραματικών μετρήσεων.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και ιδιαίτερα στον κ. Στέφανο Παπαδάκη για την χρήση των μικροσκοπίων υπό την επίβλεψη και καθοδήγησή του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα στην Ελευθερία Βαλσαμή, τον Γεώργιο Σφενδουράκη, τον Εμμανουήλ Κοκκαράκη, την Θεοδώρα Σταυρινού, την Ελένη Πολωνιατάκη, τον Ναπολέων Στρατηγάκη, την Θεοφανία Ανδρεαδάκη και την Μαρία-Ελένη Ψυχογυιου για τις πολύτιμες συμβουλές και την υποστήριξή τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Γεώργιου Τσιώτη για την βοήθειά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον υποψήφιο διδάκτορα Θεοχάρη Νάζο καθώς έπαιξε καθοριστικό ρόλο για την περάτωση της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία, για την βοήθεια του στην κατανόηση καινούργιων θεωρητικών εννοιών και εργαστηριακών τεχνικών και την υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

# ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΓΙΕΣ

PCV	Όγκος καθιζαμένων κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.		
ТАР	Συνθήκη με θρεπτικό ΤΑΡ με οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα στο φως		
TAP-C	Συνθήκη με θρεπτικό ΤΑΡ από το οποίο απουσιάζει το οξικό οξύ στο φως.		
Fo	Ο ελάχιστος φθορισμος σε χρόνο to όταν όλα τα ενεργά φωτοσυνθετικά κέ-		
	ντρα είναι ενεργά		
F <sub>max</sub>	Ο μέγιστος φθορισμος σε χρόνο t όταν όλα τα ενεργά φωτοσυνθετικά κέντρα		
	είναι ενεργά		
F <sub>v</sub>	Τιμή του φθορισμού που υπολογίζεται από (Fmax–Fo).		
$F_v/F_{max}$	Φωτοσυνθετική απόδοση.		
ABS/RC	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης		
DI₀/RC	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης υπό μορφή θερμότητας		
RC/CS <sub>o</sub>	Πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης		
TR₀/ABS	Κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας		
C <sub>a</sub>	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-a εκφρασμένη σε mg χρωστικής ανά mL PCV		
C <sub>b</sub>	Συγκέντρωση χλωροφύλλης-b εκφρασμένη σε mg χρωστικής ανά mL PCV		
C <sub>x+c</sub>	Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών εκφρασμένη σε mg χρωστικής ανά mL		
	PCV		

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙ/	\НΨΗ	3
ABSTI	RACT	4
EYXAI	ΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤ	ΟΜΟΓΡΑΓΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΕ	EXOMENA	7
1 El	ΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1	Φωτοσυνθεση	9
1.2	Φαινολικές ενώσεις	11
1.2.	1 Φαινόλη	11
1.2.	2 Τοξικότητα φαινόλης	12
1.3	Βιοαποικοδόμηση	12
1.3.	1 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης από μικροφύκη	13
1.4	Απομόνωση μικροοργανισμών από την φύση	14
1.5	Σκοπός της Εργασίας	14
2 B	ΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ <i>CHLAMY</i>	DOMONAS
REINHAF	RDTII CC-125	15
2.1	Εισαγωγή	15
2.1.	1 Το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii	15
2.1.	2 Το Chlamydomonas reinhardtii στην βιοαποικοδόμηση φαινόλης	16
2.2	Υλικά και μέθοδοι	16
2.2.	1 Μικροοργανισμός	16
2.2.	2 Θρεπτικό μέσο και Συνθήκες ανάπτυξης	16
2.2.	3 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών	18
2.2.	4 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης	19
2.2.	5 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού	19
2.2.	6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινόλης με την χρήση Υγρής Χρωμ	ιατογραφίας
Υψηλήα	ς Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)	21
2.2.	7 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)	22
2.3	Αποτελέσματα και Συζήτηση	23

Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα στη	ιν ανάπτυξη
domonas reinhardtii παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φαινόλης	23
Επίδραση της φαινόλης στην δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού	μηχανισμού
domonas reinhardtii	25
Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το Chlamydomonas reinhardtii	28
	Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα στη domonas reinhardtii παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φαινόλης Επίδραση της φαινόλης στην δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού domonas reinhardtii Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το Chlamydomonas reinhardtii

#### 2.4 Συμπεράσματα

28

#### 3 ΜΕΛΕΤΉ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΉΣ ΤΟΥ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟΥ DCMU ΚΑΙ ΜΙΑΣ ΣΕΙΡΑΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ 29

3.1	σαγωγή 2	29
3.1	Ο μικροοργανισμός από το Γιόφυρο	29
3.1	Ζιζανιοκτόνα	29
3.1	Αντιβιοτικά	30
3.2	λικά και Μέθοδοι	31
3.2	Μικροοργανισμοί	31
3.2	Θρεπτικό μέσο και Συνθήκες ανάπτυξης	31
3.2	Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών	32
3.2	Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης	33
3.2	Προσδιορισμός φωτοσυνθετικής απόδοσης	33
3.3	τοτελέσματα και Συζήτηση	33
3.3	Επίδραση της DCMU στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών	33
3.3	Επίδραση της DCMU στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμών	35
3.3	Επίδραση των αντιβιοτικών στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών	37
3.3	Επίδραση των αντιβιοτικών στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμά 41	ύν
3.4	υμπεράσματα 2	45
4 Σ	ΙΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 4	16
5 E	ιογραφία 4	ł7

5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση ορίζεται ως «η διεργασία μετατροπής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια» [1]. Μέσω της φωτοσύνθεσης το διοξείδιο του άνθρακαδηλαδή η κύρια μορφή ανόργανου άνθρακα - μετατρέπεται σε υδατάνθρακες – δηλαδή σε οργανικές ενώσεις.

 $6CO_2 + 2H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \Delta G^\circ = +2870 kJ/mol$ 

Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται από τους αυτότροφους οργανισμούς, οι οποίοι έχουν την ικανότητα δέσμευσης της ηλιακής ακτινοβολίας. Μερικά παραδείγματα φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών αποτελούν τα ανώτερα φυτά και ορισμένοι μικροοργανισμοί όπως τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη. Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αποτελείται από οργανισμούς οι οποίοι επιτελούν οξυγόνο (O<sub>2</sub>) ως παραπροϊόν της φωτοσύνθεσης. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από οργανισμούα αποτελείται από οργανισμούς οι οποίοι επιτελούν ανοξυγονική φωτοσύνθεσης. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από οργανισμούς οι οποίοι επιτελούν οξυγόνο (O<sub>2</sub>) ως παραπροϊόν της φωτοσύνθεσης. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από οργανισμούς οι οποίοι επιτελούν ανοξυγονική φωτοσύνθεση, δηλαδή χρησιμοποιούν το νερό (H<sub>2</sub>O) και εκλύουν οξυγόνο κατά την φωτοσύνθεση διότι χρησιμοποιούν άλλες χημικές ενώσεις έναντι του νερού όπως το υδρόθειο (H<sub>2</sub>S).

Η φωτοσύνθεση αποτελείται από 2 μέρη: τις φωτεινές (ή πιο σωστά φωτοεξαρτώμενες) αντιδράσεις και τις σκοτεινές (ή φωτοανεξάρτητες) αντιδράσεις. Κατά την διάρκεια των φωτοανεξάρτητων αντιδράσεων, πραγματοποιείται οξείδωση του νερού σε μοριακό οξυγόνο με την βοήθεια του ηλιακού φωτός και παράγεται τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και αναγωγικά ισοδύναμα, NADPH. Το NADPH χρησιμοποιείται για την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα ενώ το ATP ωθεί την μετατροπή αυτή παρέχοντας ενέργεια. Η αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα σε γλυκόζη και άλλα σάκχαρα γίνεται κατά την διάρκεια των φωτοανεξάρτητων αντιδράσεων, οι οποίες είναι γνωστές και ως κύκλος του Calvin–Benson– Bassham.

Ο χώρος στον οποίο πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση είναι σε οργανίδια τα οποία ονομάζονται χλωροπλάστες. Οι χλωροπλάστες περιβάλλονται από μια διπλή μεμβράνη - μια εξωτερική και μια εσωτερική. Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει το στρώμα (stroma), στο οποίο περιέχονται μεμβρανικές δομές γνωστές ως θυλακοειδή (Εικόνα 1). Ο εσωτερικός χώρος των θυλακοειδών ονομάζεται μικροχώρος (lumen) [2]. Οι φωτεινές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών ενώ οι σκοτεινές πραγματοποιούνται στο στρώμα.



Εικόνα 1Σχηματική αναπαράσταση ενός χλωροπλάστη

Η οξυγονική φωτοσύνθεση επιτελείται από δύο συνδεδεμένα φωτοσυστήματα – το φωτοσύστημα ΙΙ (PS II) και το φωτοσύστημα Ι (PS I). Τα φωτοσυστήματα αυτά αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές. Συνοπτικά, στο ενεργό κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ, όταν απορροφηθεί ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, πραγματοποιείται διέγερση του ειδικού ζεύγους χλωροφυλλών (P680) η οποία επάγει την μεταφορά των ηλεκτρονίων στην πλαστοκινόνη. Ως δότης ηλεκτρονίων λειτουργεί το νερό το οποίο οξειδώνεται μέσω του κέντρου μαγγανίου (ή oxygen-evolving complex, OEC). Η πλαστοκινόνη ανάγεται σε πλαστοκινόλη και επανοξειδώνεται στο κυτόχρωμα b<sub>6</sub>f. Από το κυτόχρωμα τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο φωτοσύστημα Ι, μέσω μίας χαλκοπρωτεΐνης, της πλαστοκυανίνης. Στο φωτοσύστημα Ι προκαλείται και πάλι διέγερση των ηλεκτρονίων (P700) τα οποία ρέουν προς την φερρεδοξίνη. Μέσω της αναγωγάσης φερρεδοξίνης-NADP<sup>+</sup> τα ηλεκτρόνια καταλήγουν στον τελικό αποδέκτη, το NADPH. Κατά την διάρκεια της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων προκαλείται βαθμίδωση της συγκέντρωσης Η<sup>+</sup> (ΔPH) μεταξύ του lumen και του stroma, το οποίο επάγει την σύνθεση του ΑΤΡ. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2 Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων

Η αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων είναι γνωστή και ως σχήμα Ζ και αποδίδεται σχηματικά στην Εικόνα 3.





Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, η χλωροφύλλη α βρίσκεται στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων. Επειδή όπως τα ειδικά ζεύγη χλωροφυλλών στα δυο φωτοσυστήματα διεγείρονται σε καθορισμένα μήκη κύματος (680nm για το PS II και 700nm για το PS I) η υπόλοιπη φωτεινή ενέργεια απορροφάται από επικουρικές χρωστικές οι οποίες διοχετεύουν την ενέργεια στα ενεργά κέντρα. Οι επικουρικές χρωστικές που απαρτίζουν τα σύμπλοκα συλλογής φωτός (light harvesting complexes, LHC) είναι η χλωροφύλλη β και τα καροτενοειδή (ξανθοφύλλες και καροτένια). Με τον τρόπο αυτό οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί εκμεταλλεύονται ένα μεγάλο μέρος του ορατού φάσματος για να επιτελέσουν την φωτοσύνθεση. Τα καροτενοειδή εκτός την μεταφορά ενέργειας στο ενεργό κέντρο έχουν και προστατευτικό ρόλο λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

#### 1.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μία κατηγορία χημικών ενώσεων οι οποίες περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο και μια ομάδα υδροξυλίου η οποία βρίσκεται απευθείας συνδεδεμένη με τον δακτύλιο. Τέτοιου είδους ενώσεις μπορεί να είναι είτε φυτικής προέλευσης (ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, αμινοξέα, αιθέρια έλαια, πρόδρομα μόρια φαρμάκων) είτε συνθετικές (φάρμακα, πρόσθετα τροφίμων, πεχαμετρικοί δείκτες, αντισηπτικά, αντιμυκιτιακά). Η πιο απλή φαινολική ένωση είναι η φαινόλη.

#### 1.2.1 Φαινόλη

Η φαινόλη είναι μια αρωματική οργανική ένωση, μοριακού βάρους 94,11 gr/mol. Όπως οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, η φαινόλη είναι σχετικά υδατοδιαλυτή, με υψηλό σημείο ζέσεως λόγω της δυνατότητας της να αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου. Ωστόσο, η σημαντικότερη ίσως ιδιότητα της είναι η οξύτητά της (pK<sub>3</sub>=9.89) η οποία οφείλεται στην ικανότητά της να διίστανται στο νερό δίνοντας H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> και να σταθεροποιεί το ArO<sup>-</sup> με συντονισμό (Εικόνα 4) [3].



Εικόνα 4 Δομές συντονισμού του ArO<sup>-</sup>

#### 1.2.2 Τοξικότητα φαινόλης

Παρά τα οφέλη της φαινόλης, ιδίως στην οργανική σύνθεση, αποτελεί μια τοξική χημική ένωση και ο χειρισμός της θα πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας όλα τα κατάλληλα μέτρα ασφαλείας. Η τοξικότητα των φαινολικών ενώσεων σχετίζεται άμεσα με την ικανότητά τους να σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες και την διαλυτότητά τους σε υδρόφοβα μόρια [4]

Όσο πιο υδρόφοβη είναι μια φαινολική ένωση τόσο ευκολότερα εισχωρεί μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και τόσο δυσκολότερα απεκκρίνεται από έναν οργανισμό (μεταβολισμός). Παραδείγματος χάριν, η προσθήκη ατόμων χλωρίου, μια διαδικασία που αυξάνει την λιποφιλία της ένωσης, αυξάνει και την τοξικότητα της ένωσης. Για το λόγο αυτό οι χλωροφαινόλες είναι πιο τοξικές ενώσεις από τη φαινόλη. [5]

Για να συγκριθεί η τοξικότητα μεταξύ δύο χημικών ενώσεων λαμβάνονται υπόψιν, συνήθως, δύο παράμετροι των προς μελέτη ενώσεων. Η μία είναι το pK<sub>a</sub> (ο αρνητικός λογάριθμος της σταθεράς διάστασης της ένωσης) και η άλλη είναι το logP<sub>ow</sub> (ο λογάριθμος του παράγοντα κατανομής της ένωσης σε σύστημα οκτανόλης : νερού). Όσο πιο υδρόφοβη είναι μια ένωση τόσο πιο μεγάλος είναι ο παράγοντας P, άρα όσο μεγαλύτερο το logP<sub>ow</sub> τόσο πιο τοξική η ένωση. Επίσης, όσο μικρότερο το pK<sub>a</sub> δηλαδή όσο αυξάνεται η οξύτητά της, τόσο πιο τοξική θεωρείται μια ένωση [6]. Για ενώσεις με παρόμοιες τιμές pK<sub>a</sub> η τοξικότητα καθορίζεται κυρίως από την υδροφοβικότητα [7]. Ο βαθμός τοξικότητας επηρεάζεται και από τη θέση του υποκαταστάτη. Για παράδειγμα, ένα άτομο χλωρίου υποκατεστημένο στην όρθο- θέση στο μόριο της φαινόλης μειώνει την τοξικότητα του μορίου, ενώ στη μέτα- θέση την αυξάνει.

Ένας άλλος παράγοντας που καθιστά της φαινόλες τοξικές, είναι η ικανότητα τους να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες μέσω της αλληλεπίδρασης τους με βιομόρια. Μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, μεταβολίζονται, κυρίως με συμμετοχή οξειδασών στο κυτόχρωμα P450. Ορισμένες φορές, οι μεταβολίτες που σχηματίζονται είναι πιο τοξικοί σε σχέση με την αρχική ξενοβιοτική ένωση, διότι οι μεταβολίτες αυτοί μπορεί είτε να δεσμεύονται σε ένζυμα εμποδίζοντας την λειτουργία τους, είτε να δεσμεύονται στο DNA. Μερικές φορές ο μετασχηματισμός των φαινολών οδηγεί σε αύξηση της τοξικότητάς τους μέσω του σχηματισμού μεταβολιτών που μπορούν να δεσμεύονται στο DNA ή σε ένζυμα και να τα καταστρέφουν [8].

Όταν γίνεται αναφορά σε μια ξενοβιοτική ουσία και οι επιπτώσεις της σε έναν ζωντανό οργανισμό, λαμβάνονται υπόψιν οι εξής παράμετροι: η οξεία τοξικότητα (που σχετίζεται με την δόσης της ένωσης που προκαλεί θάνατο στο 50% των πειραματόζωων – LD<sub>50</sub>), η χρόνια τοξικότητα, η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση.

#### 1.3 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Η βιοαποικοδόμηση είναι μια βιολογικά καταλυόμενη διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί μετατρέπουν ή αλλάζουν (μέσω μεταβολικής ή ενζυματικής δράσης) τη δομή χημικών ενώσεων που εισάγονται στο περιβάλλον με σκοπό να μειώσουν την πολυπλοκότητα των χημικών αυτών ενώσεων [9, 10].

Κατά την διαδικασία της βιοαποικοδόμησης πραγματοποιείται διάσπαση πολύπλοκων οργανικών ενώσεων σε πιο απλά μόρια και η ενέργεια που παράγεται από αυτήν την διαδικασία χρησιμοποιείται για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου. Η μετατροπή των ουσιών αυτών γίνεται μέσω μιας σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων όταν επικρατούν αερόβιες συνθήκες, στις οποίες το οξυγόνο δρα ως αποδέκτης των ηλεκτρονίων. Σε κάποιους μικροοργανισμούς οι αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν και σε αναερόβιες συνθήκες, όπου οι αποδέκτες ηλεκτρονίων είναι συνήθως νιτρικά ή θειικά άλατα, διοξείδιο του άνθρακα, οξειδωμένα ανόργανα στοιχεία ή άλλες οργανικές ενώσεις [11]. Η πλήρης αποικοδόμηση οδηγεί συνήθως στο σχηματισμό νερού και διοξειδίου του άνθρακα, υπό αερόβιες συνθήκες ή μεθανίου υπό αναερόβιες [12].

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές [13-15] δεν έχει τόσο σημασία η επιλογή του μικροοργανισμού όσο η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών που θα ενεργοποιήσουν τα απαραίτητα μονοπάτια και τους μηχανισμούς για την βιοδιάσπαση των τοξικών ενώσεων.

Επιπλέον η βιοαποικοδόμηση είναι δυνατόν να περιοριστεί από ένα μεγάλο αριθμό παραμέτρων οι οποίες είναι οι εξής:

- Αυξημένη συγκέντρωση επικίνδυνων ουσιών στα προς επεξεργασία απόβλητα με τοξικές επιδράσεις στους υφιστάμενους μικροοργανισμούς.
- Απουσία ή ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών ή οξυγόνου (στους αερόβιους μικροοργανισμούς) και επικράτηση μη ευνοϊκών συνθηκών για την επιβίωση και δράση των υφιστάμενων μικροοργανισμών [16].

#### 1.3.1 Βιοαποικοδόμηση φαινόλης από μικροφύκη

Στη βιβλιογραφία είναι γνωστός ένα μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών που έχουν την δυνατότητα να βιοαποικοδομήσουν την φαινόλη και να την χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω αερόβιας βιοαποικοδόμησης είτε μέσω αναερόβιας, ανάλογα το είδος του μικροοργανισμού. Οι πληθώρα μικροοργανισμών που έχουν μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ως προς την ικανότητα βιοαποικοδόμησης της φαινόλης αφορά κυρίως βακτήρια και μύκητες, ενώ λιγότερες είναι οι αναφορές σε μικροφύκη [17].

Όσον αφορά τα μικροφύκη στην διεθνή βιβλιογραφία έχει βρεθεί το μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης του μικροφύκος Ochromonas danica [18]. Το συγκεκριμένο μικροφύκος χρησιμοποιεί ένα αερόβιο μονοπάτι βιοαποικοδόμησης.



Εικόνα 5 Μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροοργανισμό Ochromonas danica.

Αναλυτικότερα, το μικροφύκος χρησιμοποιεί το meta μεταβολικό μονοπάτι. Τα βασικά ένζυμα που παίρνουν μέρος σε αυτή τη διαδικασία είναι η μονοοξυγενάση της φαινόλης που εισάγει μια ομάδα υδροξειδίου στο δακτύλιο σχηματίζοντας κατεχόλη με απαραίτητη την παρουσία O<sub>2</sub>. Έπειτα η 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης χρησιμοποιεί το O<sub>2</sub> για να διανοίξει τον δακτύλιο. Στη συνέχεια η αφυδρογονάση της ημιαλδεϋδης χρησιμοποιεί το NAD<sup>+</sup> ως συμπαράγοντα για να παράγει το 4-oxalocrotonate όπου στην συνέχεια καταλήγει στο πυροσταφυλικό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό στον κύκλο του Krebs.

Τα μικροφύκη πλεονεκτούν σε σχέση με τα βακτήρια ως προς την φωτοσυνθετική τους ικανότητα. Αυτό τους δίνει το πλεονέκτημα ότι ως πηγή ενέργεια χρησιμοποιούν το φως. Επιπλέον τα μικροφύκη εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, αναπτύσσονται γρήγορα και είναι εύκολα στην καλλιέργειά τους.

#### 1.4 Απομονώστη μικροοργανισμών από την φύση

Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που παραθέτουν παραδείγματα απομόνωσης και χρήσης μικροργανισμών από τη φύση. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι συνήθως βακτήρια και μύκητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έρευνα των Kafilzadeh et al. οι οποίοι διεξήγαγαν μία μελέτη για την αποικοδόμηση της φαινόλης χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς που απομόνωσαν από τη λίμνη Parishan στο Ιράν και μελέτησαν την ικανότητά τους να αποικοδομούν φαινόλη. Οι περισσότεροι οργανισμοί κατατάχθηκαν στις οικογένειες των Pseudomonaceae και Acinetobacteraceae. Διαπιστώθηκε ότι οι μικροργανισμοί προερχόμενοι από ένα περιβάλλον με υψηλό φαινολικό φορτίο έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν φαινόλη [19]. Ενδεικτικά κάποια άλλα ήδη μικροργανισμών που έχουν αναφερθεί είναι βακτήρια όπως τα Staphylococcus aureus, βακτήρια του γένους Corynebacterium και Proteus, ο Bacillus subtilis που απομονώθηκαν από έδαφος στην περιοχή της ριζόσφαιρας των φυτών (περιοχή που απαντόνται φαινολικές ενώσεις που εκκρίνονται από τα φυτά) και όλοι οι οργανισμοί αποικοδόμησαν τη φαινόλη, χωρίς καμία περίοδο προσαρμογής, ενώ ταυτόχρονα η φαινόλη αποτέλεσε τη μοναδική πηγή άνθρακα στα πειράματα [20]. Επίσης βακτήρια των τάξεων Άλφα και Βήτα Πρωτεοβακτηρίων τα οποία απομονώθηκαν όλα από μολυσμένα σημεία στη φύση στην περιοχή της Κορέας αναπτύσσονταν έχοντας ως μοναδική πηγή άνθρακα τη φαινόλη ενώ ταυτόχρονα την αποικοδομούσαν [21].

#### 1.5 Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας του Chlamydomonas reinhardtii να απομακρύνει την φαινόλη από το μέσο καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας ως εναλλακτική πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Παράλληλα, ήταν επιθυμητός ο έλεγχος τόσο της ανάπτυξης του μικροφύκους υπό τις μεταβαλλόμενες συνθήκες φαινόλης-CO<sub>2</sub> όσο και της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Επιπλέον, η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας δύο φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών ως προς ένα ζιζανιοκτόνο που δρα ως αναστολέας του φωτοσυστήματος ΙΙ και μια σειρά αντιβιοτικών που δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι δυο μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν ο πρότυπος μικροοργανισμός *Chlamydomonas reinhardtii* καθώς και ένα μικροφύκος που απομονώθηκε από το φυσικό περιβάλλον και συγκεκριμένα από μια περιοχή που αποτελεί αποδέκτη αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων.

Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών, με προοπτικές εφαρμογής στο πεδίο της βιοαποκατάστασης. Τέλος, έγινε μια προσπάθεια κατανόησης των χαρακτηριστικών ενός μικροφύκους που αναπτύχθηκε σε επιβαρυμένο περιβάλλον τα οποία του προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντίξοες συνθήκες σε σχέση με ένα εργαστηριακό στέλεχος.

# 2 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟ-ΦΥΚΟΣ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII CC-125

#### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 2.1.1 Το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii

Το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός. Στην φύση συναντάται στο υγρό έδαφος, στο γλυκό νερό και στην θάλασσα [22]. Το συγκεκριμένο είδος περιέχει κυτταρικό τοίχωμα, έναν κυπελοειδή χλωροπλάστη, μια κεραία που δέχεται το φως και δύο μαστίγια που βοηθούν στην κίνησή τους [23] (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 α.Το μυκροφύκος Chlamydomonas reinhardtii β. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών χαρακτηριστικών του

Τα κύτταρα του γένους Chlamydomonas έχουν την ικανότητα να μεγαλώνουν σε ένα απλό θρεπτικό μέσο καθώς εξασφαλίζουν την απαιτούμενη ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης. Ωστόσο μπορούν να αναπτυχθούν και σε απόλυτο σκοτάδι, αρκεί όμως να τους παρέχεται οξικό οξύ που λειτουργεί ως εναλλακτική πηγή άνθρακα.

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός τους είναι ίδιος με αυτό των ανώτερων φυτών. Το μικροφύκος αυτό είναι ένας πρότυπος οργανισμός για έρευνα από τον προηγούμενο αιώνα και δίνει απαντήσεις σε πολλά βασικά ερωτήματα που αφορούν την κυτταρική ζωή. Ειδικότερα έχει μελετηθεί αρκετά για να απαντηθούν κύρια ερωτήματα για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Βασίλειο	Plantae
Διαίρεση	Chlorophyta
Κλάση	Clorophyceae
Τάξη	Chlamydomonadales
Οικογένεια	Chlamydomonadaceae
Γένος	Chlamydomonas
Είδος	Chlamydomonas reinhardtii

Πίνακας 1Συστηματική κατάταξη του μικροφύκους Chlamydomonas reinhardtii

#### 2.1.2 Το Chlamydomonas reinhardtii στην βιοαποικοδόμηση φαινόλης

Σύμφωνα με μία πρόσφατη δημοσίευση του εργαστηρίου μας [15], η εναλλακτική πηγή άνθρακα σε συνδυασμό με την ποσότητα φαινόλης στο θρεπτικό μέσο επηρέαζε τόσο την ανάπτυξη του Chlamydomonas reinhardtii όσο και το ποσοστό απομάκρυνσης της φαινόλης από το μέσο.

Μεγαλύτερο ποσοστό βιοαποικοδόμησης παρατηρήθηκε στην περίπτωση απουσίας κάποιας εναλλακτικής πηγής άνθρακα αλλά και στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική πηγή άνθρακα το οξικό οξύ, δηλαδή οργανική πηγή άνθρακα. Ωστόσο, μεγαλύτερη ανάπτυξη παρουσιάστηκε στην περίπτωση του οξικού οξέος (έως 10μl PCV/ml), μικρότερη στην περίπτωση του CO<sub>2</sub> 20%v/v (έως 5μl PCV/ml) ενώ στην απουσία άνθρακα τα *Chlamydomonas reinhardtii* δεν αναπτύχθηκαν.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εκτενέστερα η επίδραση του διοξειδίου του άνθρακα ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, δηλαδή ανόργανη πηγή άνθρακα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας 5%, 10% και 15% v/v CO<sub>2</sub> σε συνθήκες φαινόλης 0, 0.15, 0.50, 2.00 και 4.00mM.

#### 2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.2.1 Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το μέρος της εργασίας ήταν το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* και συγκεκριμένα το εργαστηριακό στέλεχος CC-125, αγρίου τύπου (wild type). Περισσότερες πληροφορίες για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό υπάρχουν στην Ενότητα 2.1.1

#### 2.2.2 Θρεπτικό μέσο και Συνθήκες ανάπτυξης

Η ανάπτυξη των κυττάρων Chlamydomonas reinhardtii πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris – Acetate – Phosphate). Οι συνθήκες ανάπτυξης διατηρήθηκαν σταθερές και ελεγχόμενες – συγκεκριμένα η θερμοκρασία του θαλάμου ανάπτυξης ήταν σταθερή στους 25 ± 1°C και ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας στα 50-60 μΕ·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (χρήση λευκών λαμπών φθορισμού - cool white). Οι κωνικές φιάλες των 2L αφέθηκαν για 4-5 ημέρες υπό συνεχή, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Harris [24].

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Για τον ίδιο σκοπό, όλες οι πειραματικές διαδικασίες παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) παρουσία φλόγας. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με αποστειρωμένη σύριγγα ινσουλίνης του 1 mL και διαρκή απολύμανσή της με αιθανόλη 70% από δείγμα σε δείγμα.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ΤΑΡ συνοψίζεται στον Πίνακας 2

Διαλύματα	Ποσότητα
Trizma – base	2,42g/L
Phosphate buffer	1 mL/L
Hutner's Trace Metals	1 mL/L

#### Πίνακας 2 Σύσταση του θρεπτικού μέσου ΤΑΡ

Solution A	10 mL/L
Acetic Acid	1 mL/L

Το επιθυμητό pH ήταν 7.2±0,2, επομένως η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με μερικές σταγόνες πυκνού υδατικού διαλύματος HCl. Για την δημιουργία στερεών καλλιεργειών στο θρεπτικό μέσο TAP προστέθηκε επιπλέον 1,5% w/v agar [25].

Παρακάτω περιγράφεται η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου TAP:

Συστατικά	Ποσότητα
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	104,4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54,0 g/L

Πίνακας 3 Σύσταση του Phosphate buffer

Το διάλυμα αυτό ήταν απαραίτητο ώστε να διατηρεί το pH κοντά στην επιθυμητή τιμή (ρυθμιστικό διάλυμα). Μετά την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος των φωσφορικών ήταν απαραίτητη η αποστείρωση του.

Συστατικά	Ποσότητα
EDTA	50,00 g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,99 g/L
ZnSO4·7H <sub>2</sub> O	22,00 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,40 g/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,06 g/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57 g/L
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,10 g/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,61 g/L

Πίνακας 4 Σύσταση του Hutner's Trace Metals

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με KOH έως το pH=6,5. Το διάλυμα αυτό ήταν αποτελούσε την πηγή ιχνοστοιχείων, απαραίτητων για την ανάπτυξη των καλλιεργειών. Πίνακας 5 Σύσταση του Solution A

Συστατικά	Ποσότητα
NH₄Cl	40,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,0 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (ń CaCl <sub>2</sub> )	5.0 g/L (ń 3.8 g/L)

Τέλος, το Solution A ήταν απαραίτητο καθώς αποτελούσε πηγή μετάλλων απαραίτητων για τις λειτουργείες του μικροοργανισμού.

#### 2.2.3 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών

Οι μητρικές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες 2L) φυγοκεντήθηκαν στις 2500 στροφές για 5 λεπτά. Ακολούθησε η επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο TAP από το οποίο απουσίαζε το οξικό οξύ (TAP-C). Με κατάλληλη αραίωση η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ορίστηκε στα 2.0μL PCV/mL καλλιέργειας (Ενότητα 2.2.4).

Το διάλυμα κυττάρων χωρίστηκε σε 5 ίσα μέρη, ώστε να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα φαινόλης. Το πρότυπο διάλυμα φαινόλης (stock) που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 0.5M και παρασκευάστηκε διαλύοντας κρυσταλλική φαινόλη σε υπερκάθαρο νερό (nanopore) λαμβάνοντας όλα τα απαραίτητα μέτρα ασφαλείας. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε με φίλτρο σύριγγας μεγέθους πόρων 0,2μm και φυλάχθηκε στο ψυγείο.

Οι συγκεντρώσεις φαινόλης που μελετήσαμε ήταν 0mM (control), 0.15mM, 0.50mM, 2.00mM και 4.00mM. Για κάθε συνθήκη φαινόλης υπήρχε τριπλέτα πειραματικών καλλιεργειών. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ερμητικά κλειστά μπουκαλάκια (χωρητικότητας 100mL) με septa και σφραγίστηκαν με επιπλέον μεταλλικό κάλυμμα. Ο τελικός όγκος σε κάθε καλλιέργεια ήταν 50 mL. Με εσμυρισμένη γυάλινη σύριγγα, εγχύθηκε κατάλληλη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα (5mL, 10mL και 15mL). Οι συνθήκες των πειραματικών καλλιέργειών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6)

Η δειγματοληψία για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή βάση, την ίδια περίπου ώρα. Τα δείγματα λήφθηκαν με αποστειρωμένη σύριγγα ινσουλίνης και λεπτή βελόνα 22g.

Οι πειραματικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25  $\pm$  1°C και ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας στα 50-60 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (low light συνθήκες φωτισμού), υπό διαρκή ανάδευση.

Συνθήκη φαινόλης	Ποσότητα φαινόλης mg/ml )	Ποσότητα CO2
control	0	202
0.15mM	14.1	
0.50mM	47.1	5% v/v
2.00mM	188.2	
4.00mM	376.4	
control	0	
0.15mM	14.1	
0.50mM	47.1	10% v/v
2.00mM	188.2	
4.00mM	376.4	
control	0	
0.15mM	14.1	
0.50mM	47.1	15% v/v
2.00mM	188.2	
4.00mM	376.4	

#### Πίνακας 6 Συνθήκες πειραματικών καλλιεργειών

#### 2.2.4 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο όγκου καθιζάμενων κυττάρων (Packed Cell Volume) σε μL ανά όγκο καλλιέργειας σε mL (μL PCV/mL). Σε βαθμονομημένους τριχοειδής υαλοσωλήνες (hematocrit TPP PCV tubes) προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά.



Εικόνα 7 α. Παράδειγμα προσδιορισμού του αιματοκρίτη σε δείγμα αίματος β. Διαβαθμισμένος σωλήνας PCV

#### 2.2.5 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

#### 2.2.5.1 Αρχή της μεθόδου

Κατά την διάρκεια της φωτοσύνθεσης ένα μέρος της ακτινοβολίας που απορροφάται χρησιμοποιείται για την φωτοχημεία της διεργασίας (φωτεινές αντιδράσεις φωτοσύνθεσης). Η υπόλοιπη ακτινοβολία είτε αποβάλλεται με την μορφή θερμότητας είτε εκπέμπεται ως φθορισμός. Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το όποιο η αποδιέργερση του συστήματος γίνεται με εκπομπη ακτινοβολίας μεταξύ δύο ίδιο καταστάσεων [26]. Το φαινόμενο του επαγωγικού φθορισμού παρατηρήθηκε πρώτη φορά από τους Kautsky & Hirsch και αποτελείται από δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Η μελέτη του επαγωγικού φθορισμού στηρίζεται την ταχεία φάση και αποτελεί ένα πολύτιμο ερευνητικό μέσο για την κατανόηση της μοριακή δομής και λειτουργίας αλλά και τον προσδιορισμό της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Η μέθοδος των Strasser & Strasser [27] αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στο να εκτιμηθεί μια πληθώρα παραμέτρων που αφορούν τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, μεταξύ των οποίων η μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (F<sub>v</sub>/F<sub>max</sub>), το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC), η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS<sub>o</sub>), η ποσότητα της ενέργειας που χάνεται υπό μορφή θερμότητας (DI<sub>o</sub>/RC) και η κβαντική απόδοση της πρωταρχικής φωτοχημείας (TR<sub>o</sub>/ABS).



Εικόνα 8 Καμπύλη επαγωγικού φθορισμού - Στάδια J,I,P για την εφαρμογή του JIP-test

#### 2.2.5.2 Μέτρηση επαγωγικού φθορισμού στις πειραματικές καλλιέργειες

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού πραγματοποιήθηκαν με τη φορητή συσκευή Plant Efficiency Analyser (Handy PEA Hansatech Instruments) - Εικόνα 9 Handy PEAΕικόνα 9, και στην συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με την χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer HP 4.0), σύμφωνα με την μέθοδο των Strasser & Strasser [27]. Οι προς ανάλυση καλλιέργειες παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 λεπτά ώστε να «αδειάσουν» τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια και έπειτα διεγέρθηκαν. Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της μεταβολής του φθορισμού σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Η διέγερση προκαλείται από 3 διόδους φωτισμού (LED) με ένταση ακτινοβολίας έως 3000μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> μήκους κύματος 650nm (ερυθρό φως).



Εικόνα 9 Handy PEA

#### 2.2.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινόλης με την χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

#### 2.2.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών, η μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και η απαίτηση μικρής ποσότητα δείγματος (5 – 100 μL).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιεί υψηλή πίεση για να ωθήσει τον διαλύτη (κινητή φάση) να μετακινηθεί μέσω κλειστών στηλών που περιέχουν πολύ μικρά σωματίδια (στατική φάση), καλά πακεταρισμένα, τα οποία επιτυγχάνουν αναλύσεις υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Το μέγεθος του διαχωρισμού εξαρτάται από την ένταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των υπό ανάλυσης συστατικών και της στατικής φάσης. Η διαφορετική ευκινησία των συστατικών του δείγματος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση, μέσω διαμοριακών δυνάμεων, μεταξύ των μορίων του δείγματος, της κινητής φάσης και της στατικής φάσης.



Εικόνα 10 Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

#### 2.2.6.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαινολικών ενώσεων με HPLC

Τα δείγματα, που είχαν προέρθει από την πρώτη και τελευταία πειραματική ημέρα, φυγοκετρήθηκαν για 5 λεπτά ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα και να συλλεχθεί το υπερκείμενο. Το δείγμα αυτό μετά από κατάλληλη αραίωση – ώστε να αποφευχθεί υπερφόρτωση της στήλης- αναλύθηκε με HPLC.

Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε αποτελούταν από μία αντλία υψηλής ακρίβειας (Gynkotek High Precision Pump, Model 480), ένα θερμοστατούμενο κλίβανο Rigas Labs G5 που διατηρούσε σταθερή την θερμοκρασία της στήλης στους 25°C, έναν ανιχνευτή UV-Vis SPD 10AV της Shimadzu. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε μια χρωματογραφική στήλη C18 (Grace Smart RP18, 250mm L και 4,6mm ID, 5μm μέγεθος των σωματιδίων). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεθανόλης : νερού : οξικού οξέος σε αναλογία 50 : 49 : 1. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο (nanopure) και οι υπόλοιποι διαλύτες ήταν καθαρότητας HPLC grade. Η έκλουση ήταν ισοκρατική και η ροή της κινητής φάσης μετρούνταν στην αρχή των μετρήσεων και ήταν ίση με 1,0 mL·min<sup>-1</sup>.

Ο ανιχνευτής ήταν ρυθμισμένος σε μήκος κύματος 279 nm, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος έχει έντονη απορρόφηση ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης. Επιπλέον για τον ποσοτικό προσδιορισμό δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη, η οποία προσδιορίστηκε πειραματικά με γνωστές ποσότητες φαινόλης. Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε είναι :

 $y = 0.54038 \cdot x - 0.1309 (R^2 = 0.9993)$ 

όπου με x συμβολίζεται η ποσότητα φαινόλης σε ng και με y το εμβαδόν της κορυφής.

#### 2.2.7 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)

#### 2.2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η φασματοφωτομετρία αποτελεί μία βασική μέθοδο ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού χημικών ενώσεων, η οποία χρησιμοποιείται συχνά για τον χαρακτηρισμό βιολογικών δειγμάτων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από κάποιο χρωμοφόρο, δηλαδή το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση του φωτός. Τα μόρια τα οποία συνήθως αναλύονται με φασματοφωτομετρία είναι οργανικά μόρια με εκτεταμένη συζυγία (εναλλαγή απλών-διπλών δεσμών), σύμπλοκα μετάλλων και βιολογικά μακρομόρια Ουσιαστικά, η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού βασίζεται σε ηλεκτρονιακές μεταβάσεις μεταξύ του HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) και του LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) του προς ανάλυση μορίου. [26]

Το όργανο που επιτελεί αυτή την ανάλυση ονομάζεται φασματοφωτόμετρο και τα κύρια μέρη του αποτελούν η πηγή φωτός λυχνία ορατού (WI) και λυχνία υπεριώδους (D<sub>2</sub>), ο μονοχρωμάτορας, η κυψελίδα που περιέχει το δείγμα, ο ανιχνευτής, ο ενισχυτής και το όργανο καταγραφής. [28]



Εικόνα 11 Σχηματική αναπαράσταση των κύριων τμημάτων ενός φασματοφωτομέτρου

#### 2.2.7.2 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Στην παρούσα εργασία, για τον προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών, φυγοκεντρήθηκε 1 mL καλλιέργειας για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 mL 80% ακετόνης και ακολούθησε φυγοκέντρηση για άλλα 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα quartz και μετρήθηκε η απορρόφηση στα μήκη κύματος 470.0, 646.8 και 663.2 nm με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού UV-2700 UV-Vis Spectrometer της Shimadzu. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι γνωστές από την βιβλιογραφία [29] και παρουσιάζονται παρακάτω:

 $C_{a} = 12.25 \cdot A_{663.2} - 2.79 \cdot A_{646.8}$   $C_{b} = 21.5 \cdot A_{646.8} - 5.1 \cdot A_{663.2}$   $C_{x+c} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 1.82 \cdot C_{a} - 85.02 \cdot C_{b}}{198}$ 

#### 2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

# 2.3.1 Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα στην ανάπτυξη του *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φαινόλης

Σύμφωνα με την δημοσίευση του εργαστηρίου μας [15] το Chlamydomonas reinhardtii απουσία άνθρακα (Limit C) δεν εμφάνισε καθόλου ανάπτυξη, ενώ παρουσία 20%v/v CO<sub>2</sub> η τελική κυτταρική συγκέντρωση δεν ξεπέρασε τα 5μl PCV/ml. Το αντικείμενο αυτής της ενότητας είναι η διερεύνηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού αυτού στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα.

Τα αποτελέσματα για κάθε συγκέντρωση του  $CO_2$  ξεχωριστά φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 12-14). Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη ήταν σχετική με την ποσότητα του  $CO_2$ . Επίσης παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση των συνθηκών με 5% και 10%  $CO_2$  η διαφορά της ανάπτυξης μεταξύ των υψηλών και χαμηλών συγκεντρώσεων φαινόλης ήταν μικρή. Όμως, στην περίπτωση του 15% όπως και στην περίπτωση του 20%, η διαφορά που προαναφέρθηκε ήταν μεγαλύτερη.

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η εναλλακτική πηγή άνθρακα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων. Ωστόσο, η οργανικής προέλευσης πηγή άνθρακα όπως το οξικό οξύ φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματική από την ανόργανη καθώς παρέχει πιο εύκολα ενέργεια στα κύτταρα μέσω του μεταβολισμού της όπως έχει βρεθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία [15]. Αυτό σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να εκμεταλλευτεί πιο εύκολα απλά οργανικά μόρια απ' ότι μια ανόργανη πηγή άνθρακα ή αρωματικά οργανικά μόρια. Βέβαια, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι πειραματικές καλλιέργειες ήταν κλειστού τύπου, δηλαδή η ποσότητα του CO<sub>2</sub> προστέθηκε στην αρχή του πειράματος και δεν ανανεώθηκε.



Εικόνα 12 Καμπύλες ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii CC-125 σε συγκέντρωση 5% CO₂ παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων φαινόλης. Αρχική κυτταρική συγκέντρωση: 2.0μl PCV/ml



Εικόνα 13 Καμπύλες ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii CC-125 σε συγκέντρωση 10% CO<sub>2</sub> παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων φαινόλης. Αρχική κυτταρική συγκέντρωση: 2.0μl PCV/ml



Εικόνα 14 Καμπύλες ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii CC-125 σε συγκέντρωση 15% CO<sub>2</sub> παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων φαινόλης. Αρχική κυτταρική συγκέντρωση: 2.0μΙ PCV/ml

#### 2.3.2 Επίδραση της φαινόλης στην δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του *Chlamydomonas reinhardtii*

Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μικροοργανισμού για τις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 15-17), ενώ οι παράμετροι του JIP-test συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 7-9).

Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα εμφανίζουν σημάδια καταπόνησης λόγω της παρουσίας της φαινόλης. Ωστόσο, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα, τόσο μικρότερη φαίνεται να είναι η καταπόνηση. Αυτό παρατηρείται τόσο από τον επαγωγικό φθορισμό (μείωση του λόγου Fv/Fmax), όσο και από τις παραμέτρους του JIP-test όπως μείωση του λόγου RC/CS<sub>0</sub> (πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης) και του λόγου TR<sub>0</sub>/ABS (κβα-ντική απόδοση πρωταρχικής φωτοχημείας) και αύξηση των παραμέτρων DI<sub>0</sub>/RC (διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης υπό μορφή θερμότητας) και ABS/RC (μέγεθος λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης).

Οι παραπάνω μεταβολές έχουν βρεθεί βιβλιογραφικά να δείχνουν μία σειρά από συμπτώματα καταπόνησης φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών, όπως κάτω υπό υψηλές συγκεντρώσεις όζοντος [30], θερμικής καταπόνησης [27] και υπό την παρουσία υποκατεστημένων φαινολικών ενώσεων [13]. Παρόμοια συμπτώματα είχαν εμφανιστεί και στα κύτταρα *Chlamydomonas* σε έκθεσή τους σε φαινόλη σε μία προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου μας [15].



Εικόνα 15 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού μετά από 24 ώρες και 5 ημέρες παρουσία 5% CO2



Εικόνα 16 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού μετά από 24 ώρες και 5 ημέρες παρουσία 10% CO2



Εικόνα 17 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού μετά από 24 ώρες και 5 ημέρες παρουσία 15% CO2

	F <sub>v</sub> /F <sub>max</sub>	TR <sub>o</sub> /ABS	ABS/RC	DI₀/RC	RC/CS <sub>o</sub>
control	0.719	0.701	1,483	0.470	25,176
0.15 mM	0.720	0.712	1,884	0.577	16,285
0.50 mM	0.693	0.644	1,735	0.616	21,059
2.00 mM	0.699	0.700	1,789	0.692	20,766
4.00 mM	0.672	0.644	1,861	0.708	21,267

Πίνακας 7 Φωτοσυνθετικές παράμετροι παρουσία 5% CO2

Πίνακας 8 Φωτοσυνθετικές παράμετροι παρουσία 10% CO2

	F <sub>v</sub> /F <sub>max</sub>	TR₀/ABS	ABS/RC	DI₀/RC	RC/CS₀
control	0.743	0.716	1,443	0.426	26,691
0.15 mM	0.710	0.699	1,623	0.467	23,052
0.50 mM	0.705	0.693	1,544	0.474	23,751
2.00 mM	0.692	0.686	1,710	0.593	18,913
4.00 mM	0.677	0.660	1,743	0.591	19,943

	F <sub>v</sub> /F <sub>max</sub>	TR₀/ABS	ABS/RC	DI₀/RC	RC/CS <sub>o</sub>
control	0.735	0.721	1,568	0.488	23,189
0.15 mM	0.710	0.691	1,648	0.509	22,133
0.50 mM	0.711	0.686	1,816	0.570	19,133
2.00 mM	0.716	0.721	1,952	0.509	15,709
4.00 mM	0.675	0.658	1,759	0.603	18,803

Πίνακας 9 Φωτοσυνθετικές παράμετροι παρουσία 15% CO2

Επιπλέον, την τελευταία ημέρα του πειράματος (5<sup>η</sup> ημέρα) πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της ποσότητας των φωτοσυνθετικών χρωστικών και μέσω τύπων της βιβλιογραφίας (Ενότητα 2.2.7.2) προσδιορίστηκε η ποσότητα της χλωροφύλλης-α (σε μg/ml PCV), η ποσότητα την χλωροφύλλης-β, η ολική ποσότητα καροτενοειδών (ξανθοφύλλες και καροτένια) καθώς και ο λόγος χλωροφύλλης-α προς χλωροφύλλη-β. Ο λόγος αυτός είναι ενδεικτικός του λόγου της πυκνότητας των ενεργών κέντρων ως προς το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας. Επομένως, ένας μικροοργανισμός που υφίσταται καταπόνηση λόγω της ύπαρξης αβιοτικών συνθηκών θα εμφανίζει μειωμένο λόγο Ca/Cb. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 10-12)

Πίνακας 10 Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών σε μg/ml PCV παρουσία 5% CO2

	Са	Cb	Cx+c	Ca/Cb
Control	4.87	2.14	1.82	2.28
0.15 mM	3.86	1.76	1.52	2.19
0.50 mM	3.58	1.65	1.44	2.17
2.00 mM	3.33	1.69	1.34	1.96

Πίνακας 11 Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών σε μg/ml PCV παρουσία 10% CO2

	Са	Cb	Cx+c	Ca/Cb
Control	4.2	1.88	1.55	2.23
0.15 mM	4.14	1.86	1.58	2.22
0.50 mM	3.55	1.63	1.4	2.18
2.00 mM	4.68	2.33	1.89	2.01

Πίνακας 12 Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών σε μg/ml PCV παρουσία 15% CO2

	Са	Cb	Cx+c	Ca/Cb
Control	4.14	1.81	1.52	2.28
0.15 mM	4.21	1.94	1.58	2.17
0.50 mM	4.26	1.96	1.64	2.16
2.00 mM	5.49	2.68	2.11	2.05

#### 2.3.3 Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το Chlamydomonas reinhardtii

Το τελευταίο κομμάτι του πρώτου μέρους της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιοαποικοδόμησης της φαινόλης από το *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις πειραματικές καλλιέργειες, έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), έτσι ώστε να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός της φαινόλης την πειραματική ημέρα 0 και την ημέρα 5. Η διαφορά της ποσότητας της φαινόλης μεταξύ ημέρας 0 και ημέρα 5 εκφράστηκε ως σχετική απομάκρυνση φαινόλης (μmol ουσίας που απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας ανά κυτταρικό όγκο (PCV)).

Παρατηρήθηκε ότι απουσία άνθρακα έχουμε την μέγιστη απομάκρυνση της φαινόλης απ' το μέσο καλλιέργειας. Επίσης, όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική ποσότητα της φαινόλης τόσο μεγαλύτερη ήταν και η σχετική απομάκρυνση της φαινόλης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 18)

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχε αποδειχθεί πως η απομάκρυνση της φαινόλης δεν αποδόθηκε ούτε σε φωτοοξείδωσή της, ούτε σε βιοσυσσώρευση. Σχετικά με την πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τις ίδιες συνθήκες χωρίς τον μικροοργανισμό και δεν παρατηρήθηκε μείωση της ποσότητας της φαινόλης. Όσον αφορά την βιοσυσσώρευση η περίπτωση αυτή αποκλείστηκε διότι δεν παρατηρήθηκε συστηματική μείωση της φαινόλης ανεξάρτητα από τις πειραματικές συνθήκες. Συνεπώς η απομάκρυνση της φαινόλης από το θρεπτικό μέσο πιθανότατα αποδίδεται σε βιοαποικοδόμηση.



Εικόνα 18 Σχετική απομάκρυνσης της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας

#### 2.4 Σύμπερασματά

Το πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας ολοκληρώθηκε καταδεικνύοντας ότι η εναλλακτική πηγή άνθρακα είναι απαραίτητη για τον μικροοργανισμό τόσο για την ανάπτυξη όσο και για την διαχείριση της καταπόνησης που προκαλείται από την παρουσία της φαινόλης. Μετά από διεξοδική μελέτη τόσο της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων οξικού οξέος σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία όσο και της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων οξικού οξέος σε προηγούμενη πτυχιακή την παρούσα πτυχιακή εργασία, το οξικό οξύ φαίνεται να αποτελεί καλύτερη εναλλακτική πηγή άνθρακα καθώς μέσω του μεταβολισμού του καλύπτει πιο αποτελεσματικά τις ενεργειακές απαιτήσεις του *Chlamydomonas reinhardtii.* 

Επιπλέον, όσον αφορά την βιοαποικοδόμηση της φαινόλης, το διοξείδιο του άνθρακα δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερα βοηθητικό ρόλο καθώς στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν η σχετική απομάκρυνση της φαινόλη από το μέσο καλλιέργειας δεν έφτανε τα επίπεδα του 20% ή της συνθήκης Limit-C (απουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα).

# 3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟΥ DCMU ΚΑΙ ΜΙΑΣ ΣΕΙΡΑΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 3.1.1 Ο μικροοργανισμός από το Γιόφυρο

Με αφορμή την βιβλιογραφία (Ενότητα 1.4) υπήρχε μεγάλο ενδιαφέρον από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας να απομονωθεί και να μελετηθεί ένας μικροοργανισμού ο οποίος έχει αναπτυχθεί σε επιβαρυμένο περιβάλλον. Το 2016 επιτεύχθηκε η απομόνωση ενός φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού από τον ποταμό Γιόφυρο με σκοπό τον χαρακτηρισμό των φαινοτυπικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του, την μελέτη της ανθεκτικότητας του σε αναστολείς και την διερεύνηση της ικανότητας του μικροοργανισμού αυτού να αποικοδομήσει την φαινόλη.

Ο μικροοργανισμός αυτός παρατηρήθηκε με οπτική μικροσκοπία, μικροσκοπία φθορισμού και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scannning Electron Microscopy, SEM) και διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για πράσινο, μονοκύτταρο, σφαιρικό μικροοργανισμό, διαμέτρου 3,8±0,4μm, με έναν κυπελοειδή χλωροπλάστη και ένα εκτεταμένο περίβλημα. Επίσης από ανάλυση των φωτοσυνθετικών χρωστικών αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μικροφύκος.



Εικόνα 19 Εικόνες του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

#### 3.1.2 Ζιζανιοκτόνα

Ζιζανιοκτόνα είναι χημικές ενώσεις οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται για να σκοτώνουν τα ζιζάνια. Τα περισσότερα ζιζανιοκτόνα δρουν ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης, παρεμποδίζοντας την λειτουργία είτε του φωτοσυστήματος ΙΙ είτε του φωτοσυστήματος Ι. Οι αναστολείς του φωτοσυστήματος ΙΙ διακόπτουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (πχ. DCMU και ατραζίνη) ενώ οι αναστολείς του φωτοσυστήματος Ι παρεκκλίνουν την πορεία των ηλεκτρονίων προς τους τελικούς αποδέκτες παρέχοντας παρακαμπτήριες πορείες (πχ. παρακουάτ). [1]

#### 3.1.2.1 DCMU

Η DCMU είναι ένα ζιζανιοκτόνο το οποίο δρα ως αναστολέας του φωτοσυστήματος ΙΙ. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην παρεμπόδιση πρόσδεσης της πλαστοκινόνης στην θέση Q<sub>B</sub> της υπομονάδας D1 του φωτοσυστήματος ΙΙ, εμποδίζοντας έτσι την αναγωγή της σε πλαστοκινόλη και κατ' επέκταση την διακοπή της μη-κυκλικής πορείας των ηλεκτρονίων. [31]

Η DCMU είναι εμπορικά διαθέσιμη με το όνομα Diuron και συντέθηκε πρώτη φορά από την Bayer το 1954. Είναι μια χημική ένωση η οποία, έκτος από την χρήση της ως ζιζανιοκτόνο, αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μελέτη και την κατανόηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.



Εικόνα 20 Σκελετική δομή της DCMU

#### 3.1.3 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται στην θεραπεία ή την πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων. Η ταξινόμηση των αντιβιοτικών γίνεται είτε με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, είτε της χημικής δομής τους, είτε το φάσμα δράσης τους. Συνήθως, τα αντιβιοτικά δρουν παρεμποδίζοντας διάφορες λειτουργίες των βακτηρίων οδηγώντας τα στον θάνατο ή αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους. [32]

Τα αντιβιοτικά που στοχεύουν είτε στο κυτταρικό τοίχωμα, είτε την πλασματική μεμβράνη, είτε παρεμποδίζουν απαραίτητα ένζυμα εμπίπτουν στην κατηγορία των βακτηριοκτόνων. Απ' την άλλη τα αντιβιοτικά τα οποία αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων ανήκουν στην κατηγορία των βακτηριοστατικών. [33]

Τα αντιβιοτικά τα οποία αναλύονται παρακάτω ανήκουν όλα στην τελευταία κατηγορία, καθώς αποτελούν αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης.

#### 3.1.3.1 Σπεκτινομυκίνη

Η σπεκτινομυκίνη, γνωστή και με το εμπορικό όνομα Trobicin, ανήκει στην κατηγορία των αμινοκυκλιτολών. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1961 από το *Streptomyces spectabilis*. Ο μηχανισμός δράσης της συμπεριλαμβάνει την δέσμευσή της στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος, παρεμποδίζοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση.



Εικόνα 21 Σκελετική δομή της σπεκτινομυκίνης

#### 3.1.3.2 Χλωραμφαινικόλη

Η χλωραμφαινικόλη είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιείται για την θεραπεία πληρώθας βακτηριακών λοιμώξεων. Απομονώθηκε το 1947 απ' το Streptomyces venezuelae, η χημική του δομή ταυτοποιήθηκε και συντέθηκε για πρώτη φορά το 1949. Ουσιαστικά, η χλωραμφαινικόλη παρεμποδίζει την επιμήκυνση της πρωτεϊνικής αλυσίδας αναστέλλοντας την δράση της πεπτιδιλο- τρανσφεράσης. Συγκεκριμένα προσδένεται σε κατάλοιπα του 23S rRNA της 50S υπομονάδας, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού.



Εικόνα 22 Σκελετική δομή της χλωραμφαινικόλης

#### 3.1.3.3 Καναμυκίνη

Η καναμυκίνη είναι αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιείται στην θεραπεία σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων και της φυματίωσης. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το Streptomyces kanamyceticus το 1957. Η καναμυκίνη αλληλεπιδρά με την 30S υπομονάδα του ριβοσώματος οδηγώντας σε λανθασμένη ανάγνωση των κωδικίων και συνεπώς οι πρωτεϊνες που παράγονται είναι μη λειτουργικές.



Εικόνα 23 Σκελετική δομή της καναμυκίνης

#### 3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.2.1 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα πράσινο μικροφύκος που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο (Ενότητα 3.1.1) και το πράσινο μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* (Ενότητα 2.1.1) και συγκεκριμένα το εργαστηριακό στέλεχος CC-125 το οποίο είναι αγρίου τύπου (wild type).

#### 3.2.2 Θρεπτικό μέσο και Συνθήκες ανάπτυξης

Το θρεπτικό μέσο και οι συνθήκες ανάπτυξης τόσο των κυττάρων Chlamydomonas reinhardtii όσο και των κυττάρων που απομονώθηκαν από τον ποταμό Γιόφυρο είναι όμοια με το πρώτο μέρος της εργασίας και παρουσιάζονται εκτενώς στην Ενότητα 2.2.2.

#### 3.2.3 Παρασκευή πειραματικών καλλιεργειών

Οι μητρικές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες 2L) των κυττάρων Chlamydomonas reinhardtii φυγοκεντήθηκαν στις 2500 στροφές για 5 λεπτά, ενώ των κυττάρων από το Γιόφυρο φυγοκεντήθηκαν στις 6000 στροφές για 10 λεπτά . Ακολούθησε η επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο TAP. Με κατάλληλη αραίωση η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ορίστηκε στα 2.0μL PCV/mL καλλιέργειας για το Chlamydomonas reinhardtii και 1.0μL PCV/mL καλλιέργειας για τα κύτταρα από το Γιόφυρο (Ενότητα 2.2.4). Ο λόγος που στα κύτταρα από το Γιόφυρο η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ορίστηκε στο ήμισυ της αντίστοιχης των Chlamydomonas reinhardtii είναι διότι η διάμετρός τους είναι περίπου η μισή.

Το διάλυμα κυττάρων - κάθε μικροοργανισμού ξεχωριστά - χωρίστηκε σε 5 ίσα μέρη, ώστε να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα αναστολέα.

Το πρότυπο διάλυμα DCMU (stock) που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 2500ppm και παρασκευάστηκε διαλύοντας στερεή DCMU σε μεθανόλη λαμβάνοντας όλα τα απαραίτητα μέτρα ασφαλείας. Με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν και τα υπόλοιπα πρότυπα ώστε ο όγκος που επρόκειτο να προστεθεί στην εκάστοτε πειραματική καλλιέργεια να είναι ο ίδιος.

Τα πρότυπα διαλύματα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συγκέντρωσης:

- 50mg/ml για την καναμυκίνη (διαλυμένη σε νερό)
- 50mg/ml για την σπεκτινομυκίνη (διαλυμένη σε νερό)
- 30mg/ml για την χλωραμφαινικόλη (διαλυμένη σε αιθανόλη)

Ο όγκος αντιβιοτικού που προστέθηκε στην κάθε καλλιέργεια ήταν ίδιος. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο control όπου στο ένα δεν προστέθηκε κάποιο αντιδραστήριο και στο δεύτερο προστέθηκε ίσος όγκος αιθανόλης.

Για κάθε συνθήκη DCMU και αντιβιοτικού υπήρχε τριπλέτα πειραματικών καλλιεργειών. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε ερμητικά κλειστά μπουκαλάκια (χωρητικότητας 100mL). Ο τελικός όγκος σε κάθε καλλιέργεια ήταν 50 mL. Οι συνθήκες των πειραματικών καλλιέργειών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13)

Η δειγματοληψία για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή βάση, την ίδια περίπου ώρα. Τα δείγματα λήφθηκαν με αποστειρωμένη σύριγγα ινσουλίνης και λεπτή βελόνα 22g.

Οι πειραματικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25  $\pm$  1°C και ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας στα 50-60 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (low light συνθήκες φωτισμού), υπό διαρκή ανάδευση.

Συγκέντρωση	Αντιβιοτικό	Συγκέ-
DCMU		ντρωση Αντιβιοτικών
control	control	-
0.25 ppm	Αιθανόλη	-
0.50 ppm	Σπεκτινομυκίνη	50
1.00 ppm	Καναμυκίνη	25
2.00 ppm	Χλωραμφαινι-	15
	κόλη	

#### Πίνακας 13 Συνθήκες πειραματικών καλλιεργειών

#### 3.2.4 Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Ο υπολογισμός της κυτταρικής συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ποσότητας της χλωροφύλλης-α. Ο τρόπος υπολογισμού της ποσότητας της χλωροφύλλης-α σε μg/ml καλλιέργειας μέσω της απορρόφησή της σε συγκεκριμένα μήκη κύματος αναλύεται στην Ενότητα 2.2.7.2 για το *Chlamydomonas reinhardtii*. Για τα κύτταρα από το Γιόφυρο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι η εκχύλιση των χρωστικών έγινε σε μεθανόλη. Εφόσον χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός διαλύτης, οι μετρήσεις έγιναν στα 470.0, 652.4 και 665.2nm και οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

$$C_{a} = 12.25 \cdot A_{665.2} - 2.79 \cdot A_{652.4}$$

$$C_{b} = 21.5 \cdot A_{652.4} - 5.1 \cdot A_{665.2}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 1.82 \cdot C_{a} - 85.02 \cdot C_{b}}{198}$$

#### 3.2.5 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικής απόδοσης

Ο προσδιορισμός της φωτοσυνθετικής απόδοσης έγινε με μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού. Η αρχή της μεθόδου καθώς και η μέτρηση του λόγου F<sub>v</sub>/F<sub>max</sub> στις πειραματικές καλλιέργειες παρατίθενται στην Ενότητα 2.2.5.

#### 3.3 Αποτελεσματά και Συζητήση

#### 3.3.1 Επίδραση της DCMU στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii για τις 3 πρώτες πειραματικές ημέρες φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 24) ενώ τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τον μικροοργανισμό από το Γιόφυρο φαίνονται στην Εικόνα 25. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ζιζανιοκτόνο δρα ανασταλτικά και στα δύο στελέχη. Ωστόσο, από τις καμπύλες ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα από το Γιόφυρο εμφάνισαν εκθετική φάση, ακόμα και αν η ανάπτυξη ήταν μικρότερη από αυτή της καλλιέργειας μάρτυρα (control) ενώ τα Chlamydomonas παρέμειναν σε μια λανθάνουσα κατάσταση, δηλαδή, πρακτικά, δεν αναπτύχθηκαν.



Εικόνα 24 Καμπύλη ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii, CC-125, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου DCMU



Εικόνα 25 Καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου DCMU

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση όσον αφορά τα κύτταρα από το Γιόφυρο ήταν ότι η αναστολή της ανάπτυξης ήταν ανεξάρτητη της ποσότητας του ζιζανιοκτόνου. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται σε χαρακτηριστικά του κυττάρου που το διαφοροποιούν από το *Chlamydomonas*, όπως το εκτεταμένο περίβλημα που διαθέτει, όπως φαίνεται και στις εικόνες από το SEM (Εικόνα 19). Το περίβλημα αυτό ενδεχομένως επιτρέπει σε καθορισμένη ποσότητα του ζιζανιοκτόνου να εισαχθεί στο κύτταρο.

Με το πέρας των πειραματικών μετρήσεων ακολούθησε μια διαδικασία επαναιώρησης των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε TAP απουσία του ζιζανιοκτόνου DCMU. Ο λόγος που απομακρύνθηκε η DCMU ήταν για να μελετηθεί η πιθανότητα ανάκαμψης των κυττάρων από την ανασταλτική δράση της DCMU. Τα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξη παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 26-27). Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύσσονται μετά την απομάκρυνση της DCMU. Στην περίπτωση του *Chlamydomonas* η ανάπτυξη αυτή φαίνεται να είναι σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control πριν την επαναιώρηση. Επίσης, φαίνεται ότι η ανάπτυξη του σε σχέση με τα κύτταρα απ' το Γιόφυρο είναι μικρότερη.



Εικόνα 26 Καμπύλη ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii επαναιωρημένα σε νέο θρεπτικό μέσο. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στις πειραματικές συνθήκες πριν την επαναιώρηση.



Εικόνα 27 Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων από το Γιόφυρο επαναιωρημένα σε νέο θρεπτικό μέσο. Οι συγκε-ντρώσεις αναφέρονται στις πειραματικές συνθήκες πριν την επαναιώρηση

#### 3.3.2 Επίδραση της DCMU στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμών

Σε επόμενο βήμα μετρήθηκε η φωτοσυνθετική ικανότητα των δύο μικροοργανισμών παpoυσία της DCMU, η οποία όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (Ενότητα 3.1.2.1) αποτελεί αναστολέας του φωτοσυστήματος ΙΙ. Τα αποτελέσματα των 3 πρώτων πειραματικών ημερών παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων (Εικόνα 28-29). Όσον αφορά το εργαστηριακό στέλεχος παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση του επαγωγικού φθορισμού σε πολύ χαμηλά επίπεδα, όπου μπορεί να θεωρηθεί ότι το φωτοσύστημα ΙΙ του μικροοργανισμού δεν είναι λειτουργικό. Απ' την άλλη, πτώση του λόγου F<sub>v</sub>/F<sub>max</sub> παρατηρήθηκε και στα κύτταρα από το Γιόφυρο με την διαφορά ότι η πτώση ήταν πολύ μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του *Chlamydomonas*. Ουσιαστικά, τα κύτταρα από το Γιόφυρο έδειξαν σημάδια καταπόνησης, όμως ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός παρέμεινε λειτουργικός.



Εικόνα 28 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού του Chlamydomonas reinhardtii παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων DCMU



Εικόνα 29 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων DCMU

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα της DCMU. Τα αποτελέσματα του επαγωγικού φθορισμού των επόμενων 4 πειραματικών ημερών φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 30-31). Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα από το Γιόφυρο επανέφεραν την φωτοσυνθετική τους απόδοση στο επίπεδο του control (αύξηση του F<sub>v</sub>/F<sub>max</sub>) ενώ τα *Chlamydomonas* δεν μπόρεσαν με την ίδια ευκολία να ανακάμψουν από την επίδραση της DCMU. Παρόλα αυτά, την 4<sup>η</sup> πειραματική ημέρα μετά την επαναιώρηση παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του λόγου  $F_v/F_{max}$  χωρίς όμως να προσεγγίζει τις τιμές του control.



Εικόνα 30 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού του Chlamydomonas reinhardtii επαναιωρημένα σε νέο θρεπτικό μέσο. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στις πειραματικές συνθήκες πριν την επαναιώρηση.



Εικόνα 31 Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού του Chlamydomonas reinhardtii επαναιωρημένα σε νέο θρεπτικό μέσο. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στις πειραματικές συνθήκες πριν την επαναιώρηση.

#### 3.3.3 Επίδραση των αντιβιοτικών στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών

Στο τελευταίο μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζεται η μελέτη της επίδρασης μιας σειράς αντιβιοτικών στους δυο μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης για το εργαστηριακό στέλεχος φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 32-34). Ανασταλτική δράση παρατηρήθηκε μόνο από την σπεκτινοομυκίνη και την καναμυκίνη, ενώ στην περίπτωση της χλωραμφαινικόλης δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε σχέση με το control.



Εικόνα 32 Καμπύλη ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii παρουσία σπεκτινομυκίνης



Εικόνα 33Καμπύλη ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii παρουσία χλωραμφαινικόλης



Εικόνα 34 Καμπύλη ανάπτυξης του Chlamydomonas reinhardtii παρουσια καναμυκίνης

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των κυττάρων από το Γιόφυρο, παρουσία των αντιβιοτικών, παρουσιάζονται στα επόμενα 3 διαγράμματα (Εικόνα 35-37). Από τα διαγράμματα παρατηρείται ότι κανένα από τα 3 αντιβιοτικά δεν έδρασε ανασταλτικά ως προς την ανάπτυξη του μικροοργανισμού αυτού.



Εικόνα 35 Καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο παρουσία σπεκτινομυκίνης



Εικόνα 36 Καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο παρουσία χλωραμφαινικόλης



Εικόνα 37 Καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο παρουσία καναμυκίνης

Ωστόσο, επειδή οι πειραματικές καλλιέργειες παρασκευάστηκαν με σχετικά μεγάλη αρχική κυτταρική συγκέντρωση, τα πειράματα επαναλήφθηκαν χρησιμοποιώντας το ίδιο θρεπτικό μέσο, την ίδια ποσότητα του εκάστοτε αντιβιοτικού αλλά πολύ μικρότερη αρχική ποσότητα κυττάρων (0,28 μg χλωροφύλλης-α/ mL καλλιέργειας). Τα αποτελέσματα του συμπληρωματικού αυτού πειράματος συνοψίζονται στα 3 επόμενα διαγράμματα, ξεχωριστά για κάθε αντιβιοτικό.

Παρατηρήθηκε ότι η σπεκτικομυκίνη και η καναμυκίνη προκάλεσαν σημαντικό ποσοστό αναστολής στο εργαστηριακό στέλεχος, της τάξης του 95%, ενώ τα αντίστοιχα αντιβιοτικά δεν προκάλεσαν αναστολή μεγαλύτερη του 10% στα κύτταρα από το Γιόφυρο. Απ' την άλλη πλευρά, η χλωραμφαινικόλη φαίνεται να προκαλεί πολύ μικρή αναστολή στο *Chlamydomo*nas ενώ στα κύτταρα από το Γιόφυρο, αν λάβουμε υπόψη και τα πειραματικά σφάλματα, δεν φαίνεται να έχει ανασταλτική δράση.



Εικόνα 38 Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της σπεκτινομυκίνης στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών



Εικόνα 39 Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της χλωραμφαιννικόλης στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών



Εικόνα 40 Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της καναμυκίνης στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών

3.3.4 Επίδραση των αντιβιοτικών στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμών Τελευταίο τμήμα του δεύτερου μέρους της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών στην φωτοσυνθετική απόδοση των δυο μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα για το εργαστηριακό στέλεχος φαίνονται στα 3 επόμενα διαγράμματα (Εικόνα 41-43). Παρατηρήθηκε ότι και στα 3 αντιβιοτικά υπήρχαν σημάδια καταπόνησης, τα οποία είχαν πιο έντονο χαρακτήρα την περίπτωση της σπεκτινομυκίνης και της καναμυκίνης.



Εικόνα 41 Επίδραση της σπεκτινομυκίνης στην φωτοσυνθετική απόδοση του Chlamydomonas reinhardtii



Εικόνα 42 Επίδραση της χλωραμφαινικόλης στην φωτοσυνθετική απόδοση του Chlamydomonas reinhardtii



Εικόνα 43 Επίδραση της καναμυκίνης στην φωτοσυνθετική απόδοση του Chlamydomonas reinhardtii

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα κύτταρα από το Γιόφυρο φαίνονται στα 3 επόμενα διαγράμματα (Εικόνα 44-46). Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα 3 αντιβιοτικά δεν προκάλεσε καταπόνηση στον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, καθώς οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού δεν έδειξαν σημαντικές αποκλίσεις από τις αντίστοιχες μετρήσεις των control.



Εικόνα 44 Επίδραση της σπεκτινομυκίνης στην φωτοσυνθετική απόδοση του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο



Εικόνα 45 Επίδραση της χλωραμφαινικόλης στην φωτοσυνθετική απόδοση του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο



Εικόνα 46 Επίδραση της καναμυκίνης στην φωτοσυνθετική απόδοση του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο

Τέλος, όσον αφορά το συμπληρωματικό πείραμα που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού την 5<sup>η</sup> πειραματική ημέρα και τα αποτελέσματα είναι αυτά που απεικονίζονται στα 3 παρακάτω διαγράμματα για κάθε αντιβιοτικό ξεχωριστά (Εικόνα 47-49).

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η σπεκτινομυκίνη και η καναμυκίνη προκάλεσαν πτώση της φωτοσυνθετικής απόδοσης και στους δυο μικροοργανισμούς, με τα σημάδια καταπόνησης στην περίπτωση του *Chlamydomonas* να είναι πολύ πιο έντονα σε σχέση με την περίπτωση των κυττάρων απ' το Γιόφυρο. Τέλος, η χλωραμφαινικόλη φάνηκε να επιδρά αρνητικά στην φωτοσυνθετική απόδοση του εργαστηριακού στελέχους, ενώ στα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το αντίστοιχο control.



Εικόνα 47 Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της σπεκτινομυκίνης στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμών



Εικόνα 48 Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της χλωραμφαιννικόλης στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμών



Εικόνα 49 Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της καναμυκίνης στην φωτοσυνθετική απόδοση των δύο μικροοργανισμών

#### 3.4 Σύμπερασματά

Η μελέτη της επίδρασης των αντιβιοτικών τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην φωτοσυνθετική απόδοση των δυο μικροοργανισμών κατέδειξε ότι τα κύτταρα από τον ποταμό Γιόφυρο παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτή του εργαστηριακού στελέχους.

Το γεγονός αυτό, όπως προαναφέρθηκε άλλωστε, ενδεχομένως να σχετίζεται με το εκτεταμένο περίβλημα το οποίο υπάρχει εξωτερικά του μικροοργανισμού. Είναι αρκετά πιθανό το περίβλημα αυτό να δρα προστατευτικά ως προς τον μικροοργανισμό, παρεμποδίζοντας την είσοδο ξενοβιοτικών ουσιών επιτυγχάνοντας με αυτό το τρόπο την διατήρηση της ομοιόστασης του.

Επιπλέον, από την μελέτη φάνηκε ότι την πιο αποτελεσματική δράση στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν είχαν τα αντιβιοτικά σπεκτινομυκίνη και καναμυκίνη. Παρουσία των συγκεκριμένων αντιβιοτικών παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού αλλά και τα σημάδια καταπόνησης ήταν εμφανέστερα.

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτέλεσε μέρος μιας ευρύτερης μελέτης της ικανότητας του *Chlamydomonas reinhardtii* να αποικοδομήσει τη φαινόλη υπό συνθήκες που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποσότητα της εναλλακτικής πηγής άνθρακα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλά και στην διαχείριση της καταπόνησης που υφίσταται ο μικροοργανισμός παρουσία της φαινόλης. Παρόλα αυτά, μια ανόργανη πηγή άνθρακα, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, φάνηκε ότι δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο μια απλή οργανική πηγή άνθρακα, όπως το οξικό οξύ. Τέλος, όσο αφορά την βιοαποικοδόμηση της φαινόλης, τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα. Ιδανικές συνθήκες για την απομάκρυνση της φαινόλης από το μέσο καλλιέργειας αποτελούν είτε η απουσία άνθρακα (Limit-C συνθήκη) είτε η χρήση του οξικού ως εναλλακτική πηγή άνθρακα.

Απ' την άλλη πλευρά, το δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας αποτέλεσε συγκριτική μελέτη της ανθεκτικότητας ενός μικροοργανισμού που απομονώθηκε από ένα επιβαρυμένο φυσικό περιβάλλον σε σχέση με ένα εργαστηριακό στέλεχος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς τόσο του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όσο και την ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις ίδιες συνθήκες, τα κύτταρα από το Γιόφυρο δεν επηρεάζονται τόσο σημαντικά όσο το εργαστηριακό στέλεχος. Σε αυτό το αποτέλεσμα πιθανολογείται ότι συμβάλει το χαρακτηριστικό περίβλημα το οποίο βρίσκεται εξωτερικά του μικροοργανισμού.

Μελλοντικοί στόχοι όσον αφορά το πρώτο μέρος της εργασίας αποτελούν η ταυτοποίηση τυχών προϊόντων τα οποία ενδεχομένως να αποτελέσουν μια ένδειξη του μεταβολικού μονοπατιού, η μελέτη άλλων φαινολικών ενώσεων όπως υποκατεστημένες φαινόλες και η διερεύνηση της ικανότητας του μικροφύκους από το Γιόφυρο να αποικοδομήσει την φαινόλη καθώς και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών. Τέλος, όσον αφορά το δεύτερο τμήμα της παρούσας εργασίας μελλοντικός στόχος αποτελεί ο χαρακτηρισμός του περιβλήματος του μικροοργανισμού από το Γιόφυρο καθώς και η συγκριτική μελέτη της ανθεκτικότητας του σε άλλους αναστολείς, σε σχέση με το εργαστηριακό στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii*.

# 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Βιοχημεία*. 2012, Ηρακλειο: Παναπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- 2. Taiz, L., et al., *Φυσιολογία και Ανάπτυξη Φυτών*. 2017, Αθήνα: Utopia.
- 3. ΜcMurry, J., *Οργανική Χημεία*. 2013, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- 4. Hansch, C., et al., *Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity.* Chem Biol Interact, 2000. **127**(1): p. 61-72.
- 5. Boyd, E.M., Killham, K. and Meharg, A.A., *Toxicity of mono-, di- and trichlorophenols to lux marked terrestrial bacteria, Burkholderia species Rasc c2 and Pseudomonas fluorescens.* Chemosphere, 2001. **43**(2): p. 157-166.
- 6. Moridani, M.Y., et al., *Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes.* Chem Biol Interact, 2004. **147**(3): p. 297-307.
- 7. Tsutsui, T., et al., *Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells.* Mutat Res, 1997. **373**(1): p. 113-23.
- 8. Selassie, C.D., et al., *Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process?* Chem Biol Interact, 1998. **113**(3): p. 175-90.
- 9. Alexander, M., *Biodegradation and bioremediation* 1994: p. 71-98.
- 10. Van Hamme, J., *Bioavailability and Biodegadation of Organic Pollutants A Microbial Perspective*. Biodegradation and Bioremediation. Vol. 2. 2004, New York: Springer.
- 11. Diaz, E., *Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility.* Int Microbiol 2004. **7**: p. 173-180.
- 12. Ellis, L.B., et al., *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: emphasizing enzymes.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 340-3.
- 13. Papazi, A. and K. Kotzabasis, *Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds: exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation.* J Biotechnol, 2007. **129**(4): p. 706-16.
- Papazi, A. and K. Kotzabasis, Inductive and resonance effects of substituents adjust the microalgal biodegradation of toxical phenolic compounds. J Biotechnol, 2008.
   135(4): p. 366-73.
- 15. Nazos, T.T., E.J. Kokarakis, and D.F. Ghanotakis, *Metabolism of xenobiotics by Chlamydomonas reinhardtii: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis.* Photosynth Res, 2017. **131**(1): p. 31-40.
- 16. Boopathy, R., *Factors limiting bioremediation technologies*. Bioresource Technology, 2000. **74**: p. 63-67.
- 17. Schie, P.M. and L.Y. Young, *Biodegradation of phenol: Mechanisms and Applications*. Bioremediation, 2000. **4**(1): p. 1-18.
- 18. Semple, K.T. and R.B. Cain, *Biodegradation of phenols by the alga Ochromonas danica*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(4): p. 1265-73.
- 19. Kafilzadeh, F., M.S. Farhangdoost, and Y. Tahery, *Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay.* African Journal of Biotechnology, 2010. **9**(40): p. 6721-6726
- 20. Ajaz, M., et al, *Phenol resistant-bacteria from soil: Identification-characterization and genetical studies.* Pakistan Journal of Botany, 2004. **36**(2): p. 415-424.
- 21. Baek, S.H., et al, *Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions.* Current Microbiology, 2003. **47**(6): p. 462-466.

- 22. Goodenough, U., et al., *Molecular Genetics of Sexuality in Chlamydomonas*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995. **46**: p. 21-44.
- 23. Rochaix, J., A. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, *The molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. 1998, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- 24. Harris, E.H., *The Chlamydomonas sourcebook : a comprehensive guide to biology and laboratory use*. 1989, San Diego: Academic Press.
- 25. Gorman, D. and R. Levine, *Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardii.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**: p. 1665-1669.
- 26. Atkins, P. and J. de Paula, *Φυσικοχημεία*. 2015, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- 27. Strasser, B. and R. Strasser, *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test.* Kluwer Academic Press, Dordrecht, 1995. **5**.
- 28. Harris, D.C., *Ποσοτική Χημική Ανάλυση*. Vol. 2. 2010, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- 29. Wellburn, A., *The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution.* Plant Physiol, 1994. **144**(3): p. 307-313.
- 30. Navakoudis, E., et al., *Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1621**(2): p. 160-9.
- 31. Lavergne, J., *Mode of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. Evidence that the inhibitor competes with plastoquinone for binding to a common site on the acceptor side of Photosystem II.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1982. **682**(3): p. 345-353.
- 32. Schwalbe, R., L. Steele-Moore, and A.C. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. 2007: CRC Press.
- 33. Finberg, R.W., et al., *The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **39**(9): p. 1314-1320.